

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

SISTEMA LÍMBICO

Históricamente, los centros neuronales que coordinan las respuestas emocionales han sido agrupados bajo la rubrica de sistema límbico. El sistema límbico es la base del cerebro emocional (Moore, 1982) participando en los procesos implicados en la memoria, en la motivación y en la monitorización, mediación y expresión emocional, así como en el comportamiento sexual y social. Luchar o huir, atraer o repeler, suscitar o calmar, así como el hambre, la sed, la saciedad, el miedo, la tristeza, el afecto, la felicidad, y el control de la agresión, son respuestas mediadas por el sistema límbico (Joseph, 1992). Evolutivamente, ésta es la parte más antigua, y al mismo tiempo más conservada, del cerebro de los mamíferos. Es a través del sistema límbico que podemos experimentar y expresar nuestras emociones.

La importancia del sistema límbico, concretamente en el ámbito emocional, no escapo a la corriente artística del siglo XVI, siendo dibujado y pintado por algunos de los más importantes artistas de la época. Sin embargo, fue Michelangelo quién mejor lo immortalizó en un fresco de la capilla Sixtina titulado “La creación de Adán” (Fig. 1).

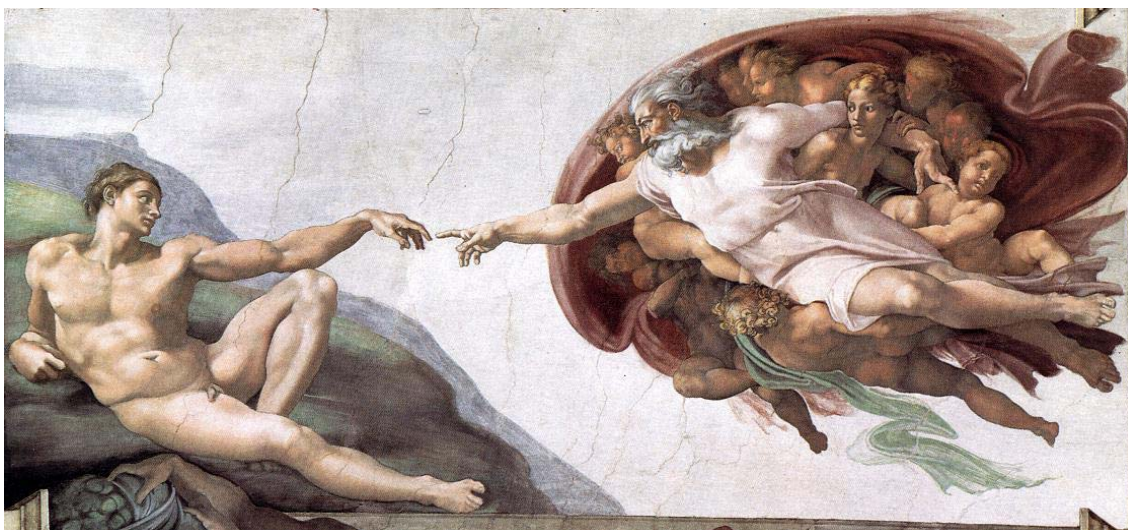
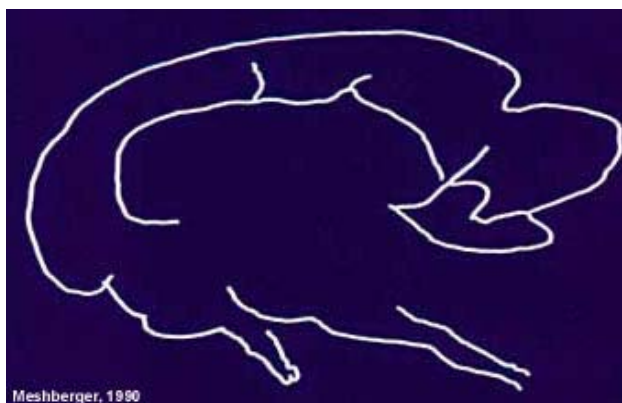


FIGURA 1. “La creación de Adam”. Arriba, vemos el famoso fresco de la capilla Sixtina “La creación de Adam” de la autoría del pintor renacentista Michelangelo (siglo XVI). A la derecha, se muestra un dibujo (Meshberger, 1990) del contorno de la estructura que forman Dios y los Ángeles y que corresponde con gran exactitud a la anatomía cerebral.



En este fresco el punto de la acción consiste en dos manos que entran en contacto, ligeramente hacia el lado izquierdo del centro de la pintura. Adán se encuentra al lado izquierdo y al otro lado está Dios rodeado por un grupo de Ángeles dispuestos determinadamente dentro de una estructura. Analizando con más detalle esta estructura, Meshberger (1990) observó que por detrás de Dios había la imagen del cerebro humano. Los bordes de esa estructura se correlacionaban con un surco en el interior y otro en el exterior de la superficie del cerebro, así como con el tronco cerebral, la arteria basilar, la glándula pituitaria y el quiasma óptico. La mano de Dios no llega a tocar a la de Adán, pero entre ellos se establece un contacto “**sináptico**”. Adán ya está vivo, ya que la chispa de la vida se la está transmitiendo Dios a través de la “**hendidura sináptica**”. Debajo del brazo derecho de Dios hay un ángel con expresión triste, justamente en el área del cerebro que frecuentemente está activada en escáneres de PET cuando alguien experimenta pensamientos tristes. Dios se superpone sobre el sistema límbico, el centro emocional del cerebro y posiblemente el homólogo anatómico del alma humana. El brazo derecho de Dios se extiende hacia la corteza prefrontal, la más creativa y la más singular región del cerebro humano (Meshberger, 1990).

Las estructuras límbicas reciben proyecciones de todos los receptores sensoriales, los cuales son capaces de juzgar individualmente la respuesta apropiada a la información sensorial recibida (Joseph, 1992 y 1993). Las estructuras límbicas de importancia primaria son la amígdala, el bulbo olfativo, el hipocampo, el hipotálamo y el *septum* (Fig. 2).

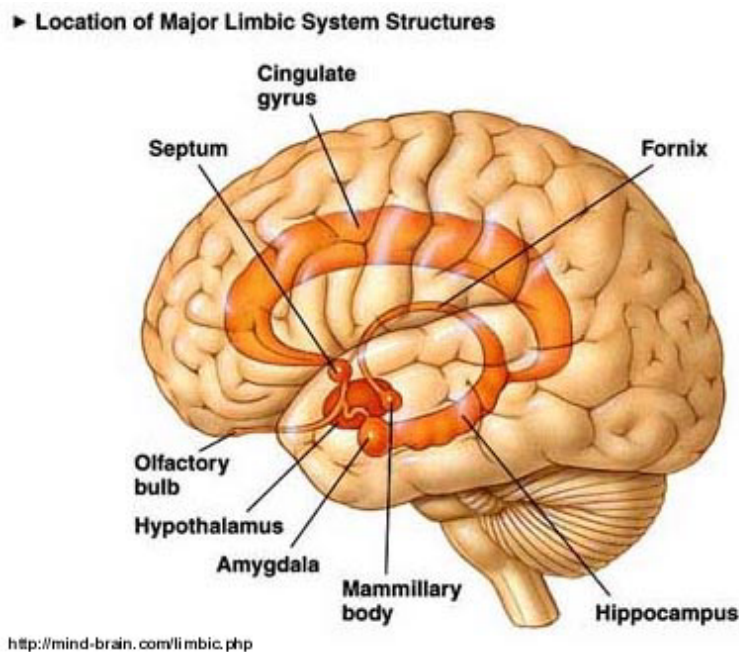


FIGURA 2. Esquema de las estructuras que componen el sistema límbico.

1.1. Amígdala

1.1.1. Organización

La amígdala en los humanos no es mayor que una almendra y se localiza en la base del cerebro (Fig. 3). Mediante una estructura llamada *uncus* interacciona con el *parahippocampus*. La amígdala está compuesta por tres asociaciones nucleares. La porción mayor del complejo amigdalino es el grupo nuclear BL, formado a su vez por el núcleo basal y por el núcleo basal accesorio. La segunda estructura consiste en el grupo Ce-M, que está formado por el núcleo central y el núcleo medial (Fig. 3). El grupo Ce-M está conectado a través de unos haces de fibras (*stria terminalis*) con el BST en la región hipotalámica. El tipo de células en el BST es idéntico al del Ce-M, por lo que se suele designar al BST como una extensión amigdaloides. La tercera estructura del complejo amigdaloides es el núcleo cortical, también conocido como amígdala olfativa ya que sus proyecciones primarias provienen del bulbo olfativo y de la corteza olfativa.

► Diagram of the Major Divisions and Connections of the Amygdala

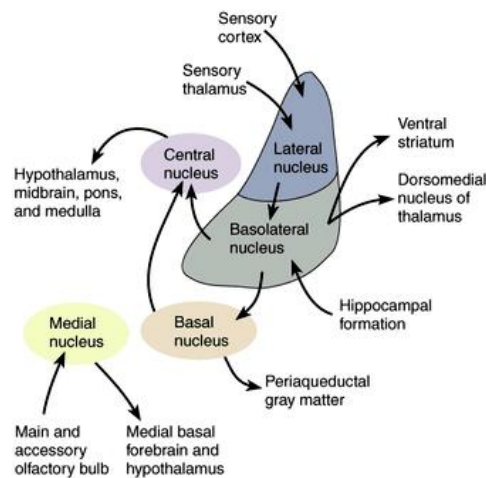


FIGURA 3. Esquema de los núcleos amigdalinos y sus conexiones. Este diagrama muestra la distribución anatómica de los núcleos amigdalinos y sus respectivas conexiones internucleares, así como las conexiones que establecen individualmente con otras regiones y estructuras cerebrales.

El mayor tipo celular encontrado en el BL son las neuronas espino-piramidales y las neuronas espino-estrelladas, estrechamente vinculadas con las células piramidales corticales predominantes en el cerebro y de naturaleza glutamatérgica. Si el tipo celular está en la base de la funcionalidad de una región cerebral, se podría entonces decir que el BL parece ser una extensión funcional de la corteza cerebral.

1.1.2. Conexiones y funcionalidad

Dos grandes haces de fibras conectan la amígdala con otras áreas cerebrales: la *stria terminalis* y la vía amigdalofugal ventral (Sarter y Markowitsch, 1984; Ono y col., 1985; Reep, 1984; Carlsen, 1989)

El Ce-M proyecta a través de la *stria terminalis* hacia el hipotálamo y a través del tracto amigdalofugal ventral hacia el tronco cerebral, donde puede influir en los aspectos hormonales y somatomotores asociados a los estados del comportamiento y emocionales (la sed, el hambre y el sexo).

Las proyecciones provenientes de la amígdala lateral y central van hacia el hipotálamo lateral a través de la vía amigdalofugal ventral. El BL está conectado directamente con muchas áreas cerebrales (corteza insular, corteza orbital, pared medial del lóbulo frontal), de las cuáles puede recibir y modular los procesos sensoriales y polisensoriales. Estas conexiones usan el glutamato y el aspartato como neurotransmisores. El BL también proyecta hacia el tálamo mediodorsal, el cuál a su vez proyecta hacia la corteza prefrontal.

Hay muchas proyecciones desde la amígdala hacia el hipocampo y viceversa. Las principales proyecciones se hacen desde el BL hacia la corteza entorrinal, la cuál proyecta a su vez hacia el hipocampo. Las proyecciones secundarias se establecen desde el núcleo basal, el cuál recibe de vuelta conexiones desde la región hipocampal CA1 y la corteza entorrinal.

Internamente, las conexiones más importantes se establecen desde el BL hacia el Ce-M, siendo las proyecciones opuestas en mucho menor grado. Esto se debe al hecho de que el BL es la puerta de entrada de la mayor parte de la información sensorial que llega a la amígdala desde el cerebro.

1.2. Bulbo Olfativo

1.2.1. Organización

El sistema olfativo comienza en el techo de la cavidad nasal, donde los receptores olfativos (células epiteliales ciliadas) son capaces de detectar miles de diferentes olores (Scott y col., 1993). Estos receptores están conectados con las células de la capa glomerular. En esta capa hay unas estructuras esféricas características de esta región cerebral: los glomérulos olfatorios rodeados de interneuronas periglomerulares.

Las neuronas de proyección del bulbo, células mitrales, se ordenan en una capa muy bien definida y envían sus dendritas hacia las capas plexiforme externa y glomerular, de donde reciben la información olfativa (Fig. 4).

Por debajo de la capa de células mitrales aparece una capa con un gran número de pequeñas interneuronas de naturaleza gabaérgica y con morfología granular, la capa granular.

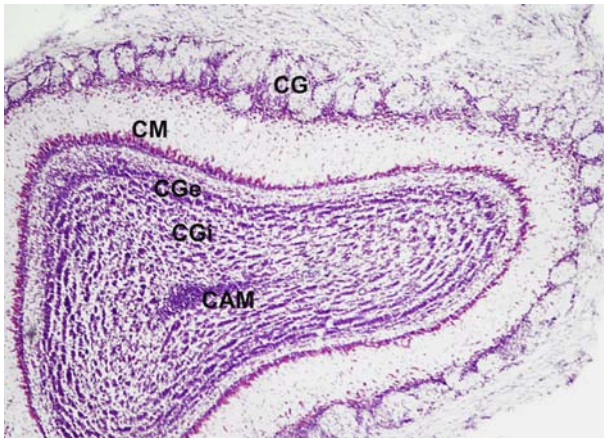


FIGURA 4. Microfotografía de una sección cerebral del bulbo olfativo de ratón teñida con la tinción del verde de metilo-pironina. La distribución en capas de los distintos extractos celulares es evidente. En la zona más externa, se encuentran la capa glomerular (CG). A medida que vamos yendo hacia el interior, encontramos la capa de células mitrales (CM), seguida de una capa ancha capa de células granulares que se subdivide en externa e interna (CGe y CGi, respectivamente). En la zona más interior, se localizan los axones provenientes de las células mitrales (CAM).

Las células mitrales proyectan sus axones hacia el cerebro vía la capa granular y siguiendo el tracto olfativo, siendo su principal diana la corteza olfativa primaria, en los lóbulos mediales temporales. Sin embargo, el sentido del olfato está fuertemente interconectado con todas las partes del sistema límbico.

1.2.2. Conexiones y funcionalidad

Los glómérulos en el bulbo olfativo son la única diana de las neuronas receptoras olfativas, siendo las únicas que conducen, vía los axones de las células mitrales, la información olfativa desde la periferia hacia el resto del cerebro (Fig. 5) (Astic y Saucier, 1986; Zvegintseva, 1986).

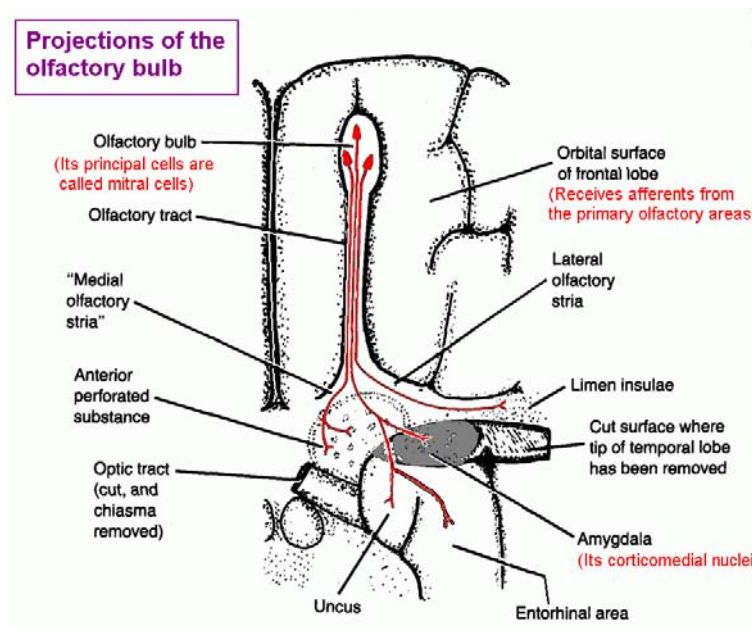


FIGURA 5. Vías olfativas centrales que proyectan en la superficie ventral del hemisferio cerebral izquierdo.

Los axones de las células mitrales forman haces, tales como el tracto olfativo lateral, que proyectan hacia el núcleo olfativo accesorio, el tubérculo olfativo, la corteza entorrinal y el complejo amigdaloides. La principal diana del tracto olfativo es la corteza piriforme. Las neuronas piramidales de la corteza piriforme responden a los olores y sus axones proyectan esa información a distintos núcleos talámicos y hipotalámicos, así como hacia el hipocampo y la amígdala. Algunas neuronas de la corteza piriforme también inervan las neuronas multimodales de la corteza orbitofrontal, las cuáles responden a los estímulos olfativos y de gustación. La información sobre los olores alcanza una variedad de regiones cerebrales, donde influyen en los comportamientos cognitivos, viscerales, emocionales y homeostáticos.

1.3. Formación hipocámpica

1.3.1. Organización

La formación hipocámpica comprende seis regiones distinguibles citoarquitectónicamente y que están conectadas de forma unidireccional: el hipocampo, formado por el hipocampo propio y el giro dentado (separados por la fisura hipocámpica); el complejo subicular, formado por el *presubiculum*, el *subiculum* y el *parasubiculum*; y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989).

El **giro dentado** está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas, *stratum granulare* (Fig. 6). Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales designados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica, *stratum moleculare*, se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, designada *hilus*, se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares, entre las cuáles las células musgosas son mayoritarias (Amaral, 1978; Ribak y col. 1985; Amaral y Witter, 1989).

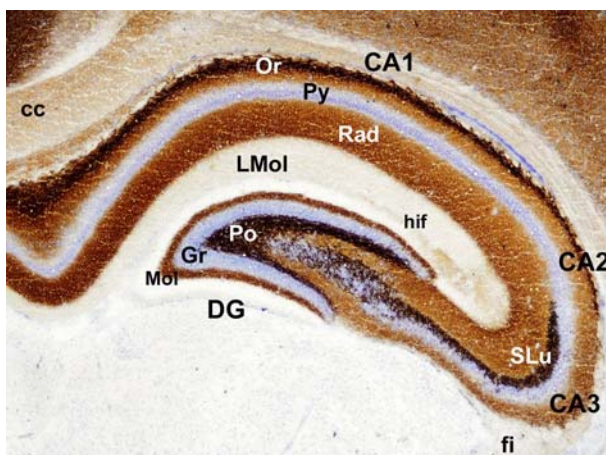


FIGURA 6. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de un ratón, teñida por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 es posible identificar una serie de estratos celulares y fibrosos: *oriens* (Or), piramidal (Py), *radiatum* (Rad) y *lacunosum moleculare* (LMol). Únicamente, en la CA3, hay otra capa denominada *stratum lucidum* (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), vemos la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po). fi, fimbria; cc, *corpus callosum*.

Entre el *stratum granulare* y el *hilus* se puede distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Altman y Das, 1965; Kaplan y Bell, 1984; Altman y Bayer, 1990; Seri y col., 2001).

El **hipocampo propio** o cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (Lorente de Nó, 1933, 1934). La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. Las distintas áreas están estratificadas (Fig. 7). Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras el *alveus* o sustancia blanca. Luego, encontramos una capa estrecha, el *stratum oriens*, formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el *stratum pyramidale*, de naturaleza glutamatérgica. A continuación, encontramos el *stratum radiatum*, formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpal) encontramos el *stratum lacunosum moleculare*, que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Amaral y Witter, 1995). Únicamente en el área CA3, entre los *stratum pyramidale* y *radiatum*, es posible encontrar un estrecho estrato acelular formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el *stratum lucidum*.

La **corteza entorrinal** se encuentra dividida en seis capas corticales bien definidas. Las capas II y III están densamente pobladas por pequeñas células que envían sus axones para otras áreas hipocámpales. Las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus axones hacia fuera de la formación hipocámpica. Las capas I y IV son acelulares.

1.3.2. Conexiones y funcionalidad

La mayor entrada de fibras en el hipocampo proviene de la corteza entorrinal (Ramón y Cajal, 1893; Lorente de Nó, 1933). Las células de las capas II y III envían sus axones hacia el giro dentado y el hipocampo propio a través de la **vía perforante** (Fig. 7) atravesando la capa de células piramidales del *subiculum*. (Amaral y Witter, 1989; Witter y Amaral, 1991).

Las neuronas piramidales de la CA3 proyectan sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de la CA1 mediante los **colaterales de Schaffer** (Fig. 7). Además, axones provenientes de la CA3 proyectan hacia todas las áreas del hipocampo propio (Ishizuka y col., 1990) mediante proyecciones comisurales, entre hemisferios y/o asociativas, en el mismo hemisferio (Frotscher y col., 1984; Laurberg y Sorensen, 1981).

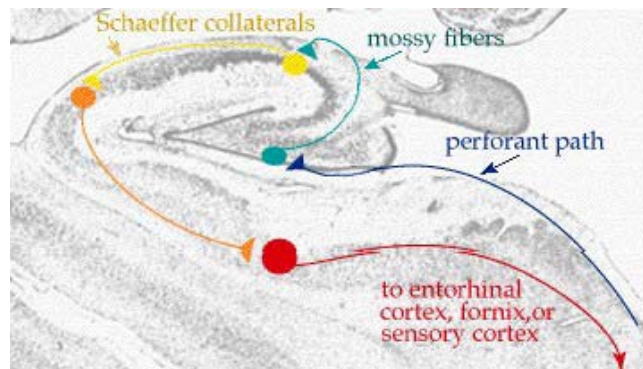


FIGURA 7. Principales vías de conexión en el la formación hipocámpica. (<http://thalamus.wustl.edu/course/limbic.html>)

Las neuronas granulares del giro dentado proyectan sus axones (Fig. 7), **fibras musgosas**, hacia las dendritas proximales de las neuronas piramidales de la CA3, atravesando el hilus (Blackstad y Kjaerheim, 1961; Amaral, 1979; Chicurel y Harris, 1992).

La formación hipocámpica posee un **circuito trisináptico excitador** que tiene inicio en la vía perforante de la corteza entorrinal cuyas proyecciones contactan con las células granulares del giro dentado. Las cuáles envían sus axones (fibras musgosas) hacia las neuronas piramidales de la CA3, y estas a su vez, envían sus axones hacia las neuronas piramidales de la CA1 mediante los colaterales de Schaffer.

La principal conexión externa de la formación hipocámpica se establece con el *septum*. Las células granulares del giro dentado no proyectan hacia fuera de la formación hipocámpica, sin embargo reciben axones provenientes del hipotálamo (Swanson, 1977; Vertes, 1992). Las neuronas de la CA3 envían sus axones fuera de la formación hipocámpica únicamente a la región septal (Amaral y Witter, 1995). Por el contrario, las neuronas de la CA1 poseen proyecciones mayoritariamente hacia la región septal, pero también hacia las cortezas frontal, retrosplenial y perirrinial, así como hacia el bulbo olfativo, la amígdala y el hipotálamo (Jay y col., 1989; Van Groen y Wyss, 1990).

1.4. Hipotálamo

1.4.1. Organización

El hipotálamo comunica directamente con la glándula pituitaria y ocupa el 2% del volumen cerebral. Está compuesto por distintos grupos celulares, así como por un elevado número de tractos de fibras, que se localizan simétricamente al tercer ventrículo (Fig. 8).

En cortes sagitales, el hipotálamo se extiende desde el quiasma óptico, la lámina *terminalis* y la comisura anterior rostralmente hacia el pedúnculo cerebral y caudalmente hacia la fosa interpeduncular. La cavidad del tercer ventrículo está en la línea media y alrededor de ella se organizan los distintos núcleos (Broadwell y Bleier, 1976; Swanson y Sawchenko, 1983;

Altman y Bayer, 1986; Swanson, 1987). La pared del tercer ventrículo está cubierta de células ependimales.

Los núcleos hipotalámicos se organizan en tres mayores subdivisiones: el hipotálamo lateral (los núcleos hipotalámicos: lateral, lateral preóptico y supraóptico), hipotálamo medial (los núcleos hipotalámicos: medial preóptico, mamilar, dorsomedial, ventromedial, anterior y posterior) y el hipotálamo periventricular (los núcleos arcuado o infundibular, periventricular, paraventricular y supraquiasmático).

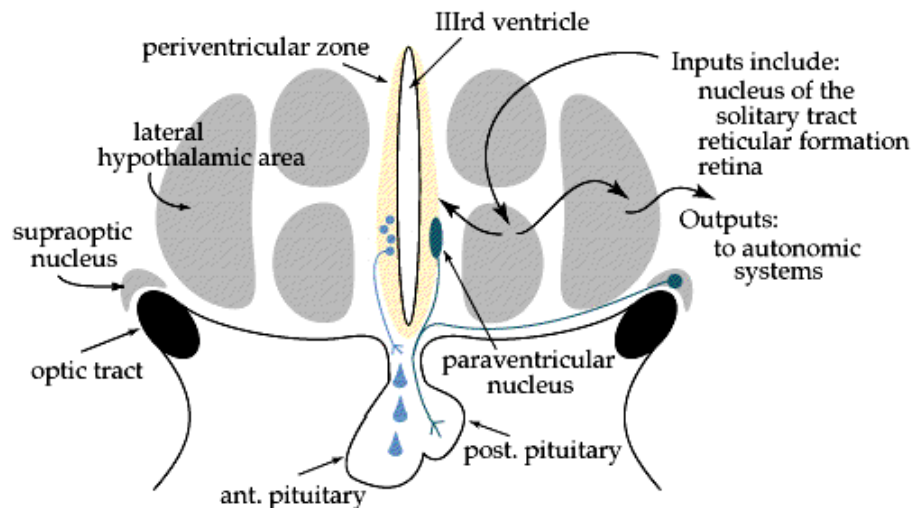


FIGURA 8. Esquema representativo de los distintos núcleos hipotalámicos, así como de las principales vías de proyección inter e intra-hipotalámicas. (<http://thalamus.wustl.edu/course/hypo>)

Los núcleos periventricular y medial, contienen una alta densidad de cuerpos neuronales organizados en grupos nucleares y que son cruciales para la regulación de la glándula pituitaria anterior y posterior. El hipotálamo medial también contiene grupos nucleares que sirven como centros de transmisión de la información neural diferenciada proveniente del sistema límbico y de los centros sensoriales autonómicos del tronco cerebral involucrados en los comportamientos homeostáticos (sed, hambre, termorregulación, ciclo de sueño y vigilia, y comportamiento sexual) (Swanson, 1987).

