



UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



FACULTAD DE
VETERINARIA

“Nueva estrategia para una futura terapia génica en enfermedades neurodegenerativas de la motoneurona: Producción y estudio funcional de factores neurotróficos fusionados al fragmento C de la tóxina tetánica”

Universidad de Zaragoza-Facultad de Veterinaria

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

**Memoria presentada por D. Jesús Ciriza Astrain
para optar al Grado Doctor en Veterinaria**

Zaragoza Septiembre de 2003



Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza

Miguel Servet, 177
50013 – ZARAGOZA

Tfnos: 976-761620 y 761000 (Ext. 4203)
FAX: 976-761612

Dña. **Rosario Osta Pinzolas** , Profesora Titular del Departamento Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**Nueva estrategia para una futura terapia génica en enfermedades neurodegenerativas de la motoneurona: Producción y estudio funcional de factores neurotróficos fusionados al fragmento C de la toxina tetánica**" recogida en la presente Memoria, y de la que es autor el Licenciado D. **Jesús Ciriza Astrain**, ha sido realizada bajo mi dirección, en los laboratorios y dependencias del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, y cumple las condiciones exigidas para que su autor pueda optar al Grado de Doctor en Veterinaria.

Lo que suscribo como Directora del trabajo, en Zaragoza a veinticinco de Septiembre de 2003.

Fdo. Rosario Osta Pinzolas.

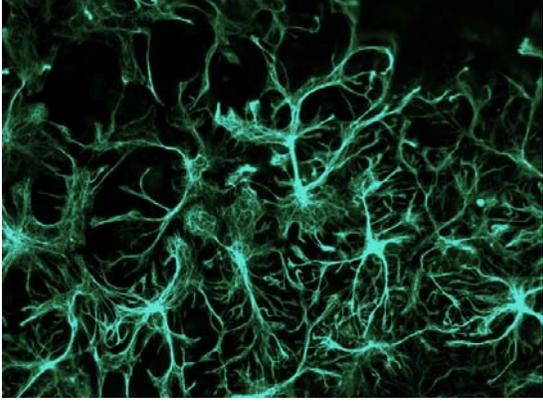
El trabajo realizado en la presente Memoria de Tesis Doctoral se ha financiado por los proyectos "Creación de proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la motoneurona" (D.G.A P074/2001), " Vectores de terapia génica en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica:utilización del fragmento C de la toxina tetánica y factores neurotróficos" (F.I.S. PI020840), Investigación en Red de las enfermedades neurológicas (F.I.S C03/06) y Grupos Consolidados del Gobierno de Aragón.

El doctorando ha sido financiado mediante una beca predoctoral del Gobierno de Navarra y Gobierno de Aragón.

*¿Tu verdad? No, la Verdad,
y ven conmigo a buscarla .
La tuya guardatela.*

Antonio Machado.

En memoria de mi padre y muy en especial a mi madre.



AGRADECIMIENTOS

Con toda seguridad este es el apartado más dificultoso de escribir ya que son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su ayuda tanto de forma directa como indirecta en la realización de este trabajo. Espero no olvidarme de ninguno de vosotros.

Para empezar me gustaría resaltar a Txarito. Primero por su dirección en el presente trabajo pero en segundo lugar y sobretodo por su sincera amistad. Haber compartido estos años de trabajo y amistad han hecho que valga la pena el esfuerzo realizado. También quiero dar las gracias:

A Pilar Zaragoza, por tener siempre el consejo adecuado en cada momento, Don Isaías Zarazaga por ser un ejemplo de trabajo y perseverancia, Clementina Rodellar por estar dispuesta a escucharme siempre en todo momento y aunque desde otro laboratorio, María Jesús por su constante optimismo.

Muy especialmente a Inma y a David por vuestra paciencia y ayuda. Además de haberme demostrado constantemente vuestra sincera amistad tanto fuera como dentro del laboratorio, sin la ayuda que me habéis ofrecido nunca hubiera finalizado este trabajo. Gracias chicos.