El hipotálamo lateral ocupa una gran parte del volumen hipotalámico y posee relativamente pocas neuronas cuando comparado con el hipotálamo medial. Sin embargo, ese número limitado de grupos nucleares se intercala dentro de un masivo sistema de fibras, el mfb. Es a través de este sistema de fibras que la información proveniente de la amígdala, de la formación hipocámpica, del *septum*, del sistema olfativo y del tronco cerebral es conducida hacia las subdivisiones medial y periventricular, delegando en el hipotálamo lateral un importante papel en los sistemas de control homeostáticos elaborados por el hipotálamo medial.

En la base de la línea media del hipotálamo (trazada por el tercer ventrículo), adyacente al núcleo arcuado, encontramos una protuberancia rica en vasos sanguíneos, que se extiende

hacia la glándula pituitaria, el *infundibulum* o eminencia media (Weindl, 1973; Oldfield y McKinley, 1995).

1.4.2. Conexiones y funcionalidad

El sistema de fibras que une el hipotálamo con el resto del cerebro es numeroso e intrincado, reflejando la importancia del hipotálamo como un centro integrador para el resto del cerebro (Ono y col., 1985; Swanson y Sawchenko, 1983; Korf, 1984; Swanson, 1987).

Debido a la complejidad del sistema de fibras hipotalámico la descripción individual de cada vía de fibras que conecta a cada grupo nuclear se hace impracticable. Por ello, se describirá apenas los principales sistemas de fibras hipotalámicos, dando especial enfoque a las conexiones con el sistema límbico y con la glándula pituitaria (Fig. 9).

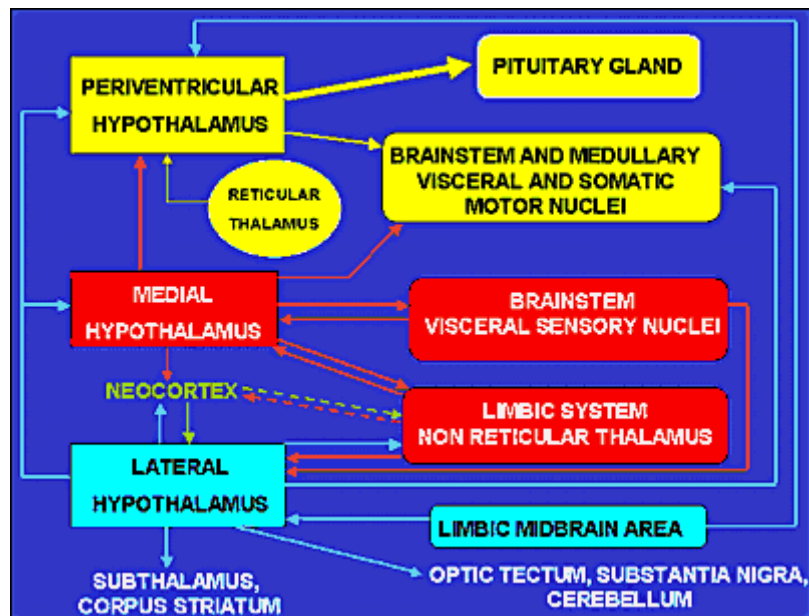


FIGURA 9. Esquema de las principales vías neurales que conectan el hipotálamo con el resto del cerebro. Los grupos con idéntico color están funcionalmente unidos.

<http://www.endotext.org/neuroendo/neuroendo3b/neuroendoframe3b.htm>

1.4.2.1. Conexiones aferentes

Las principales proyecciones que entran en el hipotálamo provienen principalmente del sistema límbico, de la formación reticular del tronco cerebral, del tálamo y subtálamo, de los ganglios basales, de la retina y de la corteza prefrontal.

Los aferentes del sistema límbico incluyen tres principales grupos de fibras: mfb, la *stria terminalis* y el *fornix*. El mfb está localizado en la parte más lateral del hipotálamo y contiene las fibras originadas por más de 50 grupos nucleares en diferentes regiones del cerebro, que incluyen las fibras descendentes de las áreas septal y olfativa, y las fibras ascendentes del complejo amigdaloides y de la sustancia *innominata*. La *stria terminalis* se origina en el

complejo amigdaloides y el *fornix* en el hipocampo. Ambas entran en el hipotálamo rostro-medial próximo a la superficie ventricular y se extienden a través de todo el hipotálamo.

Los axones de los núcleos subtalámicos y de la zona *incerta* entran directamente en el hipotálamo a través de la zona lateral de la pared del hipotálamo, mientras que los aferentes de los ganglios basales (cuerpo estriado) llegan desde el núcleo *accumbens*. Los aferentes de la retina alcanzan el hipotálamo vía el tracto retino-hipotalámico, mientras los aferentes de la corteza prefrontal llegan directamente al hipotálamo donde entran en el sistema de fibras del mfb (a través de la parte más lateral de la pared ventricular).

1.4.2.2. Conexiones eferentes

Las proyecciones originadas en el hipotálamo incluyen las vías de fibras hacia la glándula pituitaria anterior y posterior, el sistema límbico, la formación reticular del tronco cerebral, el tálamo y subtálamo, los ganglios basales, el *superior colliculi*, la sustancia negra, el cerebelo y el neocortex.

En general, las fibras eferentes provenientes del hipotálamo son recíprocas a las fibras aferentes formando un sistema de retorno, exceptuando los sistemas de fibras que proyectan hacia la glándula pituitaria y hacia los centros motores (*tectum* óptico, sustancia negra y cerebelo).

Los eferentes hacia el sistema límbico incluyen dos grandes grupos de fibras: el primero viaja en la porción más lateral del mfb, conduciendo sus proyecciones ascendentemente hacia las áreas septales y descendentemente hacia el complejo amigdalopiriforme. El segundo, proyecta hacia la amígdala a través de una vía medial posicionada junto a la superficie interna del tercer ventrículo, siguiendo el sistema de fibras de la *stria terminalis* con el BST.

Los eferentes hacia el tálamo incluyen 3 principales sistemas de fibras: el tracto mamilotálamico, que enlaza el hipotálamo posterior con el giro cingulado del sistema límbico (componente del circuito de Papez); el sistema de fibras periventricular, que proyecta hacia el tálamo medial y medio; una parte del mfb que proyecta por el pedúnculo inferior talámico hacia el núcleo talámico medial. Finalmente los eferentes hacia la corteza prefrontal siguen lateralmente dentro del mfb.

1.4.3. Sistema tuberoinfundibular hipotalámico

El sistema tuberoinfundibular hipotalámico comprende todas las neuronas en el cerebro que envían sus proyecciones axonales hacia la zona externa de la eminencia media. Mediante el marcaje retrógrado de las neuronas del sistema tuberoinfundibular se han descrito cuatro grandes regiones hipotalámicas implicadas en el sistema tuberoinfundibular: el núcleo arcuado, el núcleo periventricular, el núcleo paraventricular y la región preóptico-septal.

Dos importantes subgrupos neuronales han podido ser identificados dentro del núcleo arcuado: una población de neuronas pequeñas localizada en la porción dorsomedial (de naturaleza dopaminérgica, A12) y una población de neuronas de medio y pequeño tamaño localizada en la porción BL (que contienen dopamina, GHRH, galanina y neurotensina) (Niimi y col., 1989; Niimi y col., 1992; Merchenthaler y Lennard, 1991; Niimi y col., 1991).

Las neuronas tuberoinfundibulares de los núcleos paraventricular y periventricular proyectan hacia la eminencia media a través del área retroquiasmática o descendiendo directamente a lo largo de la pared del tercer ventrículo para entrar directamente en la eminencia media. Las proyecciones axonales hacia la zona externa de la eminencia media provienen del mfb en el hipotálamo lateral o a través de la pared del tercer ventrículo.

1.4.4. Tracto neurohipofisial hipotalámico

El tracto neurohipofisial hipotalámico define el sistema neuronal que termina en la glándula pituitaria posterior y que está bien conocido por secretar vasopresina y oxitocina en la circulación periférica para regular el balance de agua (antidiuresis), la producción de leche y las contracciones uterinas (Kawano y col., 1991). Las neuronas de este tracto llegan primeramente de la división magnocelular del núcleo paraventricular y del núcleo supraóptico (Vandesande y Dierickx, 1975). Además de oxitocina y de vasopresina, las neuronas magnocelulares del tracto neurohipofisial hipotalámico también producen y transportan numerosos otros péptidos hacia la pituitaria posterior: dinorfina, encefalina, galanina, colecistoquinina, dopamina, TRH, VIP, NPY, sustancia P, CRH y endotelina (Morris y Pow, 1993; Chowdrey y Lightman, 1993; Mikkelsen y col., 1992; Nakamura y col., 1993). Algunos neuropéptidos en la pituitaria posterior pueden actuar como hormonas tróficas (Villar y col., 1994), promoviendo la regeneración de los terminales axónicos después de una lesión o promoviendo la vascularización a través de la proliferación de las células endoteliales (Gonzalez y col., 1994).

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DEL SNC

El tejido nervioso tiene origen en el ectodermo embrionario primordial, en el cuál también se originan los derivados epidermales. La progresión del ectodermo hacia las neuronas postmitóticas diferenciadas implica la presencia de distintas fases en el desarrollo neural. Así, de acuerdo con los estudios de Cowan (1987), Herschkowitz (1988) y Rutter y Rutter (1993), el desarrollo del sistema nervioso central se puede agrupar en distintas fases:

- Inducción de la placa neural y segmentación del SNC
- Proliferación neural, precursores neurales y determinación celular
- Migración neuronal
- Diferenciación y crecimiento de axones y dendritas
- Sinaptogénesis
- Muerte neuronal (apoptosis)

En general, estas fases ocurren secuencialmente durante el desarrollo embrionario, aunque es posible que algunas fases ocurran en simultaneo (tales como la migración neuronal, la diferenciación neural y la sinaptogénesis). Además, las distintas fases de desarrollo neural presentan un carácter temporal y regional, o sea, que dependen de la región cerebral en desarrollo y pueden extenderse hacia el desarrollo postnatal tardío y la madurez.

Durante el desarrollo embrionario, los factores genéticos controlan el desarrollo y la formación de conexiones entre las neuronas. Después del nacimiento, ocurre un proceso de plasticidad sináptica, en el cuál los factores ambientales/experiencias provocan cambios en el sistema nervioso, influenciando el desarrollo de los circuitos neuronales. En la edad adulta, la experiencia altera las sinapsis nerviosas mediante el aprendizaje y la memoria. Así, los procesos que se llevan a cabo durante el desarrollo del sistema nervioso central son extremadamente complejos y cuentan con la intervención de numerosos factores tanto genéticos como ambientales (tales como las experiencias).

2.1. Inducción de la placa neural y segmentación del SNC

El desarrollo del sistema nervioso empieza con la formación de una lámina plana de células en la superficie dorsal del embrión constituida por tres capas germinativas: el ectodermo (capa más exterior, que dará origen al sistema nervioso y la piel), el mesodermo (capa de la línea media, que dará origen al músculo y esqueleto) y el endodermo (capa más interior, que dará origen a los distintos órganos interiores del organismo). Cuando el mesodermo conduce a la formación del notocordio ocurre la fase crítica del proceso de **gastrulación** (Fig. 10).

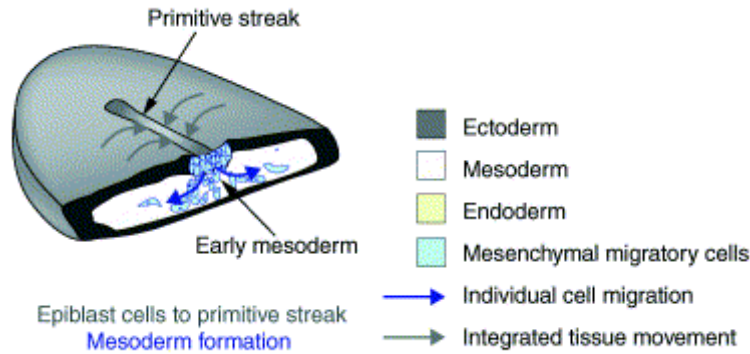


FIGURA 10. Inducción neural. La migración celular en el mesodermo temprano conduce a la formación del notocordio y de la cresta neural. Consecuentemente, movimientos celulares en el ectodermo conducen a la formación del surco primitivo, que posteriormente originará la placa neural (parcialmente modificado de Locascio & Nieto, 2001)

El notocordio envía señales inductivas hacia el ectodermo, provocando la diferenciación de las células neuroectodermales en células neurales precursoras, proceso denominado **neurulación** (Cowan, 1987). Concretamente, el notocordio libera ácido retinóico que inducirá la expresión regional de una serie de factores de transcripción (Conlon, 1995; Neiderreither y col., 1999; Ross y col., 2000; Yashiro y col., 2004). Así, se empieza a desarrollar un epitelio en columnas que recibe el nombre de **placa neural** (Fig. 11).

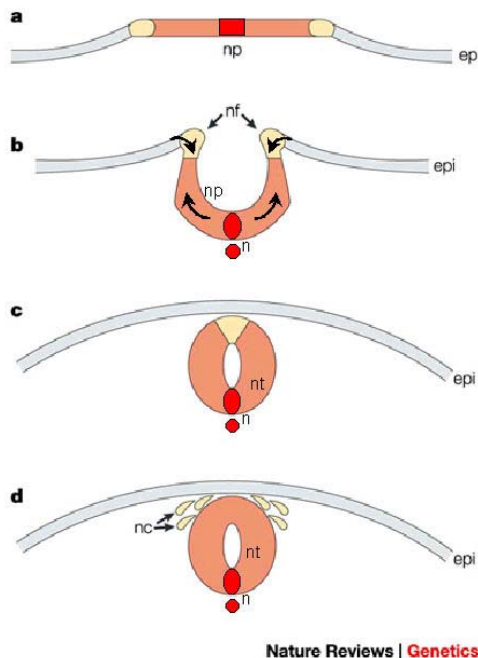


FIGURA 11. Regiones que forman la cresta neural y el notocordio durante la neurulación. (a) estadio de apertura de la placa neural (np) después de la gastrulación; (b) cierre de los pliegues neurales (nf); (c) formación del tubo neural (nt); (d) migración de la cresta neural (nc). epi, epidermis; n, notocordio; las flechas en b muestran el sentido de los movimientos inductores que forman el tubo neural. Modificado de Knecht y Bronner-Fraser, 2002.

Posteriormente, la placa neural se invagina y sus extremidades laterales se fusionan originando el **tubo neural** que subsecuentemente dará origen al cerebro y a la medula espinal. Así, el SNC de los vertebrados se desarrolla en su totalidad a partir del **neuroectodermo**. Junto al tubo neural y en una posición determinada, se desarrolla la migración de las células de la

cresta neural (de origen mesenquimal), la cuál está implicada en la formación, migración y diferenciación de muchos tipos celulares a lo largo del embrión (Fig. 12).

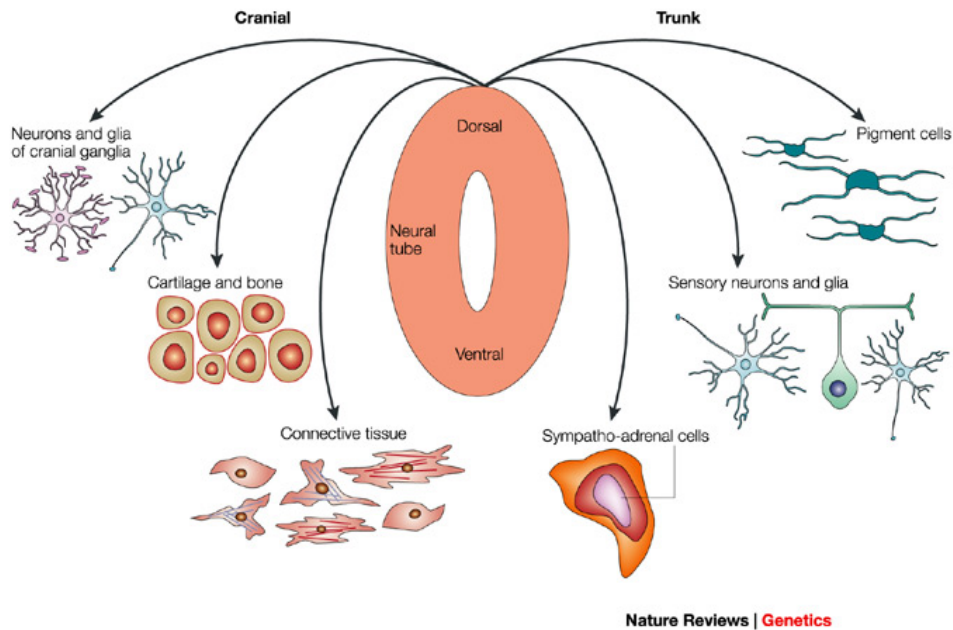


FIGURA 12. Tipos celulares originados por la cresta neural. Las células de la cresta neural migran a lo largo del embrión y se diferencian en muchos tipos celulares. Aunque las células de la cresta neural son pluripotentes, existen diferencias entre las células que se generan en los diferentes niveles anteroposteriores (Knecht y Bronner-Fraser, 2002).

Tras la formación del tubo neural, y como resultado de una serie de pliegues y constricciones, se desarrollan tres regiones vesiculares o neurómeros: prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio) y rombencéfalo (cerebro posterior) (Purves y col., 2004).

Una vez establecidas las regiones primitivas del cerebro, el proceso de **segmentación** del SNC prosigue (Fig. 13) y se desarrollan más regiones (Purves y col., 2004): el prosencéfalo primario se desarrolla en prosencéfalo secundario (vesículas telencefálicas, que más tarde originarán el hipocampo, la amígdala, los lóbulos olfativos, los ganglios basales y la corteza cerebral) y en diencefalo (vesículas ópticas y el tercer ventrículo, que más tarde originarán el epitálamo, el hipotálamo, el tálamo y la retina); el mesencéfalo dará origen al cerebro medio; y el rombencéfalo se desarrollará en metencéfalo (que originará el cerebelo y el tronco del cerebro) y mielencéfalo (que dará origen al cuarto ventrículo y a la médula espinal). La segmentación del SNC parece seguir unos patrones establecidos genéticamente, ya que se correlaciona con los patrones de expresión de ciertos factores de transcripción cuya función es el control de la identidad regional (Tabla I). Así, las vías de traducción de señal mediadas por las proteínas Wnt están implicadas en los pasos iniciales del proceso de inducción neural, posiblemente activando inductores neurales e inhibidores de las proteínas Bmp, las cuáles actúan como potentes bloqueadores de la inducción neural.

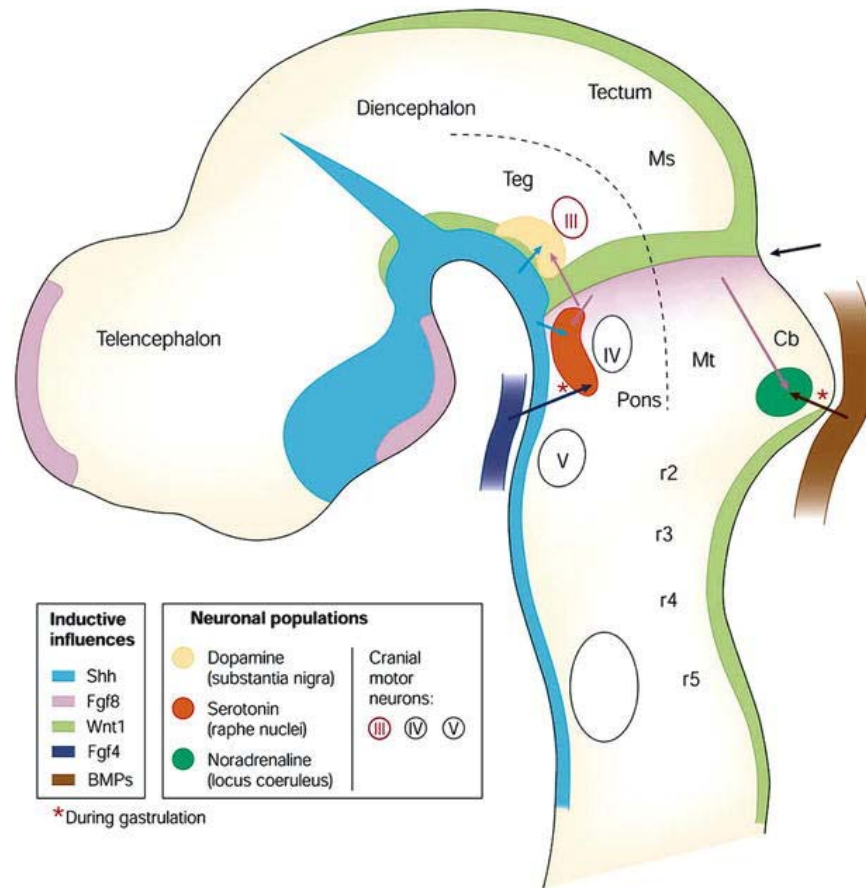


FIGURA 13. Segmentación del SNC. En estadios tempranos del desarrollo embrionario una serie de genes implicados en la determinación celular son expresados regionalmente a lo largo del tubo neural y del notocordio: *Fgf-8* (en lila); *Wnt-1* (en verde); *Shh* (en azul claro); *Fgf4* (en azul oscuro); *BMPs* (en marrón). Cb, cerebelo; Ms, mesencéfalo; mt, metencéfalo; r, rombomeros; Teg, tectum (Parcialmente modificado de Prakash y Wurst, 2004).

En los pasos posteriores, las proteínas Wnt interactúan con las proteínas Bmp para bloquear la inducción neural y/o la expansión del neuroectodermo. Las vías de señalización de las proteínas Fgf posiblemente actúan como antagonistas de las vías de señalización de las proteínas Bmp (para revisión véase Wilson y Edlund, 2001, y Bally-Cuif y Hammerschmidt, 2003).

Tabla I. Principales vías de señalización implicadas en la inducción neural

Vía de señalización	Efectores intracelulares
BMP	SMAD
	Msx
FGF	MAPK
	RAS
Wnts	β -catenina

Wilson y Edlund, 2001

2.2. Proliferación neural, precursores y determinación neural

Una vez que el tubo neural se ha desarrollado en cerebro primitivo y en médula espinal, se inicia la generación y diferenciación de las células cerebrales. El tubo neural, compuesto por una capa de células neuroepiteliales, es mitóticamente activo, de modo que las células madres de la zona ventricular empiezan a producir glioblastos y neuroblastos, que se acumulan en las zonas ventriculares y subventriculares a lo largo de todo su perímetro. Estas células de propiedades y funciones distintas se diferenciarán en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales (Schuurmans y Guillemot, 2002; Rakic, 1988), de acuerdo con los factores de transcripción y las moléculas de señalización extracelular que actúen temporal y regionalmente (Fig. 14).

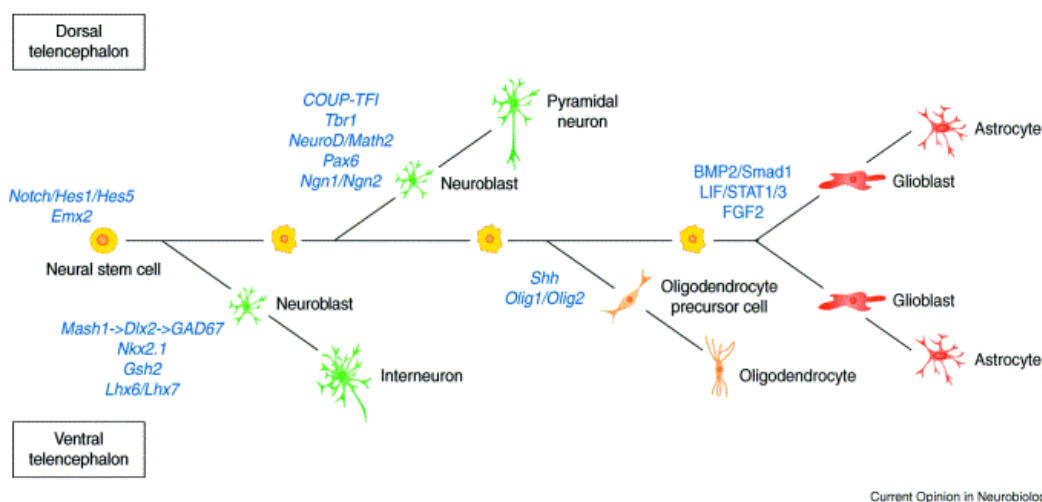


FIGURA 14. Factores intrínsecos y moléculas de señalización extracelular que están implicadas en la especificación neuronal y glial en el telencéfalo dorsal y ventral. Distintos factores están implicados en el mantenimiento del estatus de las células madre neurales (Notch, Hes, Emx...). En la parte dorsal del telencéfalo, Ngn1/Ngn2 y Pax6 actúan como determinantes neuronales, mientras que Mash1 actúa como determinante neuronal GABAérgico en la parte ventral. Shh y Olig1/Olig2 actúan en la diferenciación de los oligodendrocitos, la cual solamente ocurre en la parte ventral. BMP2/Smads, LIF/STAT y FGF2 son señales que promueven la diferenciación de los astrocitos en ambas zonas del telencéfalo (dorsal y ventral) (Schuurmans y Guillemot, 2002).