A todas las personas que se encontraban en el laboratorio cuando llegué y que me acogieron, Jorge, Javi, Rosa, Eva, Carmen, Mamen, Salvador y a todos los que posteriormente han ido llegando, Laurita, Odalys, Jaber, Laura Ordovás, Manolito, Alex, Arianne y María por dar ese toque fresco al laboratorio que siempre viene bien. También a las chicas del regional y del nacional, Silvia y Nuria, por su ayuda y alegría y como no a todos aquellos que aunque no trabajan en el laboratorio de genética siempre están por allí: Imanol, Antonio, Esther y Rosa Bolea.

Gracias a este proyecto tuve la oportunidad de realizar una estancia en el Institute Pasteur de París donde encontré compañeros y amigos muy buenos en el laboratorio de Embriologie moleculaire. En primer lugar querría agradecer a Philippe Brûlet por haberme aceptado en su laboratorio para poder desarrollar este trabajo, y como no a Rafa, Kelli, Pascal, Spencer y Cendra con los que aprendí

que el compañerismo y la amistad también se pueden encontrar a pesar de las dificultades de comunicación.

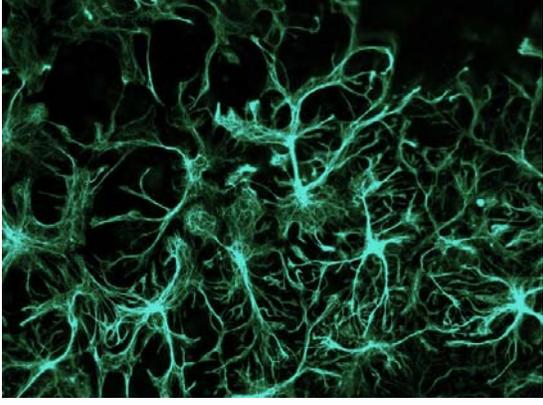
Pero no solamente la gente con la que he colaborado en el laboratorio es la que me ha apoyado día tras día y por eso quiero mencionar a todos los amigos de Zaragoza por estar siempre ahí dispuestos a escucharme y animarme. Gracias a César, Nuria, Rafita, Belén, Raul, Lina, Elena, Reyes, Arantxa, Alvaro, Jorge, Patricia, Jose Antonio, Oto, M^a Eugenia, Alvarito, Pili, Clarita, Conchita y M^a Jesús por todo.

También a todos los amigos que se encuentran en Pamplona y en Cortes y que cada vez que voy tienen que aguantarme, Susana, Javi, Estitxu, German, Bea, Yi Yin, Ramontxo, Joquin, Natalia y Raquel.

Pero además debo mencionar a los nuevos amigos que encontré en París que hicieron mi estancia más llevadera y agradable. Gracias a Virginie, Vania, Alex, Regina, Tiago, Luis, Vizenza, Mateu, y como no a Thomas y Marcos con los que aprendí mucho más que ciencia.

Bueno y finalmente a mi familia que siempre me apoya en todo lo que hago a todos los niveles y de los que me siento muy orgulloso. Gracias a mi tío Aristoteles Aristides, mi mecenas y todo un padre para mí. Gracias a mi madre M^a Carmen, por su constante apoyo, simplemente gracias por todo. Gracias a mi hermanita Cristina, por su constante ánimo. A los que ya no están, mi padre y mi abuelita Teresa, que me apoyaron hasta el último momento, y a todos los nuevos integrantes de la familia que por cierto se han ido incorporando durante el desarrollo de este trabajo, algunos un poquito antes como mi cuñado Juan Mari y mis sobrinitos Haizea e Iker, y otros durante, como mi sobrinita Josune y nuestro Josetxo que han dado un toque de alegría y frescor a todos. Muchas gracias a todos de corazón ya que sin vosotros no podría haber acabado todo lo que en este trabajo describo.

Un beso enorme a todos.