Las células precursoras se dividen en el neuroepitelio (placa neural y tubo neural) y se unen tanto a la superficie exterior como a la superficie ventricular del tubo neural (lumen) (Purves y col., 2004; Cremisi y col., 2003). El núcleo de las células se desplaza entre estos dos límites dentro de un estrecho cilindro citoplasmático (Fig. 15). Cuando las células están cerca de la superficie exterior del tubo neural, ellas entran en fase de síntesis de DNA (fase S); después los núcleos se mueven de vuelta a la superficie ventricular (fase G2), donde pierden sus conexiones hacia la superficie externa y entran en mitosis (fase M). Cuando finaliza la mitosis, las células hijas extienden sus conexiones hacia la superficie externa del tubo neural, y las nuevas células precursoras entran en quiescencia (fase G1). Al mismo tiempo, asimétricamente una célula precursora genera otra célula precursora que entra en división y una célula que no se dividirá (que es un neuroblasto) o, simétricamente, dos células precursoras. Muchos

componentes del ciclo celular se expresan en áreas cerebrales específicas, regulando el crecimiento regional.

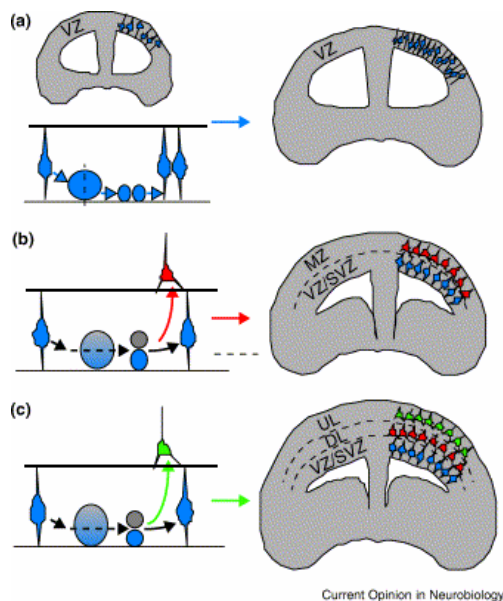


FIGURA 15. Modelo de división celular en la zona ventricular durante el desarrollo cortical. (a) Las divisiones celulares tempranas son simétricas, generando dos células hijas idénticas que se expanden por la pool de células progenitoras corticales (en azul), formando el primordio cortical. (b) Inicio de la neurogénesis, las divisiones celulares asimétricas inducen la determinación celular, dando origen a una célula hija con capacidad progenitora (en azul) y a otra célula hija postmitótica (en gris) en la pool de células progenitoras. (b, c) Diferentes tipos celulares (en rojo y en verde) son producidos en tiempos determinados, de acuerdo con las distintas poblaciones corticales. La diversidad celular dependerá del tiempo en el cual la célula se hizo postmitótica (Cremisi y col., 2003).

La neurogénesis implica proliferación y diferenciación, que en el ámbito del ciclo celular, se traduce en la re-entrada y salida de neuroblastos en el ciclo celular, la cuál regulará y determinará el tamaño del cerebro. En este sentido, el número de neuroblastos que salen del ciclo celular y se diferencian incrementa con el transcurso del desarrollo (Caviness y col., 2000). La diferenciación neural es un proceso clave en el desarrollo y se encuentra estrechamente vinculada con el ciclo celular (Fig. 16), ya que las células que salen del ciclo celular en fases tempranas exhiben unas determinadas características, mientras que las que salen en las fases tardías exhiben otras (para revisión véase Ohnuma y Harris, 2003). Por ello, debe existir una precisa coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neural, la cuál estará regulada por los factores que regulan ambos procesos (Fig. 16).

Además, las proteínas proneurales bHLH parecen ser un factor crítico en el proceso de proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales en neuronas. Los neuroblastos postmitóticos tienen que salir del ciclo celular, migrar hacia fuera del epitelio y activar la expresión de una serie de genes indicativos de la diferenciación neuronal, de entre los cuáles se encuentran uno o más genes proneurales bHLH (Schwab y col., 2000; Olson y col., 2001).

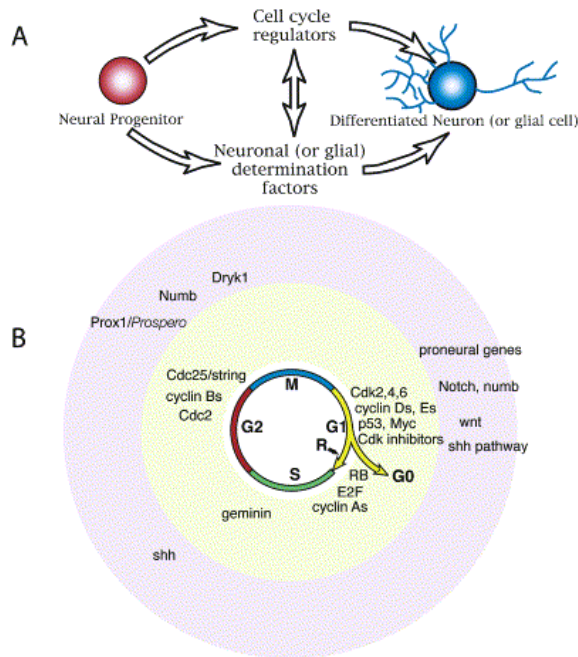


FIGURA 16. Interacción entre la regulación del ciclo celular y la determinación neural. (A) El modelo básico, representado en este sencillo diagrama, muestra como los factores reguladores del ciclo celular pueden afectar la función y la expresión de los factores de determinación, y vice-versa. (B) Los componentes del ciclo celular que influyen en la neurogénesis están representados en determinados puntos (en fondo amarillo) alrededor del esquema que ilustra el ciclo celular. Los factores de determinación neural que afectan el ciclo celular están indicados en los puntos específicos donde posiblemente actúan (en fondo naranja discontinuo) (Ohnuma y Harris, 2003)

2.3. Migración neuronal

Una vez que las células salen del ciclo celular y adquieren el estatus de postmitóticas, dejan la zona ventricular del tubo neural y migran hacia las regiones donde se van a posicionar definitivamente (Fig. 17A). La posición final que las neuronas van a ocupar está determinada por su posición en la zona generativa, así como por el momento en que la célula adquiere el carácter postmitótico (Fig. 17B). Excepcionalmente las células continúan proliferando a la vez que migran de la zona ventricular (Cowan, 1987).

La función neural depende del establecimiento preciso de las conexiones entre las neuronas y sus dianas, por lo que el desarrollo de los elementos pre y post sinápticos debe de ocurrir en el mismo lugar y al mismo tiempo. La migración a lo largo de las fibras de la glía radial ocurre siempre en regiones donde las células están organizadas en capas, tales como en la corteza cerebral (Fig. 17B), en el hipocampo (Rakic, 1971), y en algunas regiones nucleares, tales como en el tálamo y hipotálamo (Shults y col., 1990; Specht y col., 1981). Sin embargo, en algunas regiones del cerebro, especialmente en los grupos nucleares de células, las neuronas migran sin el soporte de las guías gliales. Estudios recientes (Walsh y Cepko, 1992 y 1993; Walsh y Reid, 1995; O'Rourke y col., 1997), han demostrado que la migración cortical no es únicamente radial, y que las células corticales alcanzan su destino final tanto a través de una migración radial como a través de una migración tangencial. Además, las células que migran tangencialmente se pueden diferenciar en neuronas de naturaleza GABAérgica y en células gliales.

Algunos factores como las NCAM y las N-caderinas favorecen las interacciones entre las neuronas y las células de la glía (Caviness Jr., 1989; Herschkowitz, 1988; Takeichi, 1988; Edelman, 1983). Relativamente poco se conoce sobre los complejos mecanismos que ejercen y

regulan la migración neural. Sin embargo, se sabe que cambios en el entorno celular producen importantes efectos en la diferenciación de las neuronas, y que distintas señales pueden inducir la secreción de moléculas (incluyendo péptidos hormonales), de ligandos de superficie celular y de receptores (moléculas de adhesión y otras señales) o moléculas de matriz extracelular, a lo largo de toda la ruta migratoria (Hatten, 2002).

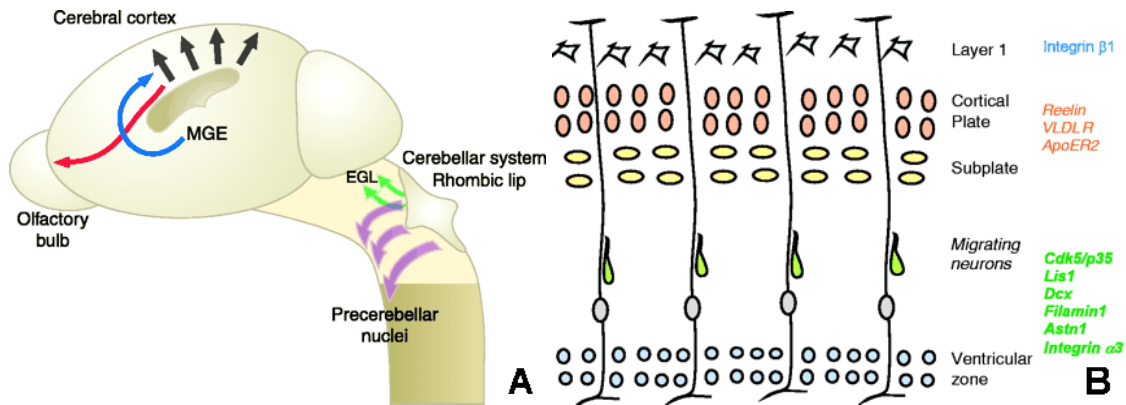


FIGURA 17. Migración neuronal. (A) Vías de migración dorsoventral y antero-posterior en las migraciones del SNC de los vertebrados. Los progenitores del cerebelo llegan a través del labio rombico a la unión entre el cerebro medio y el cerebro posterior y migran dorsalmente, por repulsión inducida por la netrina-1 y por atracción inducida por slit2 (flechas verdes). Los progenitores del núcleo precerebelar en el tronco del cerebro llegan desde las porciones más caudales del labio rombico y migran ventralmente a lo largo de la vía netrina-1 (flechas púrpura). En el cerebro anterior, las células provenientes de la eminencia glanglionar media, migran dorsalmente hacia la corteza (flecha azul), mientras que las células de la vía rostral migratoria siguen una trayectoria posterior-anterior (flecha roja). Una nueva vía migratoria surge en los vertebrados superiores, llamada vía radial (flechas negras). (B) Formación de las capas corticales. La primera capa en originarse es la capa 1 (células Caja-Retzius, en azul), la cual secreta reelina. Seguidamente, las células post-mitóticas migran a lo largo del sistema de la glía radial para formar la placa cortical (en naranja) y la subplaca 8amarillo) siguiendo la vía reelina. Cuantas más células llegan, la placa cortical genera una serie de capas (5 a 2). Estas células tardías migran a través de la glía radial (en verde) usando genes que les suministran los componentes del citoesqueleto (*Lis1*, *Dcx*, *Filamina1* y *Cdk5/p35*), o mediante uniones neurona-glía (*Astn1* e *Integrina $\alpha 3$*). La división celular continua en la zona ventricular (en azul) generando las capas corticales más superficiales (Hatten, 2002).

2.4. Diferenciación y crecimiento de axones y dendritas

La diferenciación neural puede ocurrir en simultáneo con la migración celular. Las células postmitóticas en migración empiezan a desarrollar proyecciones, las cuáles se extienden hacia las regiones donde establecerán su posición final (Auladell y col., 1995). En las neuronas existen unas zonas llamadas conos de crecimiento, de donde se originan las dendritas y los axones (Caviness Jr., 1989; Herschkowitz, 1988). Los conos de crecimiento presentan filopodios, que avanzan y se retraen en función de las características del medio, o sea de los gradientes físico-químicos del medio.

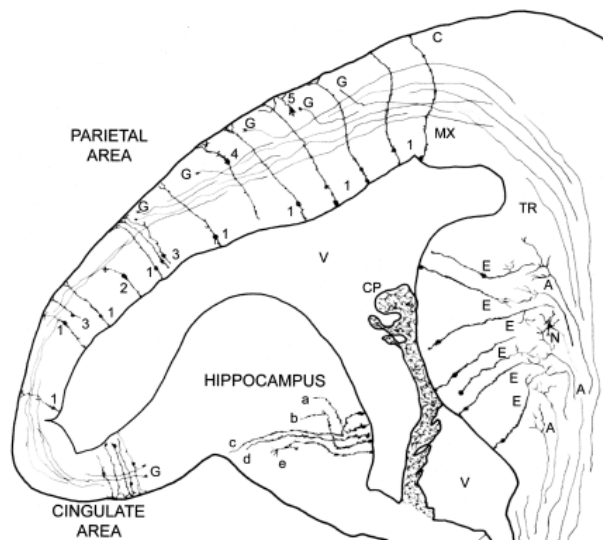
Los mecanismos de diferenciación y crecimiento axonal no están aún bien elucidados, ya que en los mecanismos de diferenciación pueden estar implicadas más de cien mil proteínas diferentes. Sin embargo, en la diferenciación neuronal se ha descrito que los neuropéptidos (somatostatina, colecistoquinina, VIP o la sustancia P), los componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina y colágeno), los factores tróficos (NGF, EGF, FGF, IGF,...),

los neurotransmisores (serotonina, dopamina o acetilcolina) y las interacciones con las células gliales pueden estar estrechamente vinculados con los fenómenos de elongación axónica e interconexión celular (Hatten y Mason, 1990; Ivins y Pittman, 1989; Vernadakis, 1988).

El proceso de diferenciación neuronal está favorecido por la insulina y los factores de crecimiento insulínico (IGF-1 e IGF-2). La insulina estimula la síntesis de proteínas, favorece la producción de neuritas y la adquisición de la capacidad de neurotransmisión (Baskin y col., 1987).

2.5. Sinaptogénesis

La sinaptogénesis es un proceso tardío de la diferenciación neuronal, aunque algunas sinapsis aparecen durante fases más tempranas (Coviness Jr., 1989). Cuando las neuronas alcanzan su posición final, empiezan a desarrollar prolongaciones dendríticas axónicas con las cuáles reciben contactos de otras células (Fig. 18). Las prolongaciones axónicas se ven guiadas por factores mecánicos y químicos (Bradford, 1988; Song y Poo, 2001).



(Reimpreso de Morest 1970)

FIGURA 18. Impregnación rápida de Golgi de una sección embrionaria del cerebro anterior.

Las células dibujadas se han seleccionado para ilustrar los cambios estructurales de las proyecciones nerviosas de los precursores mientras se desarrolla la placa cortical. La pared del ventrículo (v), en la parte menos desarrollada del área parietal, se encuentra formada exclusivamente por las células primitivas de neuroepitelio (células 1), las cuáles se extienden sus proyecciones entre los límites de las capas interna y externa. Los núcleos están en varias etapas de desplazamiento. Las células proliferan y la placa cortical (c) comienza a formarse, los procesos intermitóticos y algunas células postmitóticas, crecen en la zona (célula 2) y el núcleo se desplaza con los procesos (células 2, 3). En fases más posteriores, el gradiente de células (1) junto al lumen del ventrículo crece. Algunas de las células pierden su contacto hacia capa interna, mientras que el cuerpo de la célula se desplaza en la placa cortical (célula 4). Finalmente, las neuronas postmigratorias (célula 5) comienzan a formar dendritas y axones, los cuáles interactúan con los conos de crecimiento de los aferentes talámicos (TR). Al tálamo también llegan los axones en crecimiento (E) de los neuroblastos en migración desde la eminencia ganglionar (parcialmente modificado de Morest y Silver, 2003).

La mayoría de las sinapsis consisten en una región axónica presináptica, una región receptora en una dendrita postsináptica, y entre ambas una estrecha hendidura sináptica (Kalil, 1990). La forma en que las neuronas alcanzan sus dianas y establecen sus conexiones precisas durante el desarrollo se basa: **(a)** en el **reconocimiento molecular** donde cada neurona tiene especificada una identidad molecular que le permite ser reconocida por otras neuronas que establecen contacto con ella; y **(b)** en la **actividad neuronal**, la cuál sugiere que el patrón de actividad neuronal generado por estímulos externos durante el desarrollo podría cambiar las

conexiones, basándose en el principio de que las conexiones que se utilizan quedan asentadas y las menos usadas son eliminadas (Purves y col., 2004; Gomez, 2004; Munno y Syed, 2003; Goodman y Shatz, 1993). Estas conexiones están determinadas en gran parte por factores genéticos, y una vez establecidas permanecen estables. Sin embargo, las interacciones con el medio durante el desarrollo postnatal pueden provocar cambios plásticos en las neuronas y sus conexiones. También, pueden ocurrir cambios de conectividad o de plasticidad durante el aprendizaje o después de un daño cerebral.

2.6. Muerte neuronal (apoptosis)

Durante el desarrollo del SNC se genera un número excesivo de neuronas y conexiones siendo selectivamente eliminadas las neuronas que no establecieron correctamente sus conexiones o que no llegaron a establecer conexiones sinápticas con sus respectivas dianas (Oppenheim y col., 1982; Oppenheim, 1985; Bradford, 1988). Según la descripción de Cowan (1987), una muerte celular extensiva reduce a la mitad el número de neuronas originadas en las fases previas. Se piensa que esta pérdida sirve para afinar la función neuronal y parece estar asociada con un incremento en la especialización de las funciones cerebrales en diferentes regiones del cerebro. La apoptosis es esencial para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares, y ocurre de manera natural durante el desarrollo del SNC. De acuerdo con la **teoría trófica**, los factores tróficos producidos en las células diana protegen las proyecciones neuronales de la muerte celular programada (Barde, 1989; Oppenheim, 1991). En este sentido, las neuronas necesitan de una serie de factores de crecimiento para sobrevivir. Se han descrito muchos posibles factores de crecimiento, siendo los más conocidos el factor de crecimiento nervioso, NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF, NT-3 y IGI-1 (Jones y Reichardt, 1990; Hernández-Sánchez y col., 1995; Frade y col., 1997; Li y Bernd, 1999; Díaz y col., 2000), los cuáles promueven la proliferación y diferenciación celular. Estos factores de crecimiento se encuentran en el SNC en concentraciones muy bajas, lo que hace con que las neuronas compitan entre sí por ellos y al no conseguirlos mueren por apoptosis (Thoenen y Barde, 1980; Thoenen y Edgar, 1985). La muerte de las neuronas presinápticas puede servir para una variedad de funciones biológicas entre las cuáles se puede incluir la regulación poblacional de células neurales precursoras que son necesarias para la propia morfogénesis cerebral (Haydar y col., 1999), seleccionando las poblaciones regionales apropiadas y/o los fenotipos neuronales específicos (Voyvodic, 1996), y eliminando las células con anomalías genéticas (Chun y Schatz, 1999). Además, el daño de las moléculas de DNA en las células precursoras puede afectar severamente el desarrollo cerebral. Recientemente, se ha reconocido la importancia de la apoptosis de las células precursoras neurales durante el desarrollo (Fig. 19) (Cecconi y col., 1998; Roth y col., 2000; Zaidi y col., 2001).

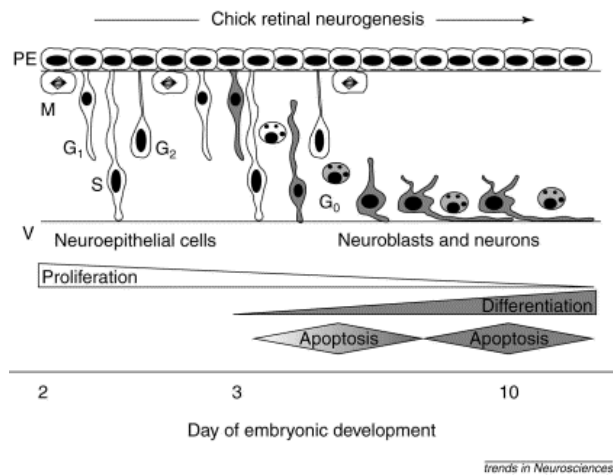


FIGURA 19. La muerte temprana de la célula es un proceso genuino de la neurogénesis. En la neurogénesis embrionaria de la retina de pollo, se solapan la fase de muerte de los precursores neurales y la fase de muerte de las células ganglionares. Las células neuroepiteliales en proliferación (células blancas que completan un ciclo a través de fases M, G₁, S, G₂ y M), salen del ciclo celular para convertirse en neuroblastos y en neuronas (células grises en G₀, migrando a su capa definitiva; para simplificar solo se han representado las células ganglionares, aunque otros tipos neuronales y gliales se generan durante el periodo demostrado). La proliferación de células neuroepiteliales disminuye mientras transcurre la neurogenesis, simultáneamente aumenta la diferenciación neuronal y glial; ambos procesos coexisten el uno con el otro, así como con los procesos de muerte celular. La muerte neuronal clásica afecta a las células ganglionares diferenciadas, con un pico, aproximadamente, en el día 10 embrionario (E10). Anteriormente, una fase distinta de apoptosis ocurre, con un pico en E5, y afecta más células que las que están completamente diferenciadas, tales como los precursores neurales. En esta fase temprana podrían solaparse varios tipos de muerte celular. PE, epitelio pigmentario; V, superficie vitral (De la Rosa y De Pablo, 2000).

En este sentido, D'Sa-Eipper y col. (2001) han descrito distintas moléculas clave en la vías que regulan la muerte celular de los precursores neurales, mostrando que esta ocurre en distintas fases del desarrollo cerebral, afectando secuencialmente las células precursoras neurales, las neuronas inmaduras y las neuronas sinápticamente activas. Estimaciones basadas en la tasa de neurogenesis, de acuerdo con los tiempos del ciclo celular, sugieren que 50 al 70% del total de las células precursoras neurales pueden morir durante la proliferación (Caviness y col., 1995). Además, ratones knockout para proteínas implicadas en la inducción de las vías apoptóticas muestran hiperplasia en las fases tempranas de desarrollo, lo que demuestra la magnitud de la muerte neural embrionaria (Cecconi y col., 1998; Roth y col., 2000; Zaidi y col., 2001).

Morfológica y bioquímicamente, la apoptosis se caracteriza por una serie de alteraciones esencialmente nucleares pero también citoplasmáticas, tales como la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA, la desorganización del citoesqueleto, la formación de cuerpos apoptóticos, la activación de caspasas, la presencia de marcadores fagocíticos en la superficie celular, etc.

La apoptosis esta regulada por la actividad de un conjunto de genes (Fig. 20), entre los cuáles destacan las caspasas, el factor Apaf-1, y los miembros de la familia Bcl-2/Bcl-X_L/Bax (Nicholson, 1999; Zou y col., 1997; Korsmeyer, 1999). Resumidamente, las proteínas Bcl-X_L y Bax regulan la liberación mitocondrial del citocromo c, desencadenando el estímulo apoptótico (Finucane y col., 1999). El citocromo c citosólico se une a Apaf-1 (en presencia de ATP o dATP), propagándose la señal apoptótica y activando la caspasa-9 (Zou y col., 1999). Consecuentemente, la caspasa-9 activa la caspasa-3, la cuál inicia una secuencia de rupturas proteolíticas en las dianas intracelulares que conducen a los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Woo y col., 1998).

Los estudios de supresión génica de algunos de los genes implicados en la muerte celular programada, han mostrado la importancia y la necesidad de la apoptosis en las células neurales precursoras (morfogénesis cerebral) y en la neuronas inmaduras (histogénesis neuronal) durante el desarrollo neural normal de los vertebrados. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan estos procesos son aún desconocidos (de la Rosa y de Pablo, 2000).

2.6.1. Implicación de los miembros de la familia Bcl-2 en la apoptosis embrionaria

La proteína Bcl-X_L es un miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2 que se encuentra altamente expresado durante el desarrollo del sistema nervioso central (González-García y col., 1994). Los ratones mutantes homocigóticos (*bcl-x*^{-/-}) mueren antes del día embrionario 13.5 (E13.5), presentando una alta incidencia de muerte celular apoptótica, restringida a las zonas intermedia y marginal del cerebro, las cuales contienen neuronas postmitóticas inmaduras (Motoyama y col., 1995). Además, ratones doble mutantes para las proteínas *bcl-x*^{-/-} y *bcl-2*^{-/-} aún presentan un fenotipo más acentuado, lo que apuntaría a una función anti-apoptótica conjunta entre estos dos genes (Shindler y col., 1998). Por otra parte, los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como la proteína Bax, interactúan con los miembros anti-apoptóticos para regular la liberación del citocromo C mitocondrial y la muerte celular.

La proteína Bax, al igual que las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L, se expresa altamente en el cerebro embrionario y adulto, y es capaz de heterodimerizar con Bcl-X_L (Oltvai y col., 1993; Krajewski y col., 1994; Sedlak y col., 1995). Los animales mutantes para Bax presentan una menor apoptosis en las neuronas inmaduras (tal como la proteína Bcl-X_L) de las zonas intermedia y marginal (Shindler y col., 1997). Estudios con animales doblemente deficientes en las proteínas Bax y Bcl-X_L, (*bax*^{-/-} /*bcl-x*^{-/-}) han permitido demostrar que la interacción entre ambos genes no es crítica para revertir los efectos provocados por la deficiencia en la proteína Bcl-X_L (Shindler y col., 1997), aunque juega un papel importante en la regulación de la supervivencia neuronal, ya que estos animales doblemente mutados presentan una reducción notable en la muerte neuronal.

2.6.2. Implicación de las caspasas y de la Apaf-1 en la apoptosis embrionaria

La función de las proteínas Bax y Bcl-X_L es controlada por el factor Apaf-1, y por las proteínas caspasas 9 y 3. La activación de las caspasas conduce a la muerte celular por ruptura proteolítica de las proteínas implicadas en la reparación celular, en la homeostasis y en citoesqueleto. La caspasa-3 también se encuentra altamente expresada durante el desarrollo embrionario en el cerebro y su activación regula la apoptosis neuronal. La caspasa-3 ha sido inmunodetectada en las células de la zona intermedia del cerebro embrionario y ocasionalmente dentro de la zona ventricular, la cuál posee actividad mitótica (Roth y col., 2000).