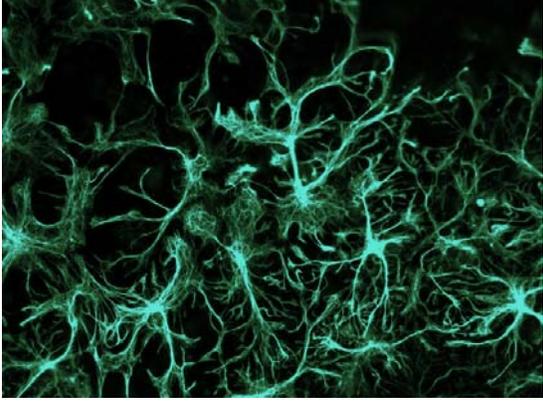
INDICE

Indice	i
Resumen	vii
1.- Introducción.	1
1.1- Antecedentes.	3
1.2- Objetivos.	5
2.- Revision bibliografica.	7
2.1.- Esclerosis Lateral Amiotrofica.	9
2.1.1.- Definición.	9
2.1.2. Etiología de la enfermedad.	10
2.1.2.1. Etiología genética.	10
2.1.2.2. Etiología esporádica.	11
2.1.3. Diagnóstico y lesiones.	15
2.1.4. Mecanismos de patogenicidad.	17
2.1.4.1. Toxicidad inducida por SOD-1.	17
2.1.4.2. Desorganización de filamentos intermedios.	20
2.1.4.1. Homeostasis del calcio y excitotoxicidad.	22
2.1.4.1. Apoptosis.	24
2.1.5. Terapéutica contra la enfermedad.	25
2.1.5.1. Tratamientos actuales.	25
2.1.5.2. Tratamientos experimentales.	26
2.2. Fragmento C de la toxina tetanica.	32
2.2.1. Aplicaciones del fragmento c de la toxina tetánica.	35
2.3. Factores neurotroficos.	37
2.3.1. Familia de las neurotrofinas.	38
2.3.1.1. Descripción de la familia.	38
2.3.1.2. Modo de actuación.	39
2.3.1.3. Estudios funcionales.	47
2.3.1.4. Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).	53
2.3.2. Ligandos de la familia de gdnf (GFLs).	62
2.3.2.1. Descripción de la familia.	62
2.3.2.2. Modo de actuación.	63
2.3.2.3. Estudios funcionales.	66

2.3.2.4. Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF).	70
2.3.3. Familia de las neuroquinas.	75
2.3.3.1. Descripción de la familia.	76
2.3.3.2. Modo de actuación.	76
2.3.3.3. Estudios funcionales.	78
3.- Material y metodos.	81
3.1. Construcciones genéticas.	83
3.1.1. Plásmidos utilizados para las distintas estrategias de clonaje.	83
3.1.2. Mutagenesis dirigida.	87
3.1.3. Clonaje de los fragmentos PCR.	89
3.1.4. Transformación en bacterias competentes.	90
3.1.4.1. Cepas bacterianas utilizadas	90
3.1.4.2. Medios de cultivo utilizados en el crecimiento bacteriano	91
3.1.4.3. Transformación de bacterias	91
3.1.5. Obtención y digestión de DNA plasmídico.	93
3.1.6. Construcción de los vectores de expresión procariotas.	96
3.2. Purificación de proteínas recombinantes.	100
3.2.1. Extracción proteica.	100
3.2.2. Concentración de la proteína.	103
3.2.3. Visualización de la proteína.	104
3.2.3.1. Visualización mediante tinción con azul de coomassie.	106
3.2.3.2. Visualización mediante tinción con nitrato de plata.	106
3.2.3.3. Western Blotting.	107
3.2.4. Cuantificación de la proteína.	109
3.3. Cultivos celulares.	111
3.3.1. Cultivos primarios de medula espinal.	111
3.3.2. Línea celular Neuro 2A.	113
3.3.3. Cultivos corticales primarios.	114

3.4. Cuantificación de la actividad <i>in vitro</i> de los factores neurotróficos fusionados a TTC.	115
3.4.1. Efecto de las moléculas de fusión sobre marcadores relacionados con la apoptosis.	115
3.4.1.1. Cuantificación de la actividad caspasa-3	116
3.4.1.2. Efecto sobre la supervivencia neuronal mediante citometría de flujo	118
3.4.2.. Determinación subcelular de Akt.	120
3.5.- Estudio <i>in vivo</i> del transporte retrógrado de los factores neurotróficos fusionados a TTC	122
3.6. Metodología informática.	123
4.- Resultados y discusión.	125
4.1. Creación de vectores de expresión en procariotas mediante mutagénesis dirigida	127
4.1.1 Mutagénesis dirigida mediante PCR.	128
4.1.2. Construcciones finales obtenidas.	132
4.1.2.1. Factor GDNF en sus formas de proproteína y madura.	132
4.1.2.2. Factor BDNF en sus formas de proproteína y madura.	135
4.1.2.3. Factor GDNF en sus formas de proproteína y madura fusionado a TTC.	136
4.1.2.4. Factor BDNF en sus formas de proproteína y madura fusionado a TTC.	138
4.2. Purificación de proteínas recombinantes.	140
4.2.1. Puesta a punto de la extracción proteica.	140
4.2.1.1. Concentración de la proteína.	142
4.2.1.2. Cuantificación de la proteína.	144
4.2.1.3. Producción del anticuerpo contra TTC.	145
4.2.2. Proteínas recombinantes obtenidas.	146
4.2.2.1. GDNF madura y GDNF madura – TTC.	146
4.2.2.2. BDNF madura y BDNF madura – TTC.	149