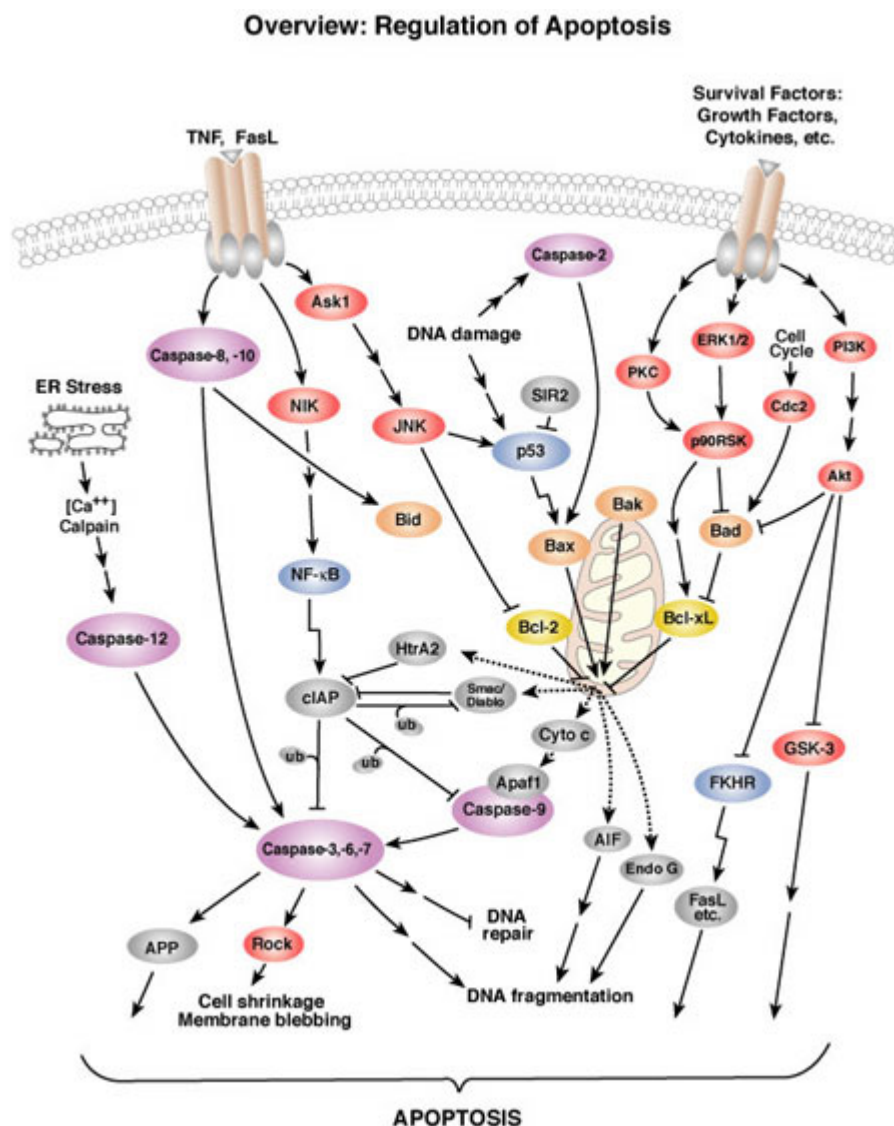


FIGURA 20. Esquema general de las principales vías de la muerte celular programada (apoptosis). (http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Ovrwv_apop.asp)

Estudios de expresión génica, han mostrado que la caspasa-3 se encuentra sobre-expresada en los ratones deficientes en la proteína Bcl-X_L y reducida en los animales deficientes en la proteína Bax (Roth y D'Sa, 2001). Sugiriendo que la activación de la caspasa-3 en los procesos de apoptosis neuronal durante el desarrollo está asociada con las proteínas Bax y Bcl-

X_L. Por otra parte, la activación de la caspasa-3 es dependiente de la expresión del factor Apaf-1 y de la caspasa-9, ya que no se encuentra activada en los ratones deficientes en el factor Apaf-1 (apaf-1^{-/-}) o en la caspasa-9 (caspasa-9^{-/-}) (Cecconi y col., 1998; Roth y col., 2000; Zaidi y col., 2001). Además, la deficiencia en cualquier de estas moléculas pro-apoptóticas (apaf-1, caspasa-9 o caspasa-3), al igual que con los animales deficientes en la proteína bax, evita la activación de la caspasa-3 y la muerte apoptótica en las neuronas inmaduras de los embriones deficientes en la proteína Bcl-X_L. Por tanto, existe una clara relación entre los miembros de la familia Bcl-2, Apaf-1, y las caspasas 3 y 9, en la muerte celular programada. Sin embargo, el fenotipo de los embriones deficientes en las proteínas Apaf1, caspasa-3 y caspasa-9 es ligeramente diferente al de los embriones deficientes en la proteína bax, ya que muestran niveles bajos de apoptosis en regiones cerebrales implicadas en la morfogénesis cerebral, tales como la lámina *terminalis*, y exhiben una marcada hiperplasia en la zona ventricular embrionaria. Algunos animales mutantes severamente afectados presentan duplicación de estructuras neuronales y un número excesivo de células en el espacio intraventricular, mientras que otros presentan expansión telencefálica y circunvoluciones corticales rudimentarias. Ninguno de estos aspectos han sido observados en los animales deficientes en la proteína bax. Por tanto, las proteínas Apaf-1, caspasa-9 y caspasa-3, además de su función pro-apoptótica en las neuronas inmaduras, también desempeñan un papel importante en la regulación de la muerte celular programada de las células precursoras neurales, independientemente de la función de la proteína bax (Kuan y col., 2000). Recientemente, se ha visto que otras caspasas también pueden estar implicadas en el desarrollo cerebral, tales como las caspasas 2, 6 y 8.

2.6.3. Implicación del AIF en la apoptosis embrionaria

Recientemente, se ha descrito una nueva vía de muerte celular apoptótica que es independiente de las caspasas, y en la cuál está implicada la liberación mitocondrial del AIF (Susin y col., 1999; Lipton y Bossy-Wetzel, 2002). El estrés oxidativo o excitotóxico, así como un daño en las moléculas del DNA, conducen a la liberación mitocondrial de AIF. Consecuentemente, AIF entra en el núcleo, donde se une al DNA promoviendo la condensación de la cromatina y, a través de una compleja serie de eventos, la muerte celular apoptótica (Yu y col., 2002). Además, la muerte celular inducida por AIF parece ser resistente al tratamiento con inhibidores de las caspasas pero es bloqueada parcialmente por Bcl-2. Por otra parte, AIF se encuentra altamente expresado en todos los órganos en desarrollo durante la embriogénesis, concretamente en las células precursoras (Sanders y Parker, 2002; Joza y col., 2001). Animales deficientes en *aif*, presentan un incremento en la proliferación celular embrionaria, lo cuál sugiere su importancia en la morfogénesis de los organismos multicelulares (Joza y col., 2001).

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DEL SISTEMA LÍMBICO

La precisa migración neuronal, así como la formación de billones de sinapsis, no puede ser controlada genéticamente (Rutter y Rutter, 1993). La información sensorial parece jugar un papel conductor en la organización del desarrollo neuronal, y la ausencia de experiencias relevantes parece tener un efecto de retraso en el desarrollo cerebral. A diferencia de muchos otros órganos, las experiencias cerebrales influyen en el propio desarrollo cerebral especialmente durante el periodo prenatal y en el primer año de vida (Rutter y Rutter, 1993).

En la evolución del cerebro, los centros más bajos, anatómicamente, se diferencian primero y los centros más altos posteriormente. Así, el sistema límbico es uno de los primeros en formarse (entre los días embrionarios 11 y 12) aunque el desarrollo y maduración de cada una de las estructuras que lo componen es temporalmente diferencial. En un embrión de 14 días es posible distinguir el primordium del hipotálamo, del hipocampo y de la amígdala, así como los lóbulos olfativos (Stroer, 1956; Coggeshall, 1964). A partir del día embrionario 16, ya es posible distinguir algunos núcleos hipotalámicos y amigdalinos, mientras que el patrón laminar del hipocampo se empezará a desarrollar en el día embrionario 17, en el cuál comienza el proceso de migración y diferenciación de las distintas capas, y proseguirá durante el desarrollo postnatal.

El hipotálamo ya es funcional en los recién nacidos, contrariamente a lo que ocurre con las otras áreas límbicas, siendo por ello biológicamente el más primitivo y puro aspecto de la psique (Joseph, 1992). Los recién nacidos expresan sus emociones más fuertes a través del hipotálamo. Consecuentemente, las emociones exhibidas son ampliamente indirectas e inconexas con los aspectos del entorno exterior, traduciéndose en sentimientos fundamentales, tales como la aversión, la ira, el hambre, la sed, el placer y el desplacer. Con la maduración del hipotálamo, empiezan a generarse nuevas emociones que van siendo cada vez más complejas, tales como el miedo, la rabia y la felicidad (Rutter y Rutter, 1993). El sistema límbico es el centro del desarrollo emocional. Cuanto más intenso es el despertar emocional, más fuerte son las conexiones en el cerebro.

Durante los primeros meses de vida, la maduración de otras estructuras del sistema límbico, concretamente el hipocampo y la amígdala, hacen posible que el niño empiece a monitorizar el mundo exterior, asociando los eventos que ocurren externamente y registrándolos, así como recordando objetos, hechos y personas, y asociándolos con el placer o el desplacer (Mahoney, 1991; Joseph, 1992 y 1993). El hipocampo está asociado con la formación del aprendizaje y de la memoria, y sus funciones se complementan e interactúan con la amígdala generando una imagen emocional (Joseph, 1992). Se cree que esta asociación hipocampo-amígdala está involucrada en la atención y en el procesamiento de la información

verbal, en el hemisferio izquierdo, y en el aprendizaje y en la memoria de las motivaciones, del tacto, del olfato, de las expresiones no verbales, así como de la información emocional y del entorno, en el hemisferio derecho. Durante este período, el pensamiento de un niño es extremadamente egocéntrico. Los niños ven el mundo solamente desde su propia perspectiva, centrándose en sí mismos y teniendo dificultad en comprender otros puntos de vista. Por ello, no comprenden las sensaciones o las necesidades de otras personas. En el desarrollo del niño, la formación de la personalidad y la adaptación social son quizás los aspectos más incomprensibles.

Por tanto, durante los primeros meses/años de vida, y con la maduración de la amígdala y del hipocampo, los niños son capaces de orientar y atender selectivamente los impulsos y emociones generados por el hipotálamo.

En la pubertad y en la adolescencia se sobreponen e interactúan dos mecanismos neurobiológicos distintos: la maduración del comportamiento (sistema nervioso) y la maduración gonadal (sistema neuroendocrino), los cuáles marcan la transición del niño hacia la vida adulta. La pubertad consiste en la activación del eje hipotalámico-pituitaria-gonadal que culmina con la maduración de los órganos sexuales, mientras que la adolescencia consiste en la maduración de los comportamientos cognitivos y sociales característicos del adulto (Sisk y Foster, 2004). La complejidad de los comportamientos sociales, así como de los comportamientos sexuales, conlleva a la necesidad neurobiológica de afinar la red neural del individuo. Simultáneamente, en la adolescencia los núcleos septales y la corteza prefrontal maduran, ejerciendo una función inhibitoria más refinada sobre las emociones inicialmente generadas por el hipotálamo, y moduladas por la amígdala y el hipocampo. Con ello, los adolescentes ya pueden controlar las respuestas emocionales basadas en la información previa (el registro de sucesos anteriores), así como ya presentan la capacidad de anticiparse a experiencias futuras (Joseph, 1992).

Las emociones y el pensamiento son virtualmente inseparables, y se desarrollan de un modo interdependiente (Mahoney, 1991). Por tanto, con la maduración sexual, el desarrollo de la habilidad cognitiva, el aumento de la memoria, y el crecimiento de las asociaciones, los adolescentes desarrollan respuestas emocionales cada vez más complejas y que crean las bases de su comportamiento emocional, social y sexual.

CAPÍTULO 4

NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

Al contrario de lo que ocurre en otros órganos, el cerebro adulto, en general, no tiene capacidad proliferativa y, por tanto, es incapaz de producir nuevas células y remplazar las que mueren naturalmente por envejecimiento o por lesiones. Sin embargo, existen al menos dos áreas cerebrales que presentan actividad mitótica en el adulto: el sistema olfativo (SVZ) y el giro dentado (SGZ) (Fig. 21).

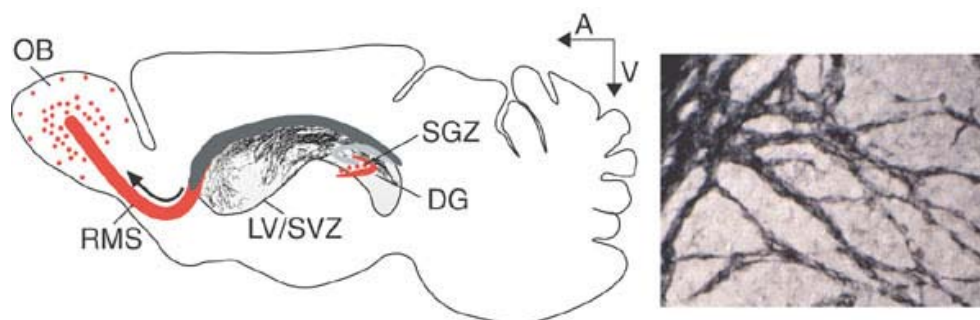


FIGURA 21. Neurogénesis en el cerebro adulto de mamífero. Esquema de una sección sagital de cerebro de ratón a lo largo del ventrículo lateral (LV) y donde se pueden observar dos zonas principales de neurogénesis: la SVZ y la SGZ de la formación hipocámpica. La SVZ contiene una extensa red de cadenas de neuronas positivas al “polysialylated neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM”, las cuáles migran tangencialmente en dirección al bulbo olfativo (en el esquema, líneas negras en el LV; en la microfotografía, cadenas inmunodetectadas para la PSA-NCAM en el LV). Contrariamente, las neuronas en el giro dentado (DG) son originadas localmente en la SGZ. OB, bulbo olfativo; RMS, vía migratoria rostral; A, anterior; V, ventral. Doetsch, 2003.

Durante la evolución, la tasa de neurogénesis en el cerebro adulto ha disminuido mientras que ha incrementado la complejidad cerebral. Así, los vertebrados inferiores pueden regenerar tejidos y/o regiones enteras del cerebro, mientras que en los vertebrados superiores esta regeneración está confinada a pocas zonas cerebrales (Kempermann y col., 2004). Estudios llevados a cabo por Altman (1962, 1963, 1966, 1969a y 1969b) y Altman y Das (1964, 1965, 1966 y 1967) a mediados del siglo XX, permitieron demostrar la existencia de neurogénesis en algunas estructuras del cerebro postnatal y adulto de la rata y del gato, tales como el sistema olfativo, el hipocampo y la corteza cerebral. Estudios más recientes en primates y en rata han permitido reforzar estas observaciones (Corotto y col., 1993; Gould y col., 1998 y 2000; Mirescu y col., 2004; Bedard y Parent, 2004; Kempermann y col., 2004; Doetsch, 2003; Alvarez-Buylla y Lim, 2004). Hay la posibilidad de que existan todavía otras regiones neurogénicas en el cerebro adulto (Bedard y col., 2002; Bernier y col., 2002).

Las células con actividad mitótica en el cerebro adulto pueden ser divididas en 2 grupos: las células madre, con un ciclo celular superior a 28 días, y los progenitores neurales, con un ciclo celular de 12 horas (Morshead y van der Kooy, 1992; Morshead y col., 1994). Las células madre tienen la capacidad de poder generar continuamente nuevas células madre o de generar células precursoras, las cuáles al perder su capacidad mitogénica originarán neuronas (en una

fase más previa), astrocitos y oligodendrocitos (en los estadios más tardíos) (Reynolds y Weiss, 1992; Lois y Alvarez-Buylla, 1993). Las células madre del SNC y las células neuroepiteliales presentan inmunoreactividad, a la proteína nestina (la cuál reconoce la proteína de la clase tipo VI de los filamentos intermedios, que se expresa en las células madre/progenitoras en el neuroepitelio más primitivo), tanto *in vivo* como *in vitro* (Frederiksen y McKay, 1988). Curiosamente, las células madre también han sido aisladas y cultivadas de tejidos cerebrales *postmortem* de humanos adultos (Laywell y col., 1999; Roisen y col., 2001; Palmer y col., 2001).

Por otra parte, las células madre embrionarias son pluripotentes, o sea, tienen la capacidad de originar todos los tipos celulares en el organismo en desarrollo, mientras que las células madre del cerebro adulto pierden parte de esta capacidad, siendo multipotentes (Price y Williams, 2001; Tsai y col., 2002; Vescovi y col., 2002; Wulf y col., 2001).

La mayor controversia ha sido determinar la naturaleza de las células precursoras en las zonas germinativas del cerebro adulto (Fig. 22). Hay dos teorías conflictivas sobre el origen celular de las células madre en la SVZ: (1) de células endodiales que expresan nestina (proteína del filamento intermedio) (Johansson y col., 1999; Chiasson y col., 1999); (2) de células del tipo astrocítico (GFAP+ y nestina+), también llamadas células del tipo B (Doetsch y col., 1999; Laywell y col., 2000). Los estudios más recientes refuerzan esta última teoría, tanto en la SVZ como en la SGZ, ya que muestran que una población específica de glía puede originar los precursores neurales, los cuáles a su vez podrán originar tanto neuronas como glía (Álvarez-Buylla y col., 2001; Spassky y col., 2005).

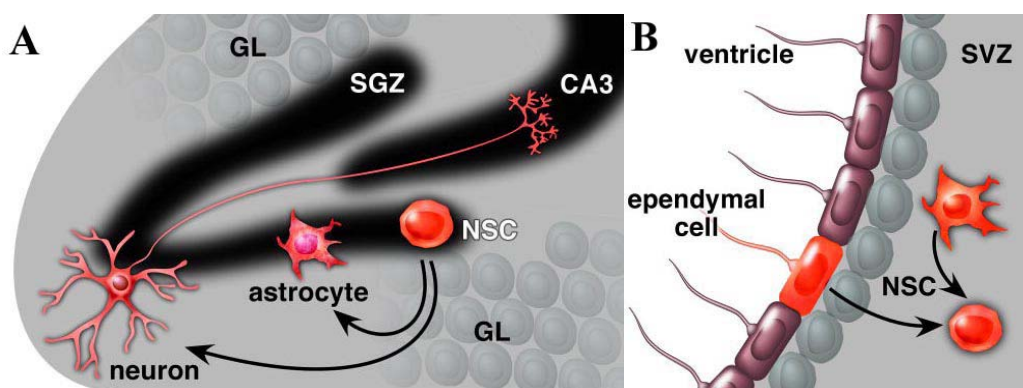


FIGURA 22. Origen de las células madre en la SGZ y en la SVZ. (A) Las células madre tendrían origen en células de tipo astrocítico de la SGZ, concretamente astrocitos radiales. (B) Hay dos teorías, en una las células madre (NSC, neural stem cells) son originadas a partir de células endodiales, mientras que en la otra las células madre se originan de células de tipo astrocítico. Parcialmente modificado de Taupin y Gage, 2002.

Curiosamente, en animales jóvenes (con menos de diez días), los astrocitos extraídos de cualquier área cerebral presentan la capacidad de producir células madre (neuroesferas) *in vitro*

(Laywell y col., 2000). Con el desarrollo postnatal tardío y con la maduración cerebral, los astrocitos pierden completamente esta capacidad.

Los estudios sobre el origen de las nuevas neuronas corticales apuntan hacia dos direcciones. Por una parte, sugieren que posiblemente sean originadas en la SVZ, al igual que las nuevas neuronas granulares del sistema olfativo (Bernier y Parent, 1998; Kornack y Rakic, 2001). Mientras, que otros demuestran que las células de la glía radial generan neuronas y células gliales, comportándose como células madre (Hartfuss y col., 2001; Miyata y col., 2001; Malatesta y col., 2000; Noctor y col., 2001). Durante el desarrollo embrionario tardío y postnatal, las células de la glía radial generan astrocitos (Cameron y Rakic, 1991; Misson y col., 1991), y en algunas especies, la glía radial mantiene sus propiedades precursoras en el animal adulto (Alvarez-Buylla y col., 1990). Un estudio reciente (Merkle y col., 2004) muestra que en adulto las células de la glía radial provienen de las células madre de la zona subventricular. En definitiva, todos estos datos juntos soportan la idea de que las células madre se desarrollan de un linaje neuroepitelial-glía radial-astrocítico (Tramontin et al., 2003; Álvarez-Buylla y col., 2001).

Igualmente, hay cierta polémica en saber si las nuevas neuronas originadas en el adulto provienen de las mismas células neuroepiteliales que producen neuronas durante el desarrollo embrionario. Los tipos celulares retenidos dentro del neuroepitelio del sistema nervioso adulto, tales como las células endodiales o las llamadas células de la glía radial, son probablemente los precursores neurales en su similitud con las células neuroepiteliales embrionarias, de las cuáles son derivadas y de las cuáles aún conservan propiedades que les permiten responder a los patrones de señales que inducen la neurogénesis en el embrión (Álvarez-Buylla y col., 2001; Tamamaki y col., 2001; Kintner, 2002). Por tanto, las neuronas generadas en el adulto pueden tener distintos precursores, siendo algunos de ellos cercanos pero no directamente equivalentes a los del neuroepitelio embrionario. Además, las células madre en el adulto pueden ser más especializadas y solamente generar un rango limitado de subtipos neuronales, ya que son incapaces de activar distintas vías en las cascadas de las proteínas proneurales bHLH usadas por las células embrionarias (Kintner, 2002).

4.1. Neurogénesis en el sistema olfativo

4.1.1. Células madre en la SVZ

Distintos trabajos han permitido determinar la presencia y el fenotipo de las células madre en la zona subventricular del cerebro adulto (Reynolds y Weiss, 1992; Doetsch y col., 1997; Doetsch y col., 1999; Seaberg y Van der Kooy, 2002; Song y col., 2002). Estudios cuantitativos indican que la tasa de neurogénesis en la SVZ en adulto es de aproximadamente 80000 nuevas neuronas granulares por bulbo, o sea 1 % de la población de células granulares olfativas por día (Kaplan y col., 1985). En la zona subventricular existen al menos cuatro tipos

diferentes de células (Fig. 23), de acuerdo con su morfología, ultraestructura, propiedades electrofisiológicas, y con la presencia de marcadores moleculares.

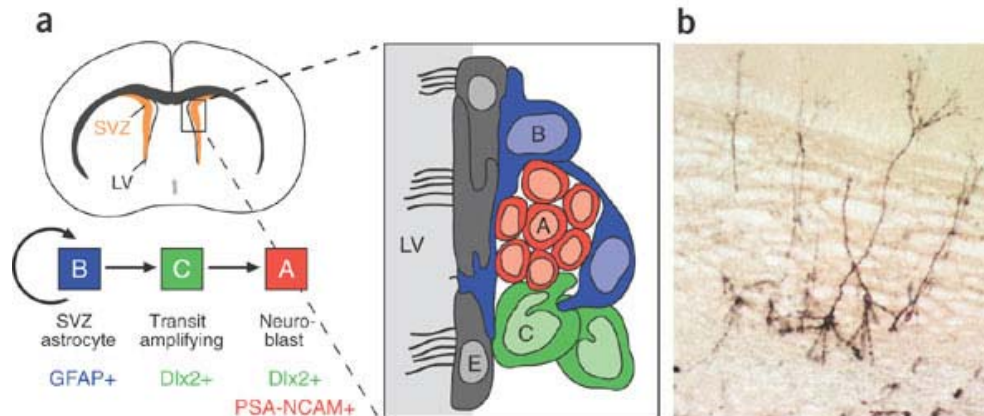


FIGURA 23. Organización y tipos celulares en la SVZ del adulto. (a) Esquema frontal del cerebro adulto de ratón mostrando la SVZ (en naranja), adyacente a los ventrículos laterales (LV), y los tipos de células de la SVZ: la línea de células endimiales multiciliadas (E, en gris) en los LV; las cadenas de neuroblastos (A, en rojo) migrando a través de los túneles gliales formados por los astrocitos de la SVZ (B, en azul); las células progenitoras neurales (C, en verde) dispersas en pequeños sitios a lo largo de la red de cadenas. Ocasionalmente, unos astrocitos de la SVZ se extienden entre las células endimiales y contactan con el ventrículo lateral, donde proyectan su único cilio. Los astrocitos de la SVZ son células madre en esta región y generan neuroblastos ($GFAP^+$, $Dlx2^+$, $PSA-NCAM^+$) vía las células C ($GFAP^+$, $Dlx2^+$, $PSA-NCAM^+$). (b) Neuronas granulares en el bulbo olfativo de un ratón adulto marcadas para la fosfatasa alcalina 14 días después de haber sido infectados los astrocitos de la SVZ selectivamente en ratones $GFAP-TVA$ con un retrovirus de ave. Doetsch y col., 1999 y Doetsch, 2003.

La división de las células B (**astrocitos monociliados** de la SVZ) y C (células precursoras) sugiere que uno o ambos tipos celulares estarían implicados en la generación de nuevas neuronas, las células A (neuroblastos). Contrariamente, las células A cultivadas *in vitro* son incapaces de auto-renovarse (Lim y Álvarez-Buylla, 1999). Infusiones intraventriculares con drogas antimitóticas permitieron eliminar las células C y A, y demostrar que las células B (astrocitos de la SVZ) podrían ser capaces de originar nuevas células C y A (Doetsch y col., 1999). Por tanto, las células B son las células precursoras de las nuevas neuronas y son capaces, aún, de generar, *in vivo* e *in vitro*, células que presentan propiedades de células madre (neuroesferas), las cuáles expresan FGF y EGF (Doetsch y col., 1999; Laywell y col., 2000). El potencial neurogénico de las células tipo astrocitos de la SVZ en adulto es sorprendente, ya que cambia la idea de que la neuroglía provenga de un linaje diferente del de las neuronas.

4.1.2. RMS

Durante el desarrollo del cerebro de los mamíferos se forma a lo largo de los ventrículos laterales una capa germinativa, la zona ventricular, rica en células neurales progenitoras, la cuál origina las neuronas que migran hacia todas las estructuras del cerebro. A finales del desarrollo embrionario, se origina otra capa de células germinativas adyacente a la zona ventricular, designada zona subventricular, la cuál también está implicada en generar nuevas neuronas. Con

el desarrollo postnatal disminuye progresivamente la proliferación neural y en el cerebro adulto desaparece la zona ventricular germinativa mientras se mantienen nichos de proliferación en la zona subventricular, en la cuál las nuevas neuronas generadas migran a través de la RMS hacia el bulbo olfativo (Fig. 24), donde se van a diferenciar en dos tipos de interneuronas: las células granulares y las células periglomerulares (Altman, 1969; Corotto y col., 1993; Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994).

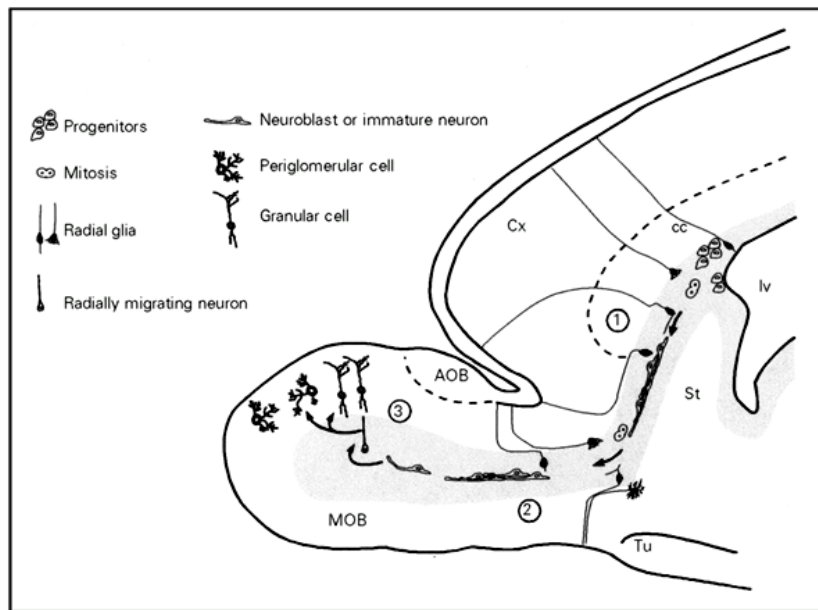


FIGURA 24. Esquema sagital del cerebro anterior de un animal en desarrollo postnatal temprano, que muestra la migración tangencial de las nuevas neuronas desde la zona subventricular (SVZ) hacia el bulbo olfativo (OB) siguiendo la vía rostral migratoria (RMS). La migración tangencial de las nuevas neuronas en la vía rostral migratoria puede estar dividida en tres fases simultáneas, que corresponden a las porciones de la vía señaladas numéricamente: (1) Las células ya están migrando pero aún son capaces de dividirse. Las células migratorias con actividad mitótica son frecuentes en las regiones más cercanas a la SVZ adyacente a los ventrículos laterales (lv). (2) En un determinado momento, dentro de la RMS, las células salen del ciclo celular y continúan su proceso de migración hacia el OB. (3) Una vez entradas en el OB, las células cambian su migración tangencial por una radial e invaden el parenquima del OB, diferenciándose en células granulares y periglomerulares. En el esquema, se ha omitido la migración radial en el OB para mayor simplificación. La migración en la SVZ/RMS de un animal adulto parece seguir las mismas fases y patrones que se muestran en este esquema de un animal en desarrollo postnatal. La SVZ/RMS está representada en color gris. AOB, accesorio del bulbo olfativo; CX, corteza cerebral; cc, cuerpo caloso; MOB, bulbo olfativo propio; St, estriado; Tu, tubérculo olfativo. Menezes y col., 2002.

La RMS es la única estructura del cerebro que posee una ruta de migración a larga distancia, que se inicia con la migración de las células madre y que finaliza con la llegada de las nuevas interneuronas al bulbo olfativo (Luskin, 1993; Lois y Álvarez-Buylla, 1994; Fukushima y col., 2002). Los neuroblastos en migración presentan una morfología alargada y forman cadenas de migración hacia el OB, juntamente con otros neuroblastos (Lois y col., 1996; Kishi, 1987; Lois y Álvarez-Buylla, 1994). Estas cadenas se encuentran dentro de tubos formados por

células gliales (astrocitos), las cuáles parecen no ser esenciales en la migración de los neuroblastos, sin embargo los factores que secretan parecen incrementar la migración (Lois y col., 1996; Wichterle y col., 1997; Mason y col., 2001). Estos tubos de células gliales (glía radial) reciben el nombre de glía de Bergmann (Rakic, 1995; Rakic y Sidman, 1973), los cuáles sirven de soporte direccional y de supervivencia a los neuroblastos, evitando que salgan prematuramente de las rutas de migración (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002).

Por otra parte, los neuroblastos en migración presentan conos de crecimiento muy desarrollados y en proceso activo de extensión y retracción, lo cuál sugiere que estas células usan los mismos mecanismos de locomoción usados por los axones en crecimiento (Wichterle y col., 1997). Distintos estudios han demostrado la importancia de las moléculas de adhesión (integrinas) y de la matrix extracelular (tenascina y sulfato de condroitina) en la migración de los neuroblastos a lo largo de la RMS (Jacques y col., 1998; Thomas y col., 1996; Bonfanti y Theodosis, 1994; Rousselot y col., 1995). Concretamente, la PSA-NCAM parece estar implicada en el establecimiento de contactos entre los neuroblastos de las cadenas migratorias y las células gliales que forman los tubos (Cremer y col., 1994). Además, la presencia de factores quimiorrepulsivos, tales como los inhibidores migratorios Slits, en el área septal parece jugar un importante papel en prevenir la migración de los neuroblastos hacia ciertas zonas cerebrales (Mason y col., 2001).

Las nuevas neuronas generadas en la SVZ del cerebro adulto y que migran hacia el OB vía la RMS, disparan potenciales de acción espontáneamente y reciben contactos sinápticos, lo que sugiere su integración funcional en los circuitos del OB. Por tanto, las nuevas neuronas llegan a madurar funcionalmente y presentan, aunque no totalmente, propiedades similares a las células granulares más viejas (Carleton y col., 2003).

El continuo re-emplazamiento de las neuronas del OB parece ajustarse al entorno o a cambios relevantes en los olores (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Animales knockout para la NCAM (altamente expresada en la RMS) presentan una disminución significativa del número de neuronas en el OB (Gheusi y col., 2000). Estos animales knockout no son capaces de discriminar los distintos olores, sin embargo, su capacidad para recordar olores, así como, su sensibilidad olfativa no están afectadas. Estos datos sugieren que las nuevas neuronas que migran hacia el OB están seguramente implicadas en el reconocimiento olfativo. Por otra parte, las nuevas interneuronas producidas en la SVZ también son incorporadas en el bulbo olfativo accesorio (Bonfanti y col., 1997), el cuál está implicado en el procesamiento de la información olfativa asociada con el comportamiento sexual. Asimismo, la neurogénesis en la SVZ se encuentra incrementada durante el estro (Smith y col., 2001) y con los niveles de prolactina a finales del embarazo (Shingo y col., 2003). Por tanto, el re-emplazamiento de nuevas neuronas en el OB puede estar regida por factores hormonales que probablemente se encuentran

asociados con los comportamientos sexuales (feromonas) regulados por el sistema límbico (hipotálamo).

4.2. Neurogénesis en el giro dentado

Las células neurales progenitoras del giro dentado son generadas en la zona subgranular y se diferencian tanto en células gliales como en neuronas en la capa granular del giro dentado (Eckenhoff y Rakic, 1988; Stanfield y Trice, 1988). Estudios con trazadores neuronales retrógrados han permitido mostrar que las nuevas neuronas granulares del giro dentado envían sus axones a la región CA3 del hipocampo, aproximadamente 1-2 semanas después de la mitosis (Stanfield y Trice, 1988; Markakis y Gage, 1999; Hastings y Gould, 1999). Aproximadamente, unas 250.000 nuevas neuronas son incorporadas mensualmente en el giro dentado, o sea, un 6% del total de células del giro dentado (Cameron y McKay, 2001).

En la SGZ es posible distinguir diferentes tipos celulares (Fig. 25): (1) los astrocitos radiales de la SGZ (células B, GFAP⁺), localizados en la parte más interna, de cara hacia el hilus; (2) las células precursoras (células D, PSA-NCAM⁺) que son inmunoreactivas a la PSA-NCAM y ausentes en GFAP; (3) y las nuevas neuronas granulares (células G, PSA-NCAM⁺), que ya presentan características electrofisiológicas típicas de las neuronas diferenciadas (Seri y col., 2001 y 2004).

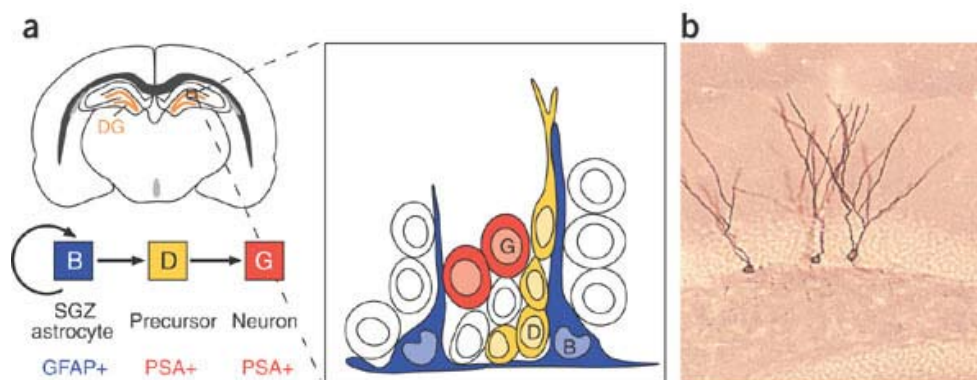


FIGURA 25. Organización y tipos celulares en la SGZ. (a) Esquema de una sección coronal del cerebro de ratón adulto mostrando el giro dentado (en naranja) y los tipos celulares en la SGZ: los astrocitos de la SGZ (B, en azul, GFAP⁺) son los precursores primarios in vivo y dan origen a los precursores intermediarios (D, en amarillo, GFAP⁻, PSA-NCAM⁺), los cuáles generan las nuevas neuronas granulares (G, en rojo, GFAP⁻, PSA-NCAM⁺). (b) Neuronas granulares en el giro dentado marcadas para la fosfatasa alcalina después de ser infectadas selectivamente con astrocitos de la SGZ de animales portadores de un retrovirus de ave. Doetsch, 2003.

Las células madre en la SGZ parecen ser un determinado tipo de astrocitos, los **astrocitos radiales** (células B, nestina⁺, GFAP⁺, S-100β⁻) (Seri y col., 2001 y 2004). Estudios en animales quiméricos Nestina-GFP refuerzan el papel de los astrocitos radiales como células madre en la SGZ (Filippov y col., 2003). Los astrocitos radiales de la SGZ originan los primeros precursores intermediarios (las células D, PSA-NCAM⁺), y estos a su vez originan las neuronas granulares (células G, PSA-NCAM⁺) (Seri y col., 2001 y 2004). Por otra parte, en la SGZ

también se encuentran otro tipo de astrocitos (Seri y col., 2004), los llamados astrocitos horizontales (células B, GFAP⁺, S-100β⁺). Estos astrocitos no poseen las propiedades de las células madre, sin embargo poseen la actividad mitótica de los precursores neurales y se distinguen de los astrocitos radiales por su morfología y por la presencia o ausencia de determinados marcadores moleculares (Seri y col., 2004). Distintos estudios apuntan a que los astrocitos radiales originan los astrocitos horizontales (Seri y col., 2004), los cuáles a su vez serían los precursores de los oligodendrocitos (Romero-Aleman y col., 2003; Vives y col., 2003).

Funcionalmente, las células madre de la SGZ del giro dentado adulto se desarrollan eficientemente en neuronas, las cuáles presentan todas las características de las neuronas maduras del SNC: son no-mitóticas y polarizadas, poseen axones y dendritas, forman sinapsis eficientemente, son eléctricamente activas, capaces de descargar potenciales de acción en respuesta a descargas sinápticas y de recibir descargas sinápticas tanto inhibitorias como excitatorias, así como, son capaces de liberar los neurotransmisores clásicos en respuesta a los potenciales de acción (Song y col. 2002). Sin embargo, la funcionalidad de estas neuronas no es tan efectiva como la observada en las neuronas obtenidas de células madre en desarrollo (Song y col., 2002). Contrariamente a las neuronas originadas en la SVZ, las nuevas neuronas de la SGZ se desplazan en distancias muy cortas dentro de la capa de células granulares.

El potencial funcional de las nuevas neuronas generadas en la SGZ es desconocido, ya que se desconoce la función del propio giro dentado en el cerebro. Posiblemente, contribuye a los procesos de aprendizaje y memorización del hipocampo (Barnea y Nottebohm, 1996; Gould y col., 1999; Feng y col., 2001; Shors y col., 2001). Se sabe que las neuronas del giro dentado reciben información de muchas otras partes del cerebro (especialmente del sistema límbico), y que muchos neurotransmisores del sistema nervioso central tienen terminales en la SGZ (Kempermann y col., 2004). Además, las nuevas neuronas del giro dentado envían sus terminales hacia la región hipocampal CA3, la cuál parece servir como una memoria auto-asociativa temporal (Treves y Rolls, 1994). Por tanto, el giro dentado puede codificar información que será usada por la CA3 (Kempermann y col., 2004).

4.3. Regulación de la neurogénesis en el cerebro adulto

Las nuevas neuronas granulares del giro dentado pueden participar en el procesamiento de la memoria en el hipocampo (Shors y col., 2001), mientras que las nuevas neuronas olfativas pueden participar en el procesamiento de la información olfativa (Carleton y col., 2003). En un trabajo reciente, Weissman y col. (2004) demuestran que la proliferación de las células radiales en la zona ventricular durante el desarrollo embrionario está regulada por olas espontáneas de calcio, las cuáles están estimuladas por la concentración de ATP extracelular. Se desconoce aún si los mecanismos que regulan la neurogénesis en las dos áreas germinativas del cerebro adulto

son los mismos que regulan la neurogénesis en el desarrollo. Sin embargo, las nuevas neuronas funcionales generadas en estas áreas han ampliado la definición de plasticidad en el cerebro adulto para ahora incluir también el concepto de **adición celular** a la red neuronal ya existente (van Praag y col., 2002).

La generación de células madre y la diferenciación de las células precursoras son procesos regulados por el microambiente específico en el cuál estas células residen (Álvarez-Buylla y Lim, 2004). La maquinaria de regulación de la neurogénesis durante el desarrollo embrionario y postnatal es conservada, al menos en parte, en el cerebro adulto. Así, los factores inductores de la neurogénesis y de la morfogénesis embrionaria, tales como Notch, BMPs, Eph/ephrins, Noggin, y Shh, juegan también un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular en los nichos neurogénicos del cerebro adulto (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

Durante el desarrollo, un gran número de genes proneurales (bHLH) modulan las células madre hacia una determinación y diferenciación celular (para revisión véase Kintner, 2002). Algunos de esos genes pueden ser expresados o suprimidos, en regiones germinativas del cerebro adulto, como respuesta a un estímulo o lesión (Hallbergson y col., 2003). Por tanto, la neurogénesis en el cerebro adulto, al igual que en el cerebro en desarrollo, puede requerir de una expresión constante de otros determinantes celulares, tales como los genes proneurales y las proteínas homeodominios o de otras señales aún no identificadas. Por otra parte, la expresión de determinados factores de crecimiento o tróficos (FGF, EGF, CNTF, IGF, ...), implicados en guiar el destino celular, puede determinar el tamaño de una población neuronal o glial, tanto durante el desarrollo como en el cerebro adulto (Kuhn y col., 1997; Pencea y col., 2001). Asimismo, estos factores se encuentran sobre-expresados en distintos modelos neurodegenerativos, en los cuáles pueden actuar como factores protectores del daño neural pero también como factores inductores de la generación y diferenciación de nuevas células que remplazarían las células lesionadas (Kuhn y col., 2001; Pencea y col., 2001; Aberg y col., 2000; Kuhn y col., 1997). Por tanto, en la secuencia de una lesión o daño neural se activan los programas del desarrollo en el sentido de minimizar el daño ocasionado (Kozorovitskiy y Gould, 2003).

El daño neural estimula positivamente la proliferación en las zonas germinativas del cerebro adulto (Kee y col., 2001; Dash y col., 2001; Jin y col., 2001). En distintos modelos de lesión cerebral, se ha observado que la pérdida de neuronas viene después acompañada de un incremento en la tasa de proliferación neuronal y glial en el cerebro adulto (Jin y col., 2001), la cuál puede persistir incluso un año después del daño ocasionado (Chen y col., 2003). La generación de convulsiones provoca un incremento de la proliferación en el giro dentado de animales adultos mientras disminuye la proliferación en el cerebro de animales en desarrollo (Liu y col., 2003), posiblemente reforzando la diferente naturaleza de los progenitores en

desarrollo y en el adulto, o posiblemente debido a la gran plasticidad neural que hay durante el desarrollo. Un trabajo reciente, muestra que un daño o lesión en la medula espinal induce a que los astrocitos de esta región sean capaces de adquirir propiedades de células madre y se puedan originar precursores neurales que se diferenciarían en neuronas, en astrocitos y en oligodendrocitos (Lang y col., 2004). Por tanto, la proliferación en el cerebro adulto puede jugar un papel muy importante en el re-emplazamiento de nuevas células neuronales y gliales como respuesta a una lesión o daño cerebral, el cuál conduce a la pérdida inmediata y/o progresiva de células cerebrales.

La neurogénesis no es un proceso biológico estático, ya que su tasa es variable y está altamente dependiente a los cambios del entorno (Peterson, 2002). Estudios recientes han demostrado que la actividad física, los ambientes enriquecidos, la restricción calórica y la modulación de la actividad neural, así como los factores hormonales, actúan como reguladores positivos de la neurogénesis (Tanapat y col., 2005; Mirescu y col., 2004; Gould y col., 2000; Tanapat y col., 1999; Van Praag y col., 1999; Kempermann y col., 1997; Gould, 1994; Gould y col., 1994; Gould y col., 1992).

Los animales que viven en un ambiente enriquecido presentan un incremento en las nuevas células generadas en la capa subgranular del giro dentado (Mirescu y col., 2004; Nilsson y col., 1999; Kempermann y col., 1997; Barnea y Nottebohm, 1994). Consecuentemente, los animales que viven en condiciones de estrés presentan una baja tasa de neurogénesis en el giro dentado o, incluso una inhibición total (Gould y col., 1997 y 1998; Tanapat y col., 2001). Alteraciones en el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal inducidas por situaciones persistentes de estrés durante el desarrollo pueden conducir a una bajada permanente en la producción de nuevas células en el giro dentado (Lemaire y col., 2000; Lenington y col., 2003). Además, la proliferación celular en el giro dentado es disminuida por los glucocorticoides, los cuáles son liberados en respuesta al estrés (Tanapat y col., 2001). Contrariamente, los esteroides ováricos, así como los estrógenos endógenos, tienen un efecto estimulador en la proliferación celular de los precursores granulares (Tanapat y col., 1999; Ormerod y Galea, 2001; Banasr y col., 2001). Un estudio reciente, muestra que la tasa de neurogénesis se incrementa un 65% durante el embarazo, alcanzando su pico máximo justo antes del parto, y coincidiendo con los niveles de prolactina (Shingo y col., 2003). Por tanto, la proliferación celular en el giro dentado adulto está sujeta a una modulación hormonal y, por tanto, pueden jugar un papel en la modulación hipocampal del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (para revisión véase Lenington y col., 2003).

Por otra parte, se ha observado que la deficiencia de algunos agentes antioxidantes, tales como la vitamina E, provoca un aumento en la población de precursores neurales y favorece la supervivencia de las nuevas células del giro dentado (Ciaroni y col., 2002 y 1999). Por tanto, la vitamina E es un factor exógeno que permite regular la neurogénesis en el cerebro adulto, lo cuál refuerza la hipótesis de que muchos factores, aún desconocidos, pueden regular la

proliferación de los precursores neurales y, consecuentemente las nuevas poblaciones generadas.

La tasa de neurogénesis en el cerebro adulto disminuye con el incremento de la edad (Kuhn y col., 1996; Bizon y Gallagher, 2003; Bondolfi y col., 2004), posiblemente como resultado de una disminución en la agilidad mental y física. Sin embargo, la inducción de la neurogénesis en el giro dentado de los animales maduros es más efectiva que en animales jóvenes (Kepermann y col., 2002), probablemente por la alta capacidad de plasticidad neural durante el desarrollo.

CAPÍTULO 5

ZAC1, EL NUEVO IMPRINTING GENE, QUE REGULA LA APOPTOSIS Y EL PARO DEL CICLO CELULAR

La capacidad proliferativa de los nichos progenitores en el adulto, al igual que durante el desarrollo, es el reflejo de un exhaustivo control entre la división celular, el paro del crecimiento celular, la diferenciación celular y la muerte celular programada (para revisión véase Zhang y Liu, 2002; Punzel y Ho, 2001; Krupp y col., 2000). La regulación de estos procesos es crucial para el desarrollo y manutención de los tejidos. Una compleja red de genes, especialmente los genes implicados en la regulación del ciclo celular, juegan una función crítica en el control de la tasa proliferativa. En este sentido, la fase G1 del ciclo celular, la cuál antecede a la fase de síntesis del DNA, desempeña un papel clave en el procesamiento de un flujo de señales que le permitirá tomar la decisión de continuar la división celular o inducir la determinación celular. Alteraciones o fallos durante esta fase pueden conducir a una proliferación descontrolada y resultar en procesos cancerígenos (para revisión véase Massagué, 2004; Ho y Dowdy, 2002).

Las células de mamífero normalmente poseen mecanismos de coordinación exhaustivos que involucran factores de crecimiento, proto-oncogenes, y genes supresores tumorales (TSG) para mediar correctamente la reparación y el mantenimiento de la arquitectura histológica. Sin embargo, mutaciones o alteraciones génicas pueden conducir a la activación de proto-oncogenes o/y a la activación de TSG y, terminar desembocando en procesos cancerígenos.

Por todo ello, el estudio de los genes implicados en el control de la tasa proliferativa resulta primordial para el conocimiento de las vías asociadas a los procesos cancerígenos y para el desarrollo de las posibles dianas terapéuticas.

5.1. Características estructurales y expresión de Zac1/ZAC

En 1997, Spengler y colaboradores usaron un singular sistema de expresión génica en el cuál inducían la expresión del gene PACAP-R1, mediante la estimulación de la adenilato-ciclase a través de sus receptores diana, y con ello obtuvieron dos tipos distintos de clones: uno donde las secuencias genómicas obtenidas eran idénticas o parcialmente idénticas al gen supresor p53, y otro donde las secuencias genómicas encontradas no correspondían a ningún gen previamente descrito, designándole *Zac1*, proteína *Zinc finger* que regula la Apoptosis y el paro del Ciclo celular, de acuerdo con su carácter funcional, y del cuál se hablara con más detalle en el punto 5.3. La región codificante de la nueva secuencia posee 2.8 Kb y codifica una secuencia de 667 aminoácidos, cuya proteína pesa 75 KDa (Fig. 26).

Un examen detallado de la secuencia proteica revela la presencia de 7 motivos *zinc finger* del tipo C₂H₂ (Klug y Schwabe, 1995) en el N-terminal de la región Zac1. Sin embargo, la homología con otros miembros de la familia de proteínas *zinc finger* es baja, aproximadamente 30%, siendo más cercana con el grupo formado por la familia GLI-Krüppel, cuyos miembros han sido implicados en el desarrollo normal y en la formación tumoral (Ruppert y col., 1993).

```

1  MAPFRCQKCG KSFVTLEKFT HNYSHSRER
31  PFKCSKAECG KAFVSKYKLM RMATHSPQK
61  IHQCTHCEKT FNRKDHLKNE LQTHDPNKIS
91  YACDDCGKKY HTMLGYKREL ALHSSASNGDL
121 TCGVCTLELG STEVLLDELK SHAEEKANQA
151 PREKKYQCDH CDRCFYTRKD VRRHLVVHTG
181 CKDFLCQFCA QRFGRKDHLT RHTKKTHSQE
211 LMQENMQAGD YQSNFQLIAP STSFQIKVDP
241 MPPFQLGAAP ENGLDGGGLPP EVHGLVLAAP
271 EEAPQPMPL EPLEPLEPL PLEPMQSLEP
301 LQPLEPMQPL EPMQPLEPMQ PLEPLEPLEP
331 MQPLEPMQPL EPMQMLPMQ PMQPMQPMQ
361 MLPMQMLPM QPMQPMQML PMPESFTLH
391 PGVVPTSPPP IILQEHKYNP VPTSYAPFVG
421 MPVKADGKAF CNVGFFEEFP LQEPQAPLKF
451 NPCFEMPMEG FGKVTLSSKEL LVDAVNIAIP
481 ASLEISSLLG FWQLPPPTPQ NGFVNSTIPV
511 GPGEPLPHRI TCLAQQQPPP LPPPPPLPLP
541 QPLPVPQPLP QPQMQPQFQL QIQPMQLLPQ
571 LLPQLQPQQQ PDPEPEPEPE PEPEPEPEPE
601 PEPEPEPEPE PEPEEEQEEA EEEAEGAEE
631 GAEPEAQAE EEEEEAEEP QPEEAQIAGL
661 VYKKWTV
      ****

```

FIGURA 26. Secuencia de aminoácidos de la proteína Zac1 (parcialmente modificado de Spengler y col., 1997).