4.2.2.3. GDNF proproteína y GDNF proproteína – TTC.	151
4.2.2.4. BDNF proproteína y BDNF proproteína – TTC.	152
4.3. Estudios funcionales de las proteínas de fusión (BDNF-TTC y GDNF_TTC).	154
4.3.1. Determinación de la actividad caspasa 3	154
4.3.2. Determinación de células apoptoticas por citometría de flujo.	162
4.3.3. Determinación subcelular de la quinasa Akt.	172
4.3.4. Estudio del transporte retrógrado	182
4.4. Discusión general	184
5.- Conclusiones.	189
6.- Bibliografía.	193



RESUMEN

RESUMEN

El objetivo particular del presente trabajo se encuentra en el objetivo general del desarrollo de nuevos tratamientos, basados en terapia génica para las enfermedades de la motoneurona, particularmente la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Estas estrategias están basadas en el transporte específico del fragmento C de la toxina tetánica (TTC), hacia las motoneuronas, de sustancias antiapoptóticas.

En el presente trabajo, se han producido las fusiones genéticas de los factores neurotróficos (GDNF y BDNF) y el fragmento C de la toxina tetánica. Estas fusiones han sido realizadas tanto para las formas maduras de los neurotróficos como para las formas de proproteínas. Las proteínas recombinantes obtenidas fueron producidas en vectores procariotas para realizar su estudio funcional.

El efecto sobre la supervivencia neuronal de las proteínas de fusión GDNF-TTC y BDNF –TTC se estudió en la línea Neuro 2A. Los resultados mostraron que ambas moléculas presentaban una disminución de la apoptosis de estas células cuando se encontraban en estado de degeneración. BDNF-TTC mostró un efecto mayor, dosis dependiente, que solo fue observado a las 48 horas. La disminución de apoptosis por GDNF-TTC en estos cultivos se mantuvo hasta las 72 horas, incluso cuando dosis pequeñas fueron administradas. Ambas moléculas activan la quinasa Akt, relacionada con la supervivencia celular y más específicamente localizada en el núcleo. Por último, sorprendentemente, un efecto antiapoptótico del fragmento C de la toxina tetánica fue observado.

Estos resultados demuestran que las moléculas GDNF-TTC y BDNF-TTC son funcionales, inhibiendo la apoptosis neuronal. Debido a su distinta forma de actuación, recomendamos el uso combinado de ambos factores en un posible tratamiento experimental en animales modelo.

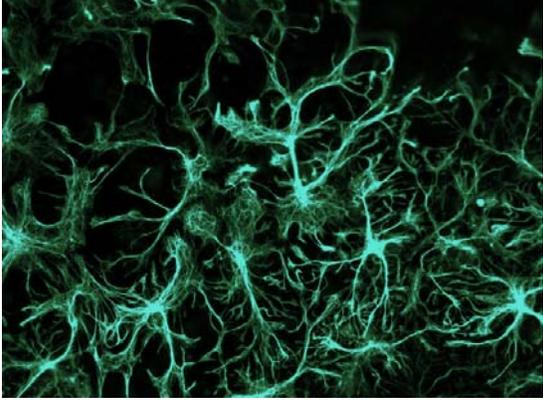
SUMMARY

The particular objective of the present work is in the general mission of the development of new treatments, based on gene therapy for the diseases of motor neurone, particularly the Amyotrophic Lateral Sclerosis. These strategies are based on the C fragment tetanus toxin (TTC) specific transport of antiapoptotic substances towards motor neurones.

In the present work, the genetic fusions of the neurotrophic factors (GDNF and BDNF) and the C fragment tetanus toxin have taken place. These fusions have been made so much for the mature forms of the neurotrophic factors as for the forms of proproteins. Recombinant proteins obtained were produced in prokaryotic vectors to make their functional study.

The effect on the neuronal survival of the fusion proteins GDNF-TTC and BDNF-TTC was studied in the Neuro 2A line. The results showed that both molecules displayed a diminution of the apoptosis of these cells when they were in state of degeneration. BDNF-TTC showed a greater effect, dependent dose, that only was observed at 48 hours. Diminution of apoptosis by GDNF-TTC in these cultures stayed until the 72 hours, even when low doses were administered. Both molecules activate Akt kinase, related to the cell survival and more specifically located in the nucleus. Lastly and surprising, an antiapoptotic effect of C fragment tetanus toxin was observed.

These results demonstrate that the molecules GDNF-TTC and BDNF-TTC are functional, inhibiting the neuronal apoptosis. Due to their different form from performance, we recommend the combined use of both factors in a possible experimental animal treatment model.



1.-INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION.

1.1.- ANTECEDENTES.

En la sociedad occidental y en mayor medida en los últimos años, las enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson o el Alzheimer, presentan una gran relevancia debido al envejecimiento de la población. Sin embargo, existen un subgrupo descrito en este tipo de enfermedades, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (E.L.A.), que cursan únicamente con degeneración de las motoneuronas. Debido por una parte al desfavorable pronóstico, y por otra, a la escasez de terapéuticas efectivas, este tipo de patologías neuronales suponen hoy en día un grave problema social.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (E.L.A.) es una enfermedad neuromuscular donde las motoneuronas, neuronas que controlan el movimiento de la musculatura voluntaria, disminuyen su funcionamiento de forma gradual y mueren, provocando debilidad y atrofia muscular. Es una enfermedad compleja, en la que las neuronas están sujetas a la acción incorrecta de uno y/o varios genes, la mayoría de los cuales todavía tienen que ser descubiertos. En el caso de algunos pacientes de E.L.A. se han encontrado distintas mutaciones a nivel de la enzima Superóxido Dismutasa (S.O.D.) (Deng et al. 1993; Rosen et al. 1993). A pesar de que los mecanismos de la neurodegeneración producidos en la E.L.A. no son conocidos, existen ya muchos trabajos que asocian esta degeneración con la apoptosis neuronal que ocurre en la enfermedad (Martin 1999).

Como se ha mencionado, no existe ningún tratamiento efectivo contra esta enfermedad, sin embargo, el reciente descubrimiento de determinados factores de crecimiento neuronal y agentes bloqueantes del glutamato han resultado prometedores para detener la progresión de la enfermedad. Se ha sugerido el empleo de diferentes factores neurotróficos para el tratamiento de la E.L.A., como BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (Neurotrophin 3), NT-4 (Neurotrophin 4), CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) o GDNF (Glial Cell Line

Derived Neurotrophic Factor). A pesar de que los estudios *in vivo* en animales demuestran que estos factores neurotróficos protegen a la neurona motora de la degeneración, cuando se administran directamente en pacientes, no se ha observado un efecto terapéutico. Es posible que el fracaso de estos ensayos se ha debido a la falta de especificidad de los factores neurotróficos por las motoneuronas.

El objetivo final del proyecto es el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en terapia génica para el tratamiento de las enfermedades que cursan con degeneración de las motoneuronas en los seres humanos, utilizando como modelo la esclerosis lateral amiotrófica (E.L.A). Estas estrategias se basarán en la inhibición de esta degeneración mediante el transporte específico hasta estas células de factores neurotróficos. Sin embargo, los vehículos específicos hacia las motoneuronas no son numerosos.

La toxina tetánica es una potente neurotoxina producida por *Clostridium tetani* que tiene la capacidad de atravesar las sinapsis y llegar hasta los Centros Nerviosos Superiores vía neuronal. El fragmento C (TTC), obtenido mediante digestión con papaína de la toxina nativa, ha mostrado que mantiene las mismas características de transporte sin presentar poder patógeno. No es por tanto extraño que, desde hace tiempo, se haya propuesto que dicho fragmento podría ser utilizado como un "transportador" de enzimas hacia las motoneuronas del Sistema Nervioso Central (Fishman and Savitt 1989; Beaude et al. 1990; Coen et al. 1997). El grupo de investigación en el que me hayo integrado, mediante la utilización de un marcador, ha demostrado que el fragmento C producido por células musculares se transporta de forma idéntica que cuando se realiza una inyección proteica. Estos resultados permiten plantear una estrategia de terapia génica basada en la utilización de inyecciones intramusculares de DNA desnudo que codifique para la fusión factores neurotróficos-TTC. Sin embargo, existen todavía muchas cuestiones que responder antes de abordar este tipo de experiencias. Ante estos antecedentes nos planteamos la realización de la presente tesis doctoral con los siguientes objetivos.