El primer H/C de unión, **HSRERPFKC** (en amarillo en la Fig. 26), es similar con la región *consensus* para la familia GLI-Krüppel (**H(S/T)GEKP(F/Y)XC**) (Schuh y col., 1986). Por otra parte, los 459 aminoácidos en el C-terminal (raya vertical del lado derecho en la Fig. 27) no presentan homología para ninguna de las secuencias depositadas en las bases de datos. La región central de la proteína (275-383, caja verde en la Fig. 26) se caracteriza por poseer 34 repeticiones PLE, PMQ o PML, lo que sugiere una estructura conocida como hélice poli(prolina) del tipo II, la cuál se considera crítica en las interacciones proteína-proteína (Williamson, 1994). La región C-terminal es rica en P, Q, y E, siendo frecuentemente observado en los dominios de transactivación de los factores de transcripción. Además, es posible encontrar un sitio de fosforilación para Cdks (**HSPQK**, subrayado en la Fig. 26) entre los segundo y tercero motivos *zinc finger* (residuos 56-60), así como un sitio de fosforilación para la proteína quinasa A (**KKWT**, sobre asteriscos en la Fig. 26) en la extremidad del C-terminal (residuos 663-666), lo que sugiere una posible regulación por proteínas quinasas (Spengler y col., 1997). Curiosamente, en un estudio que se desarrollaba en paralelo, Abdollahi y col.

(1997a) aíslan en rata un gen *zinc finger*, cuya secuencia es homologa a la de *Zac1* (Fig. 27), y que llaman de *rLot1* (*lost on transformation*) por estar suprimido en la transformación de carcinomas (véase punto 5.2.). Por tanto, *Zac1* ha sido identificada en dos estudios distintos: en uno, para genes regulados por neuropéptidos, y, en otro, para genes cuya expresión estaba suprimida en modelos de transformación de carcinomas ováricos.

Posteriormente, Varrault y col. (1998) clonan el gen humano de la *Zac1*, *ZAC*. Los genes de *Zac1* y *ZAC* son sinténicos (están en el mismo cromosoma) y ortólogos. Comparando las secuencias de *Zac1* en ratón y de *ZAC* en humano, podemos observar que los genes comparten un 75% de los nucleótidos y las proteínas un 68,5% de los aminoácidos (Fig. 27). Sin embargo, la región *zinc finger* (C_2H_2) en el N-terminal de las proteínas es la más conservada (84,2% de homología), mientras que la región *linker*, la región rica en Glu, Pro y Gln, y el C-terminal son las menos conservadas (54%, 58% y 63%, respectivamente). Las 34 repeticiones ricas en prolina (PLE, PMQ y PML), así como los dominios E-clusters solamente se hallan en la secuencia murina (Fig. 27). Sin embargo, ambas proteínas exhiben las mismas propiedades funcionales (Varrault y col., 1998). *ZAC*, al igual que *Zac1*, es una proteína nuclear que muestra actividad transcripcional y la capacidad de unirse al DNA, actuando como un factor de transcripción. Además, su expresión induce el paro del ciclo celular en fase G_1 , inhibe el crecimiento de las células tumorales, e induce la apoptosis (Varrault y col., 1998).

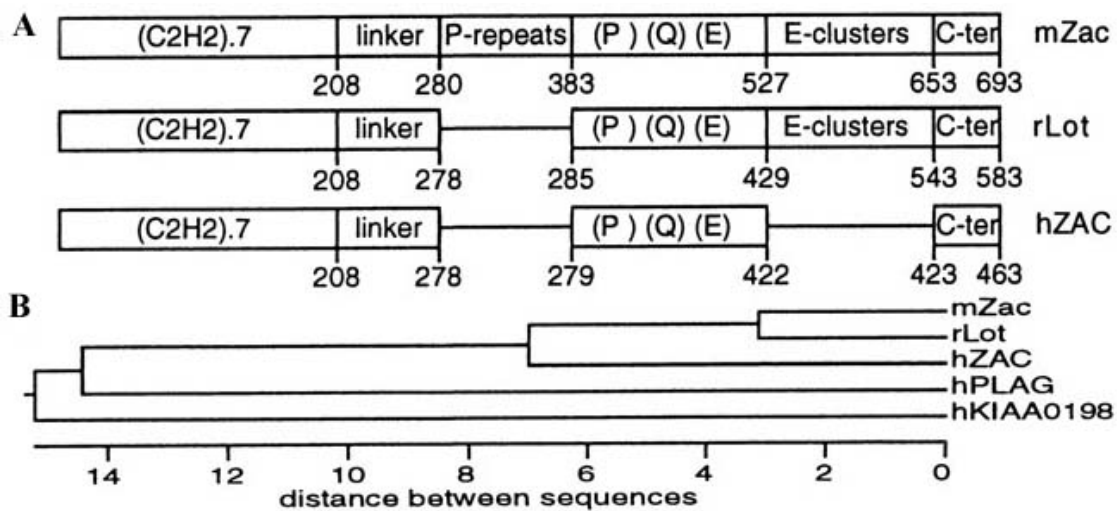


FIGURA 27. Secuencias de la familia ZAC/LOT. (A) Representación esquemática de las estructuras proteicas de ZAC/LOT. Cada dominio está indicado con una caja: los 7 *zinc fingers* tipo C_2H_2 , la región *linker*, la región repetida de **P**rolinas únicamente encontrada en mZac, la región rica en Pro, Gln y Glu, el cluster de Glu ausente en hZAC, y el C-terminal. El número de residuos de aminoácidos está indicado en el interior de las cajas. (B) Árbol filogenético para la familia ZAC/LOT. Únicamente los dominios *zinc fingers* son tenidos en cuenta para este análisis (Parcialmente modificado de Varrault y col., 1998).

En ratones adultos, *Zac1* se expresa intensamente en la glándula pituitaria anterior, débilmente en varias áreas cerebrales, tales como en el bulbo olfativo, corteza, hipocampo,

hipotálamo-tálamo, tronco del cerebro y cerebelo, y muy débilmente en los tejidos periféricos, tales como en el estómago, riñón, glándula adrenal, corazón y pulmón (Spengler y col., 1997).

La expresión de *ZAC* en el adulto, al igual que la de *Zac1*, es abundante en la glándula pituitaria, sin embargo su expresión en otros tejidos es diferencial, además de estar mucho más ampliamente distribuida que la de su ortólogo *Zac1* (Spengler y col., 1997; Varrault y col., 1998). Así, la expresión de *ZAC* es moderada en el riñón, placenta, glándula adrenal, y en varios tejidos periféricos (Fig. 28), mientras que se expresa débilmente en los leucocitos periféricos, en la espinal medula, en el hígado, en el músculo esquelético, y en todo el cerebro, concretamente en el tálamo, corteza cerebral, amígdala, hipocampo y cerebelo (Varrault y col., 1998). La expresión de *ZAC* también es detectada en tejidos fetales, aunque en niveles más bajos que en el adulto, principalmente en el riñón, pulmón y corazón, mientras se expresa débilmente en el cerebro y en el hígado.

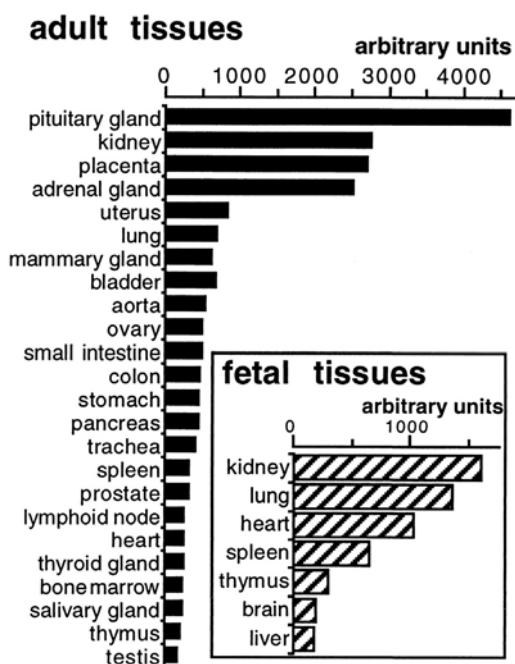


FIGURA 28. Expresión de *ZAC* en tejidos humanos, en adulto y en desarrollo, mediante técnicas de RNA blot usando la sonda *ZAC* (Varrault y col., 1998).

5.2. *Splicing* alternativo y familia de proteínas *Zinc-Finger* relacionadas con *Zac1/ZAC*

La homología entre las secuencias proteicas de la *ZAC* y *LOT* (el ortólogo humano del gen de rata *Lot1*) son idénticas (Fig. 27), con excepción de un residuo: el aminoácido en la posición 81 de la *ZAC* y *Lot1* es una leucina, mientras que en la *LOT* es una fenilalanina (Varrault y col., 1998). Sorprendentemente, las regiones 5'-untranslated de los genes *LOT* y *ZAC* son completamente diferentes en 189 nucleótidos localizados *upstream* del codón ATG. Posiblemente, las extremidades 5' de los genes *LOT* y *ZAC* pueden corresponder a dos variantes

de *splicing* distintas o cada uno puede contener un intrón *unspliced* (Varrault y col., 1998). Otra hipótesis sugiere la posible existencia de un sitio de *splicing* 3' (CACAG) que estaría presente en los 190 nucleótidos 5' del ATG en *LOT*. En este sentido, se ha encontrado la presencia de un intrón en esa posición del gen de ratón (Varrault y col., 1998). Además, el alineamiento de *ZAC* cDNA con diferentes ESTs demuestra la existencia de una variante de *ZAC* por *splicing* alternativo, *ZACΔ2* (Varrault y col., 1998; Bilanges y col., 2001). *ZACΔ2* presenta una delección en el exón que codifica los dos *zinc fingers* del N-terminal previamente descritos para *ZAC* (Bilanges y col., 2001).

Los mRNAs que codifican *ZAC* o *ZACΔ2* se expresan abundantemente, y ambos genes codifican proteínas nucleares, sin embargo *ZACΔ2* exhibe una mayor actividad en la transactivación y una mayor afinidad del sitio de unión que *ZAC*, lo cuál sugiere que los dos *zinc fingers* del N-terminal regulan negativamente el dominio de unión de *ZAC* a sus secuencias de DNA diana (Bilanges y col., 2001). Por otra parte, ambas proteínas presentan las mismas características anti-proliferativas, aunque funcionalmente hay una regulación diferencial, ya que *ZACΔ2* es más eficiente en la inducción del paro del ciclo celular (actuando como la p53) que *ZAC*, mientras que ocurre lo contrario en la inducción de la apoptosis, donde *ZAC* es más eficiente (Bilanges y col., 2001). Por tanto, el *splicing* alternativo puede servir para distinguir entre las actividades anti-proliferativas de *ZAC*, resultantes de la unión diferencial al DNA, y puede contribuir para su relación con determinadas patologías (Hoffmann y col., 2003).

Recientemente se han clonado por PCR dos fragmentos humanos con cierta homología a *ZAC* (Fig. 27): *PLAGL1*, un gen embrionario de la familia *PLAG1* (*pleiomorphic adenomas of the salivary gland*), el cuál puede estar involucrado en la patogénesis de los adenomas pleiomórficos (Kas y col., 1997; Voz y col., 1998); y KIAA0198, fragmento clonado de una línea celular humana KG-1, cuya función es aún desconocida (Nagase y col., 1996). Los estudios de alineamiento de las secuencias de nucleótidos sugieren que estos fragmentos son miembros de la misma familia de proteínas *zinc finger* a la cuál *ZAC* pertenece, y que posiblemente son variantes que resultan de *splicing* (Varrault y col., 1998).

PLAG1 es un miembro de la subfamilia de proteínas *zinc finger* que incluyen el candidato a supresor tumoral, *PLAG-like 1* (homologo a *Zac1/Lot1*) y *PLAGL2* (Hensen y col., 2002). La homología entre las tres proteínas *PLAG* reside esencialmente en el dominio *zinc finger* del N-terminal (73% entre *PLAG1* y *PLAGL1*, y 79% entre *PLAG1* y *PLAGL2*), sin embargo el dominio de unión al DNA en *PLAGL1* muestra alta homología con el de *PLAG1*, habiendo ligeras diferencias en la especificidad de las uniones al DNA (Hensen y col., 2002). Comparando esas especificidades en la familia *PLAG*, se observa que *PLAG1* y *PLAGL2* poseen capacidades de unión al DNA casi indistinguibles, siendo capaces de inducir los mismos genes diana, mientras que las capacidades de unión al DNA por *PLAGL1* son muy diferentes

(Hensen y col., 2002). Así, mientras *PLAG1* y *PLAGL2* se encuentran sobre-expresadas en adenomas pleiomórficos y en células NIH3T3, actuando como proto-oncogenes, *PLAGL1* parece actuar como un gen supresor tumoral, ya que inhibe el crecimiento tumoral a través del paro del ciclo celular y de la inducción de la apoptosis (Varrault y col., 1998; Hensen y col., 2002). Además, *PLAG1* y *PLAGL2* inducen el gen *IGF-II*, el cuál actúa como un factor de crecimiento fetal durante el desarrollo y en los procesos carcinogénicos (Toretsky y Helman, 1996). La señalización mitogénica del *IGF-II* está mediada por la vía IGF-I-R, la cuál al estar inducida puede incrementar la mitogénesis a través de la vía Ras/Raf/MAPK (LeRoith y col., 1995). Por otra parte, la homología entre ZAC y *PLAGL1* no incluyen la región rica en PLE, PMQ y PML, por lo que Zac1 puede representar un cuarto miembro de la familia PLAG (Kas y col., 1998). Por tanto, la familia PLAG parece estar involucrada en distintas vías de la transformación celular (Hensen y col., 2002).

5.3. Actividad anti-proliferativa de Zac1

La actividad anti-proliferativa de Zac1 se debe a su capacidad para inducir la apoptosis y el paro del ciclo celular, a través de vías independientes (Spengler y col., 1997).

La expresión de Zac1 (Fig. 29A) incrementa el número de células en fase G₀/G₁ de 41 a 63% y decrece inversamente el número de células en fases S (de 40 a 25%) y G₂/M (de 19 y 12%) (Spengler y col., 1997). Contrariamente, la expresión de p53 (Fig. 29B) reduce el número de células en fases G₀/G₁ (de 38 a 32%) y S (de 43 a 33%), mientras que incrementa el número de células en fase G₂/M, de 19 a 35% (Spengler y col., 1997). Por tanto, Zac1 regula el paro del ciclo celular en la fase G₁, la cuál representa un punto clave en la regulación de la progresión del ciclo celular. Por otra parte, la regulación del paro del ciclo por p53 se hace en la fase G₂/M. Por tanto, ambas proteínas, Zac1 y p53 actúan sobre el ciclo celular pero en fases distintas.

En la función reguladora de parar el ciclo celular por p53, el mayor factor *downstream* es p21^{WAF} y la deficiencia de p21^{WAF} interfiere con la regulación del paro del ciclo celular mediada por p53, pero no con la apoptosis (Deng y col., 1995). Sin embargo, en el caso de Zac1 aún se desconoce las proteínas implicadas en la función reguladora del paro del ciclo celular, aunque se sabe que su función es independiente de p21^{WAF} (Spengler y col., 1997).

La expresión de Zac1 induce la apoptosis (Spengler y col., 1997), ya que incrementa el número de células con signos de pérdida de la viabilidad celular dos días después de la expresión de Zac1 (Fig. 30). Un análisis microscópico y molecular de esas células, mediante técnicas de tinción fluorescente del DNA (naranja de acridina y bromuro de etídio) así como por la técnica del TUNEL, ha permitido mostrar la existencia de condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma, aspecto de burbuja de la membrana (aunque no se rompa), formación de cuerpos apoptóticos, y fragmentación del DNA.

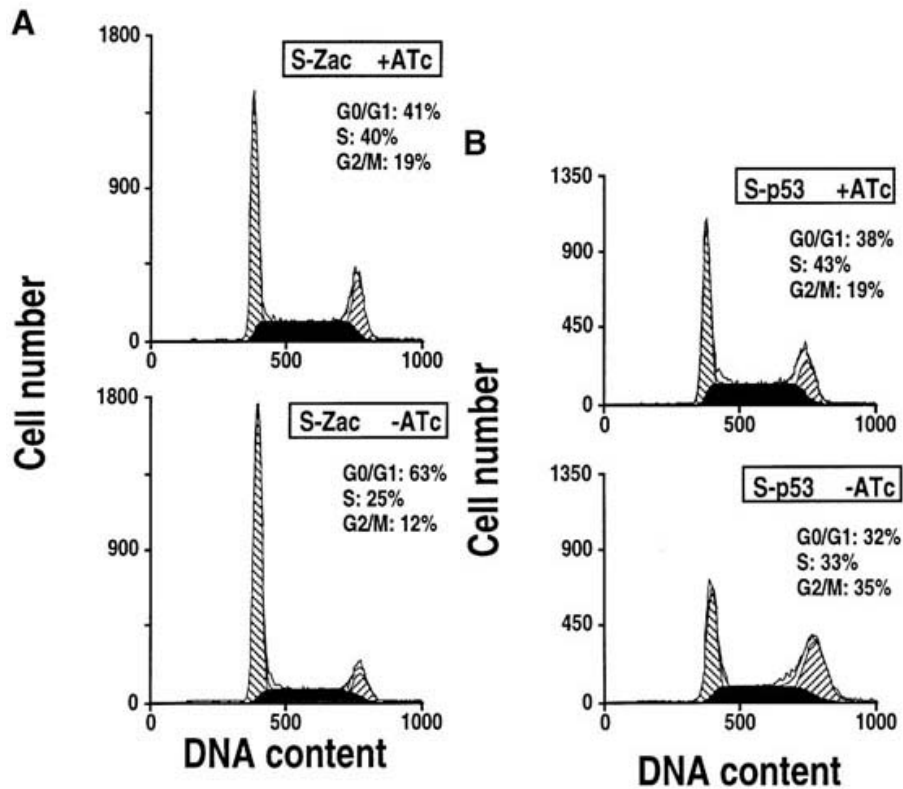


FIGURA 29. Zac1 y p53 regulan la progresión del ciclo celular. (A) Zac1 induce el paro del ciclo celular. Las células S-Zac son cultivadas en la presencia (panel superior) o ausencia (panel inferior) de ATc durante 3 días. Las células fueron teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo para determinar el contenido de DNA. (B) Inducción del paro del ciclo celular en fase G₂/M por p53. Las células S-p53 son analizadas como en (A) (Spengler y col., 1997).

La inducción de la apoptosis por Zac1 es completamente independiente de la fase del ciclo celular, de igual modo, la inducción del paro en G₁ por Zac1 es independiente de la apoptosis (Spengler y col., 1997). Hay muchos genes implicados en la regulación del ciclo celular (por ejemplo, p53, p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, p16^{INK4}, etc), así como en la regulación de los procesos apoptóticos (por ejemplo, RB, caspasas, etc), sin embargo, hasta el momento solamente dos genes tienen la capacidad de regular de manera simultánea e independiente estos dos procesos, tanto *in vivo* como *in vitro*: p53 y Zac1. Además, las vías que activa Zac1 no están relacionadas con las vías que induce p53, ya que ocurren independientemente de la proteína funcional RB y no implica la inducción de p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} o p16^{INK4a}. Lo que sugiere que Zac1 pueda inducir la expresión de un inhibidor Cdk aún desconocido o, por otra parte, que esté modulando la actividad o la expresión de las ciclinas, Cdk's o sus inhibidores (Spengler y col., 1997).

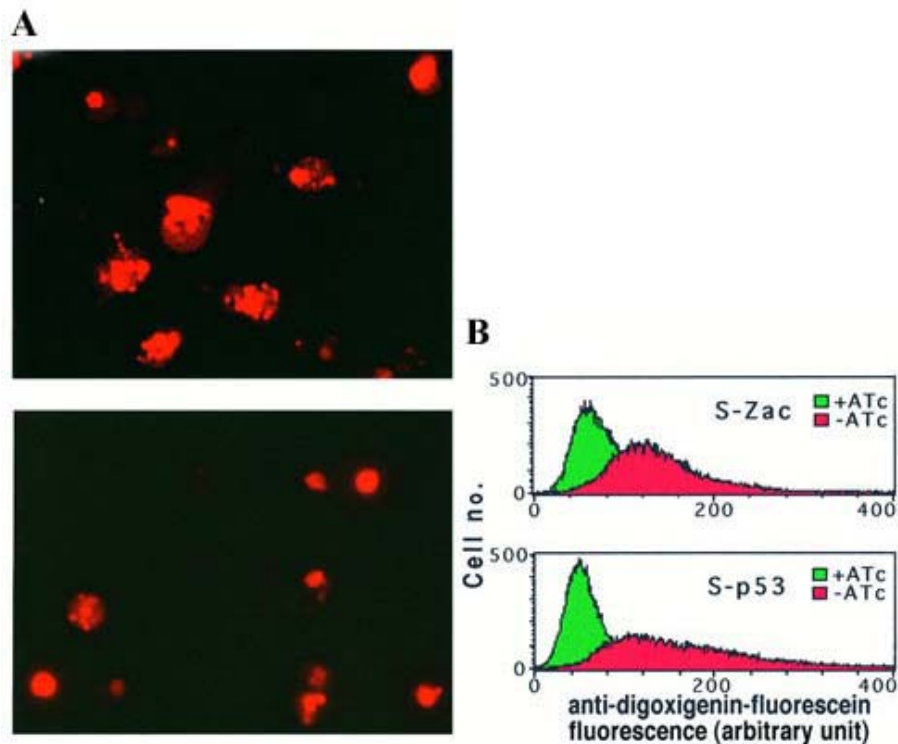


FIGURA 30. Zac1 y p53 inducen la muerte celular apoptótica. (A) Células L-Zac1 (panel superior) y L-p53 (panel inferior) al microscopio de fluorescencia exhiben señales nucleares de apoptosis. Las células son cultivadas en ausencia de ATc durante 3 días. Células en suspensión son recogidas, incubadas con bromuro de etidio y examinadas al microscopio de fluorescencia (510–550 nm, $\times 1000$). (B) *DNA end-labeling*. Las células S-Zac (Zac1) y S-p53 (p53) son cultivadas durante 3 días en la presencia (verde) y en la ausencia (rojo) de ATc. Las células son permeabilizadas y sometidas al *terminal transferase nick end-labeling* en la presencia de *digoxigenin-labeled dUTP* (TUNEL). Las células son después incubadas con *fluorescein-conjugated anti-digoxigenin antiserum* y sometidas a citometría de flujo (Spengler y col., 1997).

5.4. Zac1 como potencial gen supresor tumoral

Zac1 se expresa abundantemente en la glándula pituitaria anterior y moderadamente en las áreas intermedia y posterior (Spengler y col., 1997). Estudios de inmunocolocalización han permitido demostrar que todos los tipos celulares que secretan distintas hormonas en la glándula pituitaria (GH, PRL, LH, TSH, FSH y ACTH) expresan Zac1 (Fig. 31), siendo los niveles de co-localización más altos en las células que producen GH y PRL (Pagotto y col., 1999). Las células de la pituitaria entran en mitosis (o apoptosis) cada 60-70 días, lo que implica un actividad diaria superior al 1.5% (Nolan y col., 1998). Muchos factores parecen implicados en la regulación del número de células mitóticas en la pituitaria anterior, tales como la edad, el sexo, las variaciones cicardianas y la exposición hormonal (Crane y Loomes, 1967; Oishi y col., 1993; Carbajo-Perez y col., 1991).

Para investigar el impacto de Zac1 en la proliferación de las células de la pituitaria, Pagotto y col. (1999) bloquearon los niveles endógenos del gen Zac1 mediante tratamiento de dos líneas celulares de ratón AtT-20 (línea celular granular) y TtT/GF (línea celular agranular) con RNA antisense. Este estudio permitió demostrar que la bajada de los niveles endógenos de

la proteína Zac1 estaba acompañada por un incremento en la síntesis de DNA en las células que expresaban ACTH y FSH, 36% y 50% respectivamente.

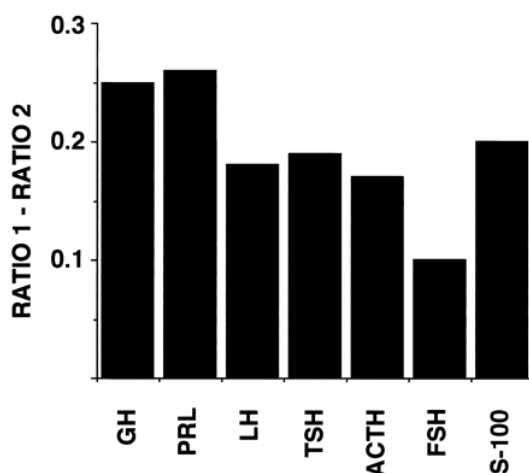


FIGURA 31. Cuantificación de las señales de hibridación para Zac1mRNA en inmunohistoquímicas contra GH, PRL, LH, TSH, ACTH, FSH y S-100, en células de la pituitaria. Las células que expresan GH y PRL son las que muestran mayor número de transcritos para la Zac1 (Pagotto y col., 1999).

Además, los oligonucleótidos antisense contra Zac1 tienen la capacidad de controlar la proliferación celular vía dosis-dependiente, mientras que la utilización de oligonucleótidos antisense mutagénicos eran inertes. Igualmente la expresión de ZAC (gen y proteína) está suprimida o reducida en adenomas no funcionales de la glándula pituitaria, comparativamente con la glándula pituitaria normal de pacientes humanos y con otros tipos de adenomas de la pituitaria (Pagotto y col., 2000), reforzando sus propiedades anti-proliferativas. Además, no se ha encontrado correlación entre la expresión de ZAC y el índice de proliferación o con la capacidad invasiva de los adenomas pituitarios estudiados (Pagotto y col., 2000), sugiriendo que la pérdida de expresión de ZAC puede ser un paso previo en los procesos de transformación de la pituitaria. La ausencia de expresión de ZAC en un tipo muy indiferenciado de tumores pituitarios sugiere que el papel de ZAC no se reduce únicamente a la regulación del crecimiento celular como también a la diferenciación de la pituitaria (Pagotto y col., 2000). Por tanto, Zac1 controla el crecimiento celular en la glándula pituitaria (Pagotto y col., 1999; 2000).

ZAC está localizada en la región 6q24-q25 del cromosoma 6 (Fig. 32), la cuál está frecuentemente delectada en muchos tumores sólidos. La región cromosómica 6q23-q25 es la cuarta más alterada en tumores humanos. La presencia de al menos un TSG en la región cromosómica 6q, y el hecho de que haya pérdida alélica de un 80% en la región 6q23-q25.2, hacen de esta región cromosómica un punto muy importante en los cánceres de mama (Fujii y col., 1996). La pérdida alélica de esta región también ha sido descrita en muchos tipos de cánceres de ovario, en melanomas, en astrocitomas y en carcinomas de las células renales. Además, Abdollahi y col., 1997a,b, aíslan el gen humano de la ZAC a partir de la pérdida de su expresión en la superficie epitelial del ovario de un modelo tumoral, y como tal lo denominan

de Lot, *lost on transformation*. Por tanto, ZAC, al igual que p53, puede actuar como un gen supresor tumoral (Varrault y col., 1998).

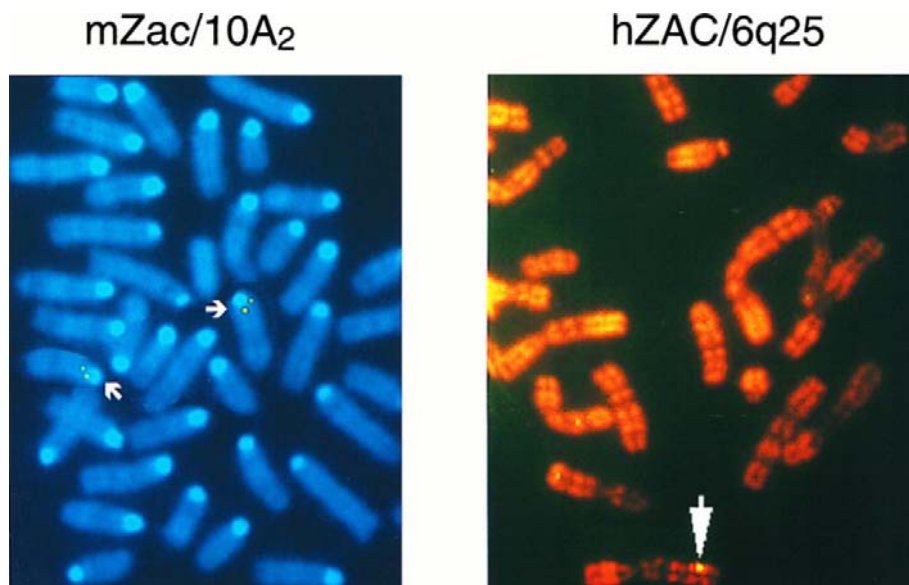


FIGURA 32. Localización cromosómica de mZac y hZAC. El FISH con la sonda Zac1 revela que el gen está localizado en el cromosoma murino 10, banda 10A₂; el FISH con la sonda de ZAC revela que el gen está localizado en el cromosoma humano 6 banda 6q25; (parcialmente modificado de Varrault y col., 1998).

ZAC se expresa en las células epiteliales normales, principalmente en las células más luminales, las cuáles son menos proliferativas (Bilanges y col., 1999). Además, la expresión del gen ZAC se encuentra suprimida o reducida en las líneas celulares de cáncer de mama y en tumores primarios (Bilanges y col., 1999) y en los carcinomas de las células escamosas de la cabeza y del cuello (Koy et al., 2004), así como en los cánceres de ovario (Cvetkovic y col., 2004) y de pulmón (Singhal y col., 2003). Por tanto, la pérdida de la expresión de ZAC, gen con propiedades anti-proliferativas, en las células epiteliales pre-malignas puede contribuir a la iniciación o progresión de los tumores de mama.

El mecanismo más considerado para la inactivación de los TSGs en estos tipos de cánceres, descrito inicialmente para el gen RB, consiste en la pérdida del material cromosómico que alberga uno de los alelos y la mutación conduce a la pérdida de la función del otro alelo (Knudson, 1971, 1985, 1993). Sin embargo, ZAC no está mutado en la región codificante o en las regiones intrónicas que rodean los exones codificantes, lo cuál sugiere otro mecanismo para la ZAC. Los genes TSG inhibidores de las Cdks, *PI6/INK4a/CDK2/MTS1* son inactivados por otros mecanismos, en los cuáles hay silenciación génica o delección homocigótica. Ambos mecanismos han sido sugeridos para la inactivación de ZAC/LOT (Bilanges y col., 1999; Cvetkovic y col., 2004).

La presencia de secuencias ricas en prolina en la proteína ZAC/LOT (Abdollahi y col., 1997a, b), probablemente sugiere una interacción entre ZAC/LOT y otra proteína (Williamson, 1994).

ZAC/LOT puede activar la transcripción de otro gen supresor del crecimiento (proteínas inhibidoras del ciclo celular), de una proteína implicada en la organización del citoesqueleto o en las interacciones célula-célula, o puede actuar en la supresión de un oncogén por la activación indirecta de una proteína represora (Abdollahi y col., 1999).

ZAC/LOT, al igual que otros genes supresores del crecimiento, puede funcionar como un inductor de señales anti-proliferativas parando la progresión a través del ciclo celular. La expresión de *LOT* está reducida después de activar las vías de señalización EGFR en células ROSE normales (Abdollahi y col., 1999). Se ha visto que la pérdida de expresión de *LOT* causada por una transformación maligna o por una estimulación persistente del EGF (superior a 6 horas) puede liberar las células de un estado de quiescencia (Abdollahi y col., 1999). Además, el bloqueo de las vías de señalización de EGFR, mediante inhibidores específicos de MAPK, repone los niveles normales de expresión de *LOT*. Sin embargo, la activación de las quinasas JNK/SAPK y p38/RK no está implicada en la respuesta de *LOT* por EGF. Igualmente, los inhibidores de la PKC son incapaces de bloquear la respuesta de *LOT* por EGF (Abdollahi y col., 1999). Estudios de inmunocolocalización, han permitido demostrar que la mayoría de células que expresan EGFR no expresan ZAC (Pagotto y col., 2000). Sin embargo, una pequeña subpoblación de células expresa ambas proteínas EGFR y ZAC (Fig. 33).

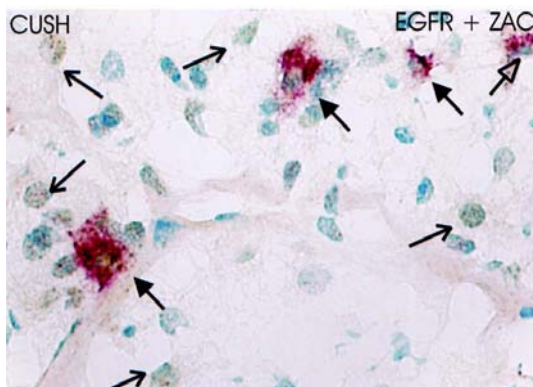


FIGURA 33. Doble inmunohistoquímica para EGFR (tinción roja en los citoplasmas) y ZAC (tinción marrón en los núcleos) en adenomas de Cushing. Las células inmunoreactivas para ZAC pueden ser negativas (←) o positivas (flechas con punta sólida) a EGFR, igualmente encontramos células inmunopositivas a EGFR son negativas a ZAC (flechas con punta abierta) (Pagotto y col., 2000).

El mecanismo de supresión de *LOT* mediada por factores de crecimiento (EGF) es aún desconocida, aunque se cree que cualquier alteración genética o funcional en la región *upstream* (mutaciones en el promotor de *LOT* y/o silenciación por la mutación del gen y/o desacetilación histónica) activaría constitutivamente la vía de señalización mitogénica del EGFR, conduciendo a una reducción o supresión del gene *LOT* (Abdollahi y col., 1999). Contrariamente, la regulación de la reducción o supresión de ZAC en adenomas pituitarios humanos es independiente de la vía EGFR (Pagotto y col., 2000), sugiriendo una regulación de la expresión

de ZAC específica del tejido, similar a lo que pasa con los receptores nucleares, el cuál se desarrollará en el apartado 5.7.2. (Huang y Stallcup, 2000).

Contrariamente a muchos proto-oncogenes, tales como c-Jun, c-Fos y c-Myc, los cuáles presentan una respuesta para una amplia variedad de factores de crecimiento, la supresión parcial o total de la expresión de LOT es aparentemente única y su respuesta solamente se limita a un número limitado de factores de crecimiento (EGF y TGF- α). Es posible que distintos factores de crecimiento usen diferentes vías de señalización (Rani y col., 1997), tales como la vía a través del gen LOT para mediar el crecimiento celular (Abdollahi y col., 1999).

Por tanto, los inhibidores de las vías mediadas por EGFR bloquean la estimulación ejercida por los factores de crecimiento suprimiendo la expresión de *LOT*, lo cuál sugiere un papel de la vía mitogénica en la regulación del gen *LOT*, y que el gen *LOT* es un nuevo miembro de la vía de señalización del EGFR, en la cuál jugaría un papel muy importante como factor de transcripción (*zinc finger*) nuclear que modula la supresión de la progresión tumoral (Abdollahi y col., 1999).

5.5. Actividades transcripcionales de Zac1

La proteína Zac1 es una proteína que se une específicamente al DNA y por ello puede ser capaz de funcionar como un regulador transcripcional de unión al DNA (Kas y col., 1998; Varrault y col., 1998). Zac1 posee actividades de **transactivación** y de **represor**, las cuáles son diferencialmente controladas por unión al DNA (Hoffmann y col., 2003).

Se han identificado 2 sitios de alta afinidad de unión al DNA (G_4C_4 y $G_4N_6G_4$) que operan a través de diferentes mecanismos para controlar las actividades transcripcionales de Zac1. Zac1 se une con alta afinidad a una parte de un elemento repetido directo ($G_4N_6G_4$), actuando como represor, mientras que su unión al elemento palindrómico del DNA (G_4C_4) induce transactivación (Fig. 34).

La dimerización de Zac1 no es indispensable para la función represora transcripcional (sobre el elemento $G_4N_6G_4$), mientras que es muy importante en la función de transactivación sobre los elementos repetidos $G_4N_6G_4$, siendo en este caso los *zinc fingers* 2, 3 y 4 necesarios (Hoffmann y col., 2003).

En la ausencia del dominio C-terminal represor, la proteína Zac1 se une al DNA y permanece transcripcionalmente inactiva, lo que sugiere que la transactivación de Zac1 no está simplemente inhibida por represión pero está activamente oculta (Hoffmann y col., 2003). En este sentido, la naturaleza de la secuencia de DNA a la cuál Zac1 se une, parece regular la respuesta transcripcional, como ya ha sido descrito previamente para los receptores esteroides y tiroideos (Lefstin y Yamamoto, 1998; Hoffmann y col., 2003).

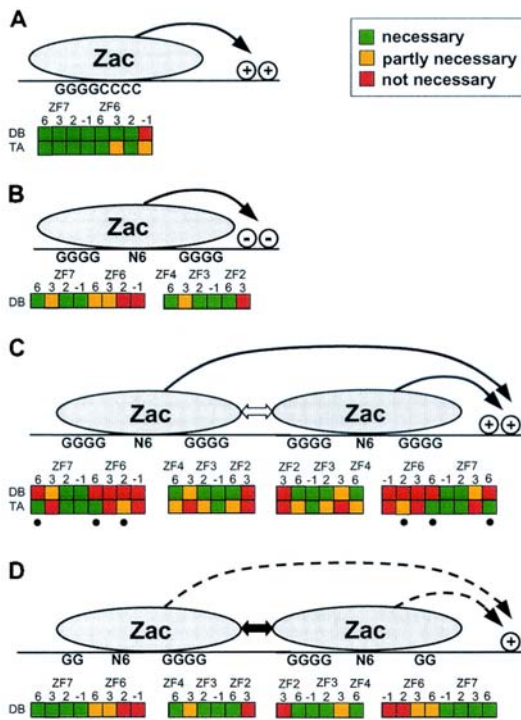


FIGURA 34. Diagrama esquemático de los dominios de unión al DNA y la transactivación de Zac1. (A) Zac1 se une como un monómero al palíndromo G₄C₄ para trans-activarse de una manera dependiente de la orientación. Todos los residuos clave dentro de la α -hélice de los zinc fingers (ZF) 6 y 7 (excepto la posición -1 del zinc finger 6) participan en la unión al DNA (DB) y en la transactivación (TA). La función de cada residuo clave está mostrada en color de acuerdo con su importancia. (B) Zac1 se une a una parte de un elemento repetido directo adquiriendo capacidad de represión en vez de trans-activación. (C) Zac1 se une directamente al elemento repetido (G₄N₆G₄)₂ promoviendo la dimerización a través del ZF 2 (flecha blanca) y la trans-activación. Múltiples ZF's, incluyendo el 2, 3, 4, 6 y 7, contribuyen a la unión al DNA. Los ZF 6 y 7 son esenciales a la trans-activación. (D) Zac1 se une a un elemento repetido reverso (G₂N₆G₄)₂ dependiendo de la dimerización a través del ZF 2 (flecha negra). La trans-activación es largamente encubierta, la cuál está correlacionada con la transición en los contactos amino ácido-base de los residuos clave dentro de las α -hélices de los ZF 6 y 7. Curiosamente los contactos amino ácido-base de los ZF 6 y 7 se conservan entre C y D, sugiriendo un papel directo en la regulación de la trans-activación (Hoffmann y col., 2003).

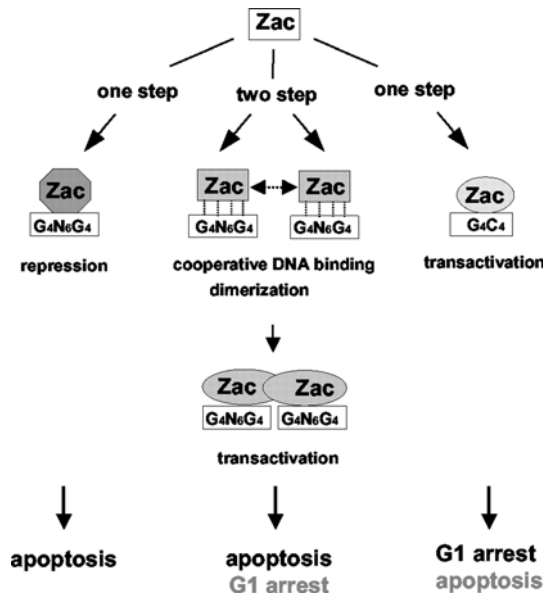


FIGURA 35. Modelo de las actividades biológicas de Zac1 basado en la su unión diferencial al DNA. Zac1 se une a un elemento palindrómico del DNA (en la derecha) induciendo preferiblemente el paro del ciclo celular en fase G₁ más que induciendo la apoptosis, como está ejemplificado por la variante de *splicing* humano ZAC Δ 2, la cuál no posee los ZF's 1 y 2. Contrariamente, Zac1 se une al motivo repetido promoviendo preferentemente la apoptosis (al centro). La represión mediada por Zac1 (en la izquierda) se debe a su unión parcial induciendo la apoptosis (Hoffmann y col., 2003).

Por tanto, distintas conformaciones de Zac1 pueden promover interacciones selectivas con la maquinaria transcripcional, conduciendo tanto a una represión como a una transactivación (Fig. 35), ya que la delección del dominio represor no es capaz de restaurar la transactivación ni la dimerización de Zac1 es suficiente para la transactivación.

Estos resultados soportan el papel de Zac1 como un factor de transcripción aunque en algunos casos pueda jugar un papel como co-activador o co-represor, como hablaremos en el apartado siguiente (Huang y col., 2001; Huang y Stallcup, 2000; Kamiya y col., 2000).

5.6. Co-activación de p53 y relación con la vía apoptótica mitocondrial mediada por p53/Apaf-1.

En ensayos de transfección, la expresión exógena de Zac1 induce la actividad del *reporter gene* asociado a p53, tanto si el promotor es artificial (pG13) como natural (p21 gene), y únicamente en presencia de la p53 funcional, actuando directamente sobre la p53 y no sobre el gen *reporter* (Huang y col., 2001). Además, Zac1 también puede inducir la expresión nativa del gen p21 en células HeLa (Huang y col., 2001).

La co-activación de p53 por Zac1 es dependiente de la concentración de p53: niveles altos de p53 inhiben la acción de Zac1 en muchas líneas celulares, mientras bajos niveles de p53 inducen un mayor efecto de Zac1 como co-activador (Huang y col., 2001). Por otra parte, el efecto co-activador de Zac1 sobre p53 varía de intensidad (entre 6-10 veces) en las diferentes líneas celulares, siendo la intensidad máxima encontrada en las células HeLa. Este dato sugiere que la expresión exclusiva de la proteína HPV-18 E6 (E6.18) en las células HeLa pueda influenciar la actividad de Zac1 (Huang y col., 2001). E6.18 es una proteína que suprime la actividad de la p53 por distintos mecanismos: E6.18 induce la degradación de la p53 mediada por la ubiquitina; se une a p53 y evita que esta se una a genes con elementos de respuesta a p53; y, E6.18 se une a los co-activadores CBP y p300 para inhibir sus actividades (Patel y col., 1999; Zimmerman y col., 1999; Thomas y col., 1999).

El hecho que Zac1 se una a la proteína E6.18 y bloquee específicamente el sitio de unión de E6.18 a p53 *in vitro* (Huang y col., 2001), sugiere que Zac1 evita, por una parte, la degradación de la p53 y, por otra, protege la inhibición del dominio de unión al DNA de la p53 mediada por E6.18 y la activación transcripcional por p53 (Huang y col. 2001).

Por tanto, Zac1 puede cooperar con p53 para el control del ciclo celular y de la apoptosis, y puede ayudar las células a frenar los efectos de las onco-proteínas virales.

Experimentos recientes apuntan a que la actividad pro-apoptótica de la p53 está relacionada principalmente con la vía mitocondrial, la cuál requiere la participación del apoptosoma (Schuler y Green, 2001). Los genes pro-apoptóticos Bax, Noxa y PUMA están implicados en la liberación mitocondrial del citocromo C, el cuál una vez liberado se une a Apaf-1 y a la pro-caspasa-9, formando el apoptosoma. La Apaf-1 es una diana directa de la p53 (Kannan y col., 2001; Moroni y col., 2001), poseyendo el promotor de la Apaf-1 un sitio de unión específico para la p53 (Rozenfeld-Granot y col., 2002). En la mayoría de los casos de melanomas, Apaf-1 está inactivada por metilación de su promotor mientras la p53 está en su

conformación salvaje (Soengas y col., 2001), lo cuál sugiere que Apaf-1 puede ser un efector *downstream* de la p53 conduciendo a la apoptosis.

La transactivación del promotor de la Apaf-1 por la p53 puede estar fuertemente acentuada por la presencia de Zac1, sin embargo sin la presencia de p53 Zac1 no tiene cualquier efecto sobre el promotor de la Apaf-1. Por tanto, Zac1 se comporta como un co-activador de la p53 en la activación de la Apaf-1 (Rozenfeld-Granot y col., 2002).

Analizando la secuencia *upstream* del primer exón codificante (el exón 8) de *Zac1* se observa la existencia de un sitio de unión específico para la p53, el cuál consiste en 20 nucleótidos dispuestos en dos decámeros homólogos que están conservados en otros genes, tales como en MDM2, GADD45 y IGFBP3 (Rozenfeld-Granot y col., 2002; Varrault y col., 2001; el-Deiry y col., 1992). Además, en el promotor de Apaf-1, concretamente en la región *upstream* del sitio de unión de la p53, se pueden encontrar tres posibles sitios de unión para la Zac1, lo cuál demuestra que Zac1 puede unirse tanto a p53 como a Apaf-1, y de esta forma actuar como un co-activador de la actividad de p53/Apaf-1.

Por tanto, Zac presenta un papel dual como **factor de transcripción, co-activador y/o co-represor**, y la identificación de los genes diana para Zac1 puede permitir avanzar sobre su papel en la proliferación y en el metabolismo, así como en las patologías donde su expresión se encuentra alterada, neoplasia y diabetes.

5.7. Genes inducidos o que interactúan con Zac1/ZAC

Aunque los genes regulados directamente por ZAC aún no han sido identificados, se sabe que el factor de transcripción Zac1/ZAC induce la expresión del receptor PACAP-R1 (Spengler y col., 1997), y se une directamente a los receptores nucleares, así como a los co-activadores de los receptores nucleares (Huang y Stallcup, 2000).

5.7.1. PACAP y PACAP-R1

PACAP es un péptido de 38 aminoácidos aislado inicialmente como un factor hipotalámico que potencialmente incrementaba los niveles de cAMP en las células de la pituitaria, y que ejerce efectos pleiotrópicos por todas partes del cuerpo. Además, se ha encontrado ampliamente expresado en el sistema nervioso central y periférico. PACAP posee un 70% de homología con VIP, y es un miembro de la familia de péptidos que también incluye la VIP, secretina, el glucagón, y los factores de liberación de las hormonas de crecimiento (Vaudry y col., 2000). Los miembros de esta familia son conocidos como hormonas y/o neuromoduladores, sin embargo, PACAP y VIP han trascendido estas funciones y juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro. PACAP, así como sus receptores (PACAP-R1, VPACAP-R1 y VPACAP-R2), se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario del cerebro, concretamente en los sitios de neurogenesis (para revisión véase Zhou y col., 2002, y Waschek, 2002).

PACAP38 modula la liberación de las hormonas de la glándula pituitaria y de las catecolaminas de la glándula adrenal (Arimura y Shioda, 1995), así como estimula la neuritogénesis (Deutsch y Sun, 1992), regula la mitosis de los neuroblastos (Nicot y DiCicco-Bloom, 2001), y promueve la salida de las células precursoras neuronales del ciclo celular (Lu y DiCicco-Bloom, 1997). PACAP actúa como un factor hipofisiotrópico, principalmente a través de la activación del receptor PACAP-R1 (Arimura y Shioda, 1995; Rawlings y Hezareh, 1996), el cuál está regulado por las hormonas esteroideas, tanto en el hipotálamo y en la glándula pituitaria como en las células granulosas del ovario (Ko y Park-Sarge, 2000). Además, PACAP previene la muerte neuronal en embriones de pollo, en cultivos celulares hipocámpales infectados con HIV gp120 y en la muerte celular inducida por isquemia (Arimura, 1998; Uchida y col., 1996). En este sentido, *PACAP-R1* se encuentra sobre-expresado en ratones tras una isquemia cerebral focal transitoria (Guillardon y col., 1998).

En el sistema nervioso periférico, PACAP-38 se expresa en las células neurales de los islotes pancreáticos, y sirve como un amplificador endógeno de la secreción de insulina inducido por la glucosa (Nakata y Yada, 2004; Shintani y col., 2003). Por tanto, PACAP es un potente inductor de la producción y secreción de insulina, actuando a través del receptor PACAP-R1 en el páncreas (Ciani y col., 1999).

La región *upstream* del gen PACAP-R1 posee varios sitios de unión *consensus* para conocidos factores de transcripción: AP-1, C/EBP, CREB, c-Ets, NF-1, p53, STAT, y para la familia de receptores de la hormona esteroide (Rodríguez-Henche y col., 2002).

Zac1, al igual que la p53, induce la expresión del gene PACAP-R1 (Fig. 36), como respuesta a la activación del cAMP mediada por los ligandos PACAP38 y PACAP27 (Spengler y col., 1997; Hoffmann y col., 1998). Curiosamente, P53 y Zac1 regulan la expresión del gen *PACAP-R1* también en tejidos donde este gen no está frecuentemente expresado (Ciani y col., 1999). La transactivación del gen *PACAP-R1* por Zac1 y p53 muestra el sutil equilibrio entre la promoción de la muerte celular y las actividades protectoras (Ciani y col., 1999). Bajos niveles de p53 y Zac1 provocan el paro en G1 de los tejidos en proliferación, e inducen *PACAP-R1* en las neuronas post-mitóticas lesionadas, posiblemente para prevenir su re-entrada en el ciclo celular. Contrariamente, altos niveles de p53 y Zac1 pueden conducir a una extensiva apoptosis y debilitan la regulación de PACAP-R1 (Ciani y col., 1999).

El gen *Zac1*, juntamente con el gen *PACAP-R1*, se sobre-expresan 24 horas después de una isquemia cerebral focal transitoria, principalmente en la corteza frontal-parietal y en el *caudate putamen*, alcanzando un pico hasta las 72 horas después (Guillardon y col., 1998). Sin embargo, en el giro dentado hay inducción de PACAP-R1 sin haber inducción de Zac1, lo que sugiere que la expresión basal de PACAP-R1 es independiente de Zac1 (Guillardon y col., 1998). La activación tardía de Zac1 estaría posiblemente vinculada con la inducción de los mecanismos de apoptosis (Spengler y col., 1997). Por tanto, la co-inducción de PACAP-R1 y

Zac1 apunta a un papel en conjunto de ambos genes en los procesos de protectores/restaurativos tras una lesión isquémica.