1.2.- OBJETIVOS.

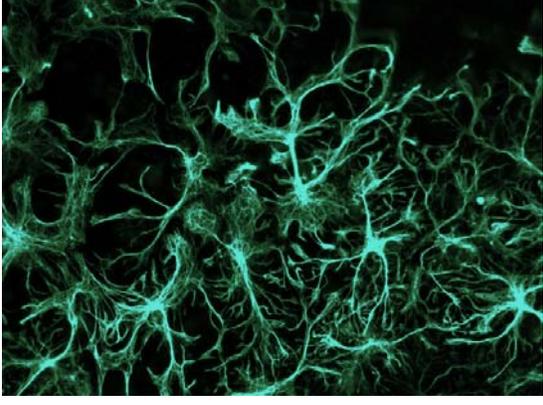
El objetivo fundamental del presente trabajo es la contribución, desde una nueva vertiente basada en terapia genica, al desarrollo de nuevos tratamientos para las enfermedades de la motoneurona, en particular la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Para alcanzar este objetivo general se ha planteado la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1.- Obtener las construcciones genéticas en vectores de expresión procariotas para la producción de las siguientes proteínas recombinantes: GDNF, BDNF, GDNF-TTC, BDNF-TTC, tanto en sus formas maduras, como de preproteína.

2.- Producir las proteínas recombinantes: GDNF, BDNF, GDNF-TTC, BDNF-TTC tanto en sus formas maduras, como preproteínas y el fragmento C de la toxina tetánica (TTC).

3.- Comprobar si GDNF y BDNF mantienen su efecto sobre la supervivencia neuronal cuando se hallan fusionados al fragmento C de la toxina tetánica.

4.- Comprobar si las moléculas de fusión (GDNF-TTC y BDNF-TTC) conservan el transporte retrógrado propio del fragmento C de la toxina tetánica.



2.-REVISION BIBLIOGRAFICA

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

El capítulo de revisión bibliográfica ha sido estructurado en tres apartados. En una primera parte se describirá de forma resumida la enfermedad de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, posteriormente las características del fragmento C de la toxina tetánica y por último el estudio de las familias de factores neurotróficos.

2.1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTROFICA.

2.1.1. DEFINICIÓN.

La enfermedad de Esclerosis Lateral Amiotrófica o E.L.A. fue descrita en 1.874 por Charcot. A pesar de los progresos en su investigación, esta enfermedad conocida coloquialmente como enfermedad de Lou Gehrig (debido a un famoso jugador de béisbol que padeció la enfermedad), todavía no tiene una terapia efectiva.

El término de “amiotrófica” hace referencia a la atrofia muscular y debilidad por la afectación de las motoneuronas de la zona inferior de la médula espinal. El término “esclerosis lateral” hace referencia al hecho de que, en las autopsias de los enfermos, se observa gliosis en la columna lateral de la médula espinal, de forma previa a la degeneración en los conductos corticoespinales.

En los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica, los síntomas comienzan en una primera fase con debilidad en las manos o las piernas, o con frecuencia dificultad en el habla y disfagia. En la mayoría de los casos, tanto las motoneuronas del nivel superior como inferior, suelen estar afectadas, pero hay ciertas variantes en la que una única población lo está (si afecta solamente a las motoneuronas del nivel inferior se habla de Atrofia Muscular Espinal Progresiva, y si lo hace a las del nivel superior se habla de Esclerosis Lateral Primaria). La enfermedad es progresiva y la media de supervivencia del paciente suele ser entre tres y cinco años.