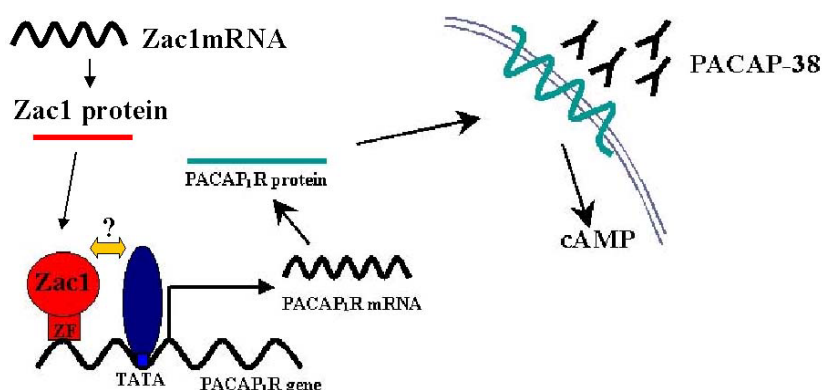


FIGURA 36. Modelo esquemático para la transactivación del plásmido *reporter* de respuesta al cAMP por Zac1, a través de la inducción del gen PACAP-R1. La expresión de Zac1 conduce a que la proteína se una al DNA a través de sus dominios de unión al DNA en la región promotora del gen PACAP-R1, lo cual regula la expresión del gen PACAP-R1. Los mRNA's de PACAP-R1 se traducen en la proteína receptora, la cual es incorporada en la membrana celular. La unión del ligando PACAP al receptor PACAP-R1 provoca la interacción con proteínas G acopladas positivamente a la adenilato-ciclasa induciendo un aumento de los niveles intracelulares de cAMP, los cuales provocan a su vez una inducción del *reporter gene* asociado a cAMP, cuya actividad puede ser medida por la actividad de la luciferasa. (parcialmente modificado de Hoffmann y col., 1998).

La transactivación de PACAP-R1 por Zac1 puede estar relacionada por su simultánea expresión en los neuroepitelios durante la formación del sistema nervioso central, y en su capacidad para controlar el crecimiento celular y la diferenciación (Rodríguez-Henche y col., 2002).

Zac1 se une a motivos ricos en GC de los elementos reguladores del promotor de PACAP-R1, ejerciendo una regulación tanto positiva como negativa del promotor (Rodríguez-Henche y col., 2002). Por tanto, el promotor de PACAP-R1 actúa como una diana del factor de transcripción Zac1, y, en este sentido, Zac1 puede jugar un papel crucial en los procesos de adaptación neuronal y endocrina, mediante la regulación del gen *PACAP-R1* (Rodríguez-Henche y col., 2002).

5.7.2. Receptores nucleares

Estudios de activación transcripcional por receptores hormonales nucleares han permitido demostrar que la Zac1 se une al dominio de activación en el C-terminal del co-activador de receptores nucleares GRIP1 (Huang y Stallcup, 2000) (Fig. 37). Zac1 puede actuar como un co-activador o represor transcripcional de receptores nucleares activos (incluyendo los receptores α del estrógeno y los receptores andrógenos) en células HeLa, así como en otros tipos de células (Huang y Stallcup, 2000). Los mecanismos por los cuales Zac1 actúa como un co-factor de los receptores nucleares están mediados por su capacidad de unirse directamente a

los receptores nucleares, así como también por su capacidad en unirse a dos clases de co-activadores de receptores nucleares: a los co-activadores p160 y a la familia de co-activadores CBP/p300 (Huang y Stallcup, 2000). Funcionalmente, Zac1 es semejante al co-activador p/CAF, una histona acetiltransferasa que intensifica la función de los receptores nucleares al unirse a los co-activadores p160 y CBP.

Los dominios de unión al DNA de los receptores nucleares son flanqueados por dos dominios de activación transcripcional: AF-2 (altamente conservado entre los receptores nucleares y su actividad es dependiente de las hormonas) y AF-1 (no tiene homología entre los receptores nucleares, su actividad es independiente de las hormonas y actúa sinérgicamente con el dominio AF-2). Zac1 se une al dominio AF-2 directamente y su capacidad para inducir la actividad de los receptores andrógenos/AF-2 es relativamente independiente de GRIP1. Contrariamente, Zac1 es incapaz de unirse a los receptores andrógenos/AF-1 y su capacidad para inducir la actividad de estos receptores está dependiente de GRIP1 (Huang y Stallcup, 2000).

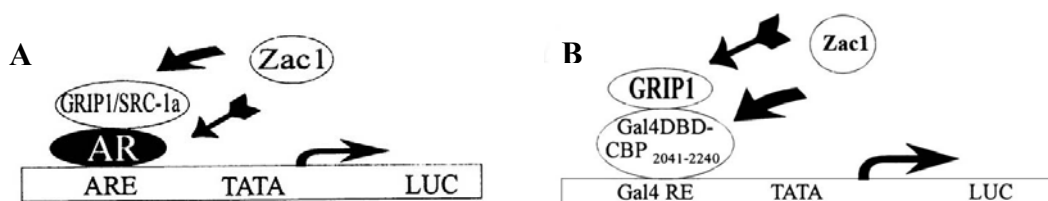


FIGURA 37. Mecanismos propuestos para la activación del *reporter gene*: (A) reclutamiento de la proteína mZac1 para el complejo de transcripción, pudiendo mZac1 unirse tanto a AR como a GRIP1; ARE, elementos de respuesta a los andrógenos en el promotor MMTV; TATA, TATA box del promotor MMTV; LUC, región codificante-luciferasa; flecha hacia la derecha, sitio de comienzo de la transcripción; (B) reclutamiento de la proteína mZac1 para el complejo de transcripción, pudiendo mZac1 unirse tanto a GRIP1 como a CBP. Gal4RE, elementos de respuesta a Gal4 en el promotor GK1; TATA, TATA box del promotor GK1; LUC, región codificante-luciferasa; flecha hacia la derecha, sitio de comienzo de la transcripción (parcialmente modificado de Huang y Stallcup, 2000).

Muchos co-activadores de los receptores nucleares usan los motivos LXXLL para unirse e inducir las funciones del dominio AF-2 de los receptores nucleares, sin embargo Zac1 debe de usar otro mecanismo, ya que su único motivo LXXLL está en la región C-terminal, la cual no es esencial para su unión a los receptores nucleares (Huang y Stallcup, 2000).

Lo más inusual de Zac1 es su polaridad funcional, ya que es uno de los co-activadores de los receptores nucleares más potentes que se conoce hasta la fecha, sin embargo **funciona selectivamente como un co-factor de los receptores nucleares**: unas veces funciona como co-activador; otras funciona como represor; y otras funciona como una proteína neutral.

Zac1, al igual que yin yang 1 (YY1), puede actuar como co-activador o co-represor de los receptores nucleares, dependiendo del tipo de receptor nuclear, de la línea celular, así como del *reporter gene* usado (Huang y Stallcup, 2000). Por tanto, la naturaleza de la función de Zac1 es dependiente de las interacciones funcionales con las proteínas específicas de cada tipo celular. En este sentido, Zac1 y YY1 tienen la capacidad de unirse a diferentes proteínas así

como a secuencias específicas de DNA, actuando en algunos casos como factores de transcripción de unión al DNA y, en otros casos, como co-factores que son reclutados hacia el promotor principalmente a través de las interacciones proteína-proteína, que de las interacciones proteína-DNA.

5.8. Diabetes mellitus neonatal transitoria (TNDM)

La diabetes mellitus neonatal transitoria (TNDM) es una forma rara de diabetes infantil, la cuál se desarrolla hacia las 6 primeras semanas de vida, observándose signos de recuperación hacia los 18 meses de edad. Estos neonatos tienen una fuerte predisposición en desarrollar la diabetes mellitus del tipo 2 en la vida adulta. Por tanto, esta patología se desarrolla en tres fases: fase 1, diabetes neonatal; fase 2, aparente remisión; y fase 3, diabetes mellitus tipo 2 (para revisión véase Temple y Shield, 2002).

La TNDM está asociada con un retraso en el crecimiento intrauterino, deshidratación, y ausencia de insulina ocasionada por la sobre-expresión de un gen maternalmente *imprinting*, el cuál está localizado en la región cromosomal 6q24.1-q24.3, entre los marcadores D6S1699 y D6S1010 (Arima y col., 2000). Esta región cromosomal está implicada, a su vez, en el desarrollo y/o maduración de las células β pancreáticas, así como en la homeostasis general de la glucosa (Ferguson y Milner, 1970). Pacientes con TNDM exhiben disomía uniparental paternal del cromosoma 6, duplicación paternal de la región crítica, o un defecto en la metilación *imprint* en el cromosoma 6 (Arima y col., 2001; Gardner y col., 2000).

El *imprinting* genómico es una marca epigenética de origen parental que resulta en la expresión monoalélica de un gen (para revisión véase Falls y col., 1999). Los mecanismos de *imprinting* son complejos y aún no están bien elucidados, sin embargo diferentes estudios sugieren que la metilación parental específica de los dominios ricos en CpG (islas CpG) funciona como una marca de *imprint*, la cuál se establece durante la gametogénesis, pudiendo ser borrada en las líneas germinativas cuando transmitidas a través de individuos de sexo opuesto, pero se mantienen durante la división celular somática (Fig. 38). Por tanto, el *imprinting* genómico se define como una modificación gameto-específica que causa la expresión diferencial de los dos alelos del gen, en las células somáticas.

Los genes *imprinted* (Fig. 39) tienen características muy particulares: se localizan en regiones dentro o cercanas a las islas CpG, poseen centros de *imprinting* (IC), forman clusters dentro de las islas CpG con otros genes, y son reprogramados por mecanismos de metilación/desmetilación (para revisión véase Reik y col., 2001, y Reik y Walter, 2001).

Dos *imprinted* genes han sido identificados en la región cromosomal 6q24.1-q24.3: **ZAC**, implicado en el paro del ciclo celular y en la apoptosis, y **HYMAI**, el cuál codifica un mRNA no traducido (Arima y col., 2000; Gardner y col., 2000; Kamiya y col., 2000).

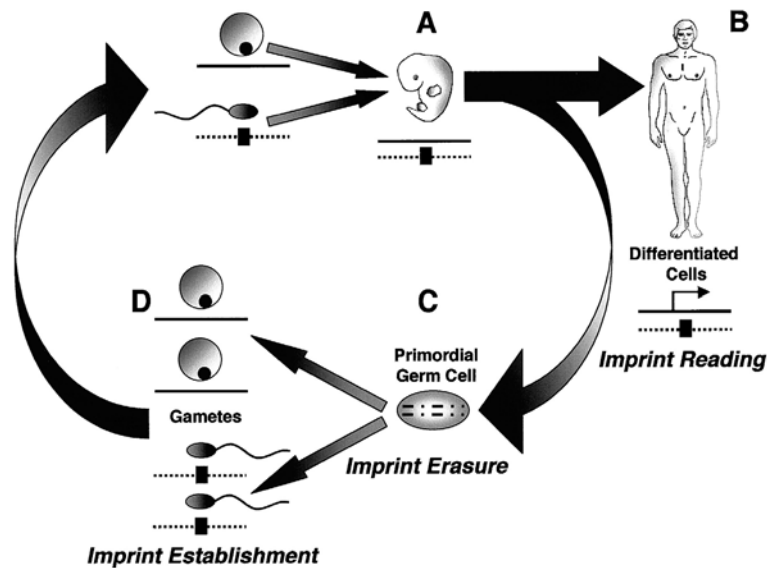


FIGURA 38. Establecimiento y progresión de *imprint* durante la gametogénesis y el desarrollo. El alelo paternal (línea discontinua) está *imprinted* y el alelo materno está expresado (línea continua). La marca *imprint* (cuadrado negro) representa una metilación parental específica establecida durante la gametogénesis. **A:** Los genomas materno y paterno tienen diferentes patrones de *imprint* después de la fertilización. **B:** Ambas marcas de *imprint* y la lectura de *imprint* se mantienen durante la división celular somática. **C:** Los *imprints* parentales específicos son borrados en las células germinativas primordiales. **D:** Las marcas de *imprint* apropiadas se reestablecen para la generación siguiente (Falls y col., 1999).

ZAC y HYMAI codifican distintos mRNA's (aunque forman parte de la misma unidad de transcripción), se expresan en páncreas y definen un nuevo cluster de los genes *imprinted* (Arima y col., 2000). Por tanto, se cree que HYMAI/ZAC puedan ser genes candidatos a la TNDM, jugando un papel importante en esta patología.

En 1999, Bilanges y colaboradores mostraron que el estado de metilación de ZAC es crítico para su expresión, ya que el tratamiento con azacytidine (inhibidor de la DNA metiltransferasa) permite la re-expresión de ZAC en 40% de las líneas celulares del epitelio mamario tumoral, donde ZAC se encontraba reducido o suprimido. El estudio del *imprinted* locus ha permitido mostrar que ZAC es un gen *imprinted* en tejidos fetales, lo cual aporta fuertes evidencias de su implicación en la TNDM (Kamiya y col., 2000). En fibroblastos de pacientes con TNDM, hay una sobre-expresión de ZAC y HYMAI como consecuencia de la expresión bialélica (los dos alelos están desmetilados) de ambos genes (Mackay y col., 2002). Además, la pérdida de la función de ZAC/LOT está asociada con tumores, ya que mutaciones epigenéticas resultantes de la metilación del centro de *imprinting* ZAC/LOT puede contribuir al cáncer (Arima y col., 2001; Abdollahi y col., 2003). En este sentido, LOT está sujeta a dos procesos epigenéticos: la metilación de las islas CpG, y la desacetilación histónica, los cuales pueden actuar sinérgicamente para regular la silenciamiento transcripcional del gen (Abdollahi y col., 2003).

Mouse imprinted genes, regions and phenotypes

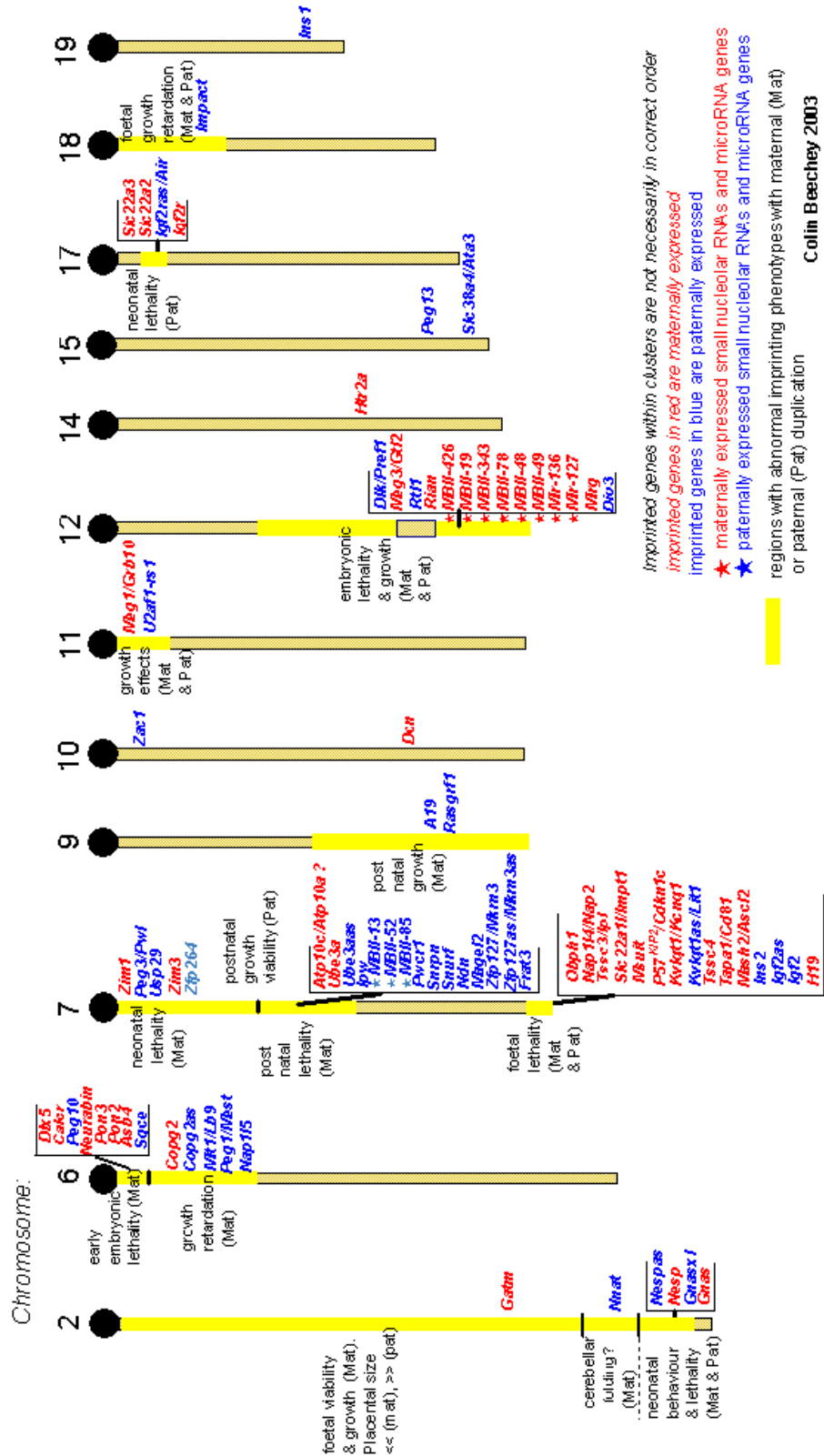


FIGURA 39. *Imprinted Genes* del ratón, regiones cromosómicas y fenotipos (www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting/imprin-contact.html)

La región cromosomal 6q24-q25 posee 8 islas CpG, y se ha demostrado que la metilación *imprint* reside en la isla CpG2. La región promotora de ZAC reside en esta región diferencialmente metilada (Fig. 40), concretamente en la región del exón I, y su estado metilado silencia la actividad del promotor (Varrault y col., 2001; Arima y col., 2001).

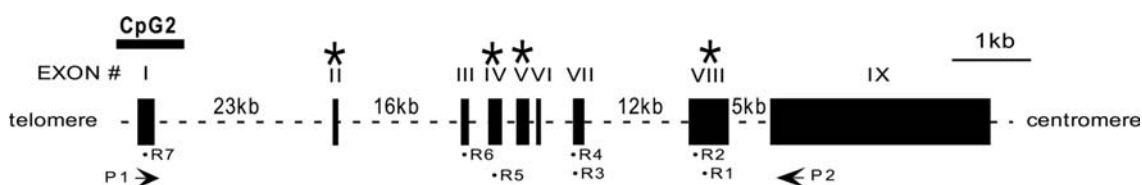


FIGURA 40. Organización genómica de ZAC. La secuenciación de clones RACE ha indicado la presencia de 9 exones, para los cuáles las coordenadas de las secuencias son dadas de acuerdo con la numeración de los PACs 340H11 y 468K18 (*ZAC* es antisense para estas secuencias publicadas). Como hay distintos sitios de iniciación de la transcripción, el tamaño del exón I varía entre 160 y 320 bp. Los exones II, IV, V y VIII están alternativamente *spliced* (indicados con un asterisco). El sitio de iniciación de la traducción está localizado en el exón VIII. La isla CpG está indicada, así como la localización de los primers usados para el RACE (*R1-R7*) y RT-PCR (*P1* y *P2*) (parcialmente modificado de Varrault y col., 2001).

La marca de metilación en el alelo maternalmente *imprinted* reprime la transcripción de *ZAC*, mientras que la región del promotor CpG2/*ZAC* desmetilada conduce a la expresión del alelo paternal (Gardner y col., 2000; Arima y col., 2000; Varrault y col., 2001). Un mecanismo similar ha sido postulado para el gen *Zac1*, el cuál también está paternalmente expresado, pero no es reactivado por la inhibición de la histona desacetilasa como ocurre con *LOT* (Varrault y col., 2001; Abdollahi y col., 2003). Además, la isla CpG reside en la extremidad 5' del *Zac1*, donde el alelo materno está metilado análogamente en el gen humano (El Kharroubi y col., 2001). Se desconoce aún la localización del IC que controla el grado de metilación del promotor de *ZAC*. Dos modelos de *imprinting* han sido propuestos: en uno, la región diferencialmente metilada está localizada dentro de un intrón (lo que ocurre con el gen *Igf2r*), lo cuál no se aplica a *ZAC*, ya que la región diferencialmente metilada está dentro de un exón; en otro, la región diferencialmente metilada se localiza entre dos genes unidos por regulación de la proteína *zinc finger* CTCF, lo cuál tampoco ocurre con *ZAC*. Por tanto, el modelo usado por *ZAC* es diferente de los descritos hasta el momento (Varrault y col., 2001).

Se desconocen aún las proteínas y/o genes diana del factor de transcripción *imprinted* *LOT/ZAC*, sin embargo un análisis de la secuencia conservada dentro de la isla CpG2 murina ha permitido identificar posibles sitios de unión para XBP1 (principal regulador transcripcional de respuesta al *unfolded protein*), Sp1 (implicado en la regulación del crecimiento celular y en el cáncer, así como en la regulación de la insulina), E2F (implicado en el control del ciclo celular y en la supervivencia), HNF4 (regulador de la diferenciación y función de los hepatocitos), GFI1 (proto-oncogén) y VDR RXR2 (implicado en el patrón y determinación celular) (Smith y col., 2002) (Fig. 41), los cuáles también son comunes a la secuencia humana.

insulina actuando a través de PACAP-R1 en el páncreas, el cuál está regulado por *Zac1* (Ciani y col., 1999). PACAP se produce en las células neurales del páncreas, siendo un potente regulador autocrino que libera insulina en función de la concentración de glucosa (Yada y col., 1998; Filipsson y col., 1999). En este sentido, *Zac1* estaría implicada en la TNDM como resultado de la expresión de PACAP-R1 en los islotes pancreáticos (células beta) (Kamiya y col., 2000). Estudios recientes con ratones transgénicos que desarrollan la TNDM refuerzan estos datos (Ma y col., 2004). Estos animales presentan cambios en la homeostasis de la glucosa, alteraciones en el desarrollo normal y en la diferenciación de los islotes pancreáticos, como ocurre en la TNDM en humanos. Los animales embrionarios presentan una sobre-expresión de los genes que se localizan en el TNDM locus (*ZAC/HYMAI*), y consecuentemente muestran reducciones en la expresión de factores de diferenciación endocrinos y en el número de estructuras teñidas para la insulina (Ma y col., 2004). Sin embargo, la masa de células β es normal o elevada durante todos los estadios del desarrollo postnatal, mientras que el contenido de insulina pancreático en los neonatos, o tras infusiones experimentales de glucosa, se encuentran reducidos. Por tanto, una sobre-expresión de *ZAC* puede provocar la TNDM a través de su función como regulador del paro del ciclo celular y de la apoptosis, alterando el número absoluto y la eficiencia de las células isletas β durante la fase crítica del desarrollo pancreático en el útero (Varrault y col., 1998; Ma y col., 2004).

Por ello, todos estos datos sugieren que el gen *ZAC* está sometido a un control riguroso, tanto a nivel transcripcional, a través del *imprinting*, como a nivel funcional, a través de *splicing* alternativo.

OBJETIVOS

1. Estudio de la expresión de *Zac1* durante el desarrollo y la maduración del sistema nervioso central del ratón.

Estudios previos han demostrado que *Zac1* se expresa en el cerebro adulto (Spengler y col., 1997) y en las vesículas telencefálicas durante el desarrollo embrionario (E9-E11.5) (Piras y col., 2000). Sin embargo, no hay un estudio celular de las áreas cerebrales que expresan *Zac1* durante el desarrollo. Por ello, en este objetivo, mediante técnicas de hibridación *in situ* (mRNA) e inmunohistoquímicas, pretendemos determinar en que áreas cerebrales se expresa *Zac1* durante la formación, desarrollo y maduración del sistema nervioso central.

2. Caracterización de las células que expresan *Zac1* durante el desarrollo y en adulto.

Para llevar a cabo este estudio, pusimos a punto técnicas dobles de detección en las que combinamos la hibridación *in situ* con la inmunohistoquímica, así como dobles técnicas de inmunohistoquímica. Dado que *Zac1* es una proteína anti-proliferativa que induce, independientemente, el paro del ciclo celular y la apoptosis (Spengler y col., 1997), para abordar este estudio usamos distintos marcadores de subpoblaciones neuronales y gliales, así como distintos marcadores proliferativos y apoptóticos.

3. Estudio de la función apoptótica de *Zac1* en modelos convulsivos que inducen neurodegeneración.

Con el objetivo de determinar el papel de *Zac1* en los procesos apoptóticos, creamos distintos modelos convulsivos en ratones adultos, mediante técnicas de hibridación *in situ*, histoquímicas e inmunohistoquímicas, evaluamos el patrón de expresión de *Zac1* y el patrón de daño celular.

4. Estudio del fenotipo cerebral del ratón adulto mutante para *Zac1*. Función de la proteína anti-proliferativa *Zac1* en el sistema nervioso central.

Distintos estudios han demostrado el papel de *Zac1/ZAC* en la pituitaria (Spengler y col., 1997; Varrault y col. 1998; Pagotto y col., 1999), en el páncreas (Piras y col., 2000; El Kharroubi y col., 2001; Varrault y col., 2001; Ma y col., 2004), y en distintos tipos de cánceres (Koy y col., 2004; Singhal y col., 2003; Pagotto y col., 2000; Bilanges y col., 1999). Sin embargo, su papel en el sistema nervioso central permanece aún desconocido. Por ello, un estudio neurohistológico del ratón mutante para *Zac1* pretende elucidar que función o que funciones juega esta proteína anti-proliferativa en el tejido nervioso.

RESULTADOS