2.1.2. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

A pesar de los numerosos estudios realizados, de la gravedad de la enfermedad y de su falta de tratamiento, en la mayoría de los casos de E.L.A., no se conoce su causa. Existen E.L.A. familiares (5-10%), en los que hay una relación directa con una mutación y el desarrollo de la misma, y de los cuales nos ocuparemos en el apartado “Etiología genética”. El resto de los casos (90-95 %), se consideran esporádicos con origen desconocido, en los cuales también se sospecha de la existencia de un componente genético. Estos casos serán englobados en el apartado “Etiología esporádica”.

2.1.2.1. ETIOLOGÍA GENÉTICA.

La primera evidencia de que la E.L.A. tenía un fondo genético fue en 1993. En este año, Rosen y colaboradores (Rosen y cols. 1993) descubrieron que mutaciones en el gen de la Superóxido Dismutasa 1 (SOD-1) estaban asociadas con un 20 % de los casos de la E.L.A. familiar. Además, en algunos enfermos de E.L.A. esporádica (5%), también se han encontrado mutaciones en el mismo (Rowland y Shneider 2001). El efecto tóxico para la célula no está producido por una falta de función de dicha enzima, sino por su actividad patógena como explicaremos en el siguiente capítulo (Gurney y cols. 1994).

Más de 90 de las mutaciones que se producen en este gen se localizan en una zona de 40 a 153 aa_x presentando todas ellas carácter dominante. Únicamente la mutación D90A (el nombre dado a la mutación de la enfermedad consiste en la inicial del aminoácido mutado, seguido por el número donde tiene lugar y por el cual es sustituido) puede presentar un carácter recesivo o dominante. En función de la mutación que presentan, se observan variaciones en la sintomatología de la enfermedad: actividad SOD1 en los eritrocitos (en algunos casos disminuye), supervivencia del enfermo (entre un rango de un año a 20), edad de manifestación de la enfermedad (normalmente es a partir de los 40 años pero puede aparecer antes), y otras manifestaciones clínicas (Rowland y Shneider 2001).

Como se ha comentado, las mutaciones en SOD-1 constituyen el 20 % de las formas heredables de la enfermedad. Del 80% restante no se conoce exactamente su modo de herencia y los genes responsables, aunque si ha sido relacionada con algunas zonas del genoma.

La E.L.A. juvenil autosómica dominante que ha sido relacionada con el cromosoma 9 en la región q34 (Chance y cols. 1998) o la E.L.A. con demencia frontotemporal en el cromosoma 9, región q21-22 (Hosler y cols. 2000) son otras formas genéticas descritas. En algunos casos, además de relacionar la enfermedad con una zona del cromosoma, también se propone un gen candidato. Este es el caso de la E.L.A. juvenil autosómica recesiva, relacionada con los cromosomas 2 (q33) (Hentati y cols. 1994) y 15 (q15-22) (Hentati y cols. 1998), cuyo candidato es el gen denominado *alsin*, que codifica para una proteína reguladora dependiente de energía de tipo GTP (Hadano y cols. 2001; Yang y cols. 2001).

Por otra parte, la existencia de estas mutaciones en el gen SOD-1 en pacientes con E.L.A. familiar, han permitido la realización de ratones transgénicos, modelos animales de la enfermedad que hasta ese momento no existían. Uno de los primeros ratones transgénicos obtenidos consistió en la sobreexpresión del gen SOD1 con la mutación G93A (Gurney y cols. 1994). Hasta el momento es el modelo animal con una sintomatología más exacta a lo que ocurre en la enfermedad humana. Este hecho lo hace uno de los modelos sobre los que se han realizado más estudios, tanto desde el punto de vista terapéutico, como para estudios de la patología de la enfermedad. Otros modelos animales basados en mutaciones del gen SOD1 han sido realizados, como la mutación G86R (Ripps y cols. 1995) o G37R (Wong y cols. 1995), siendo también utilizados para este tipo de estudios.

2.1.2.2. ETIOLOGÍA ESPORÁDICA.

Como anteriormente hemos expuesto, el 90 a 95% de los casos de E.L.A. se consideran esporádicos con origen desconocido. A pesar de que no se han descubierto relaciones genéticas directas, muchas veces se les denomina aparentes, ya que se sospecha pueden tener un fondo genético. En un primer lugar

se pensó que una causa podría ser mutaciones en el gen que codifica para la subunidad pesada de los neurofilamentos (NEFH), que produce elementos de sostén y comunicación internos de las neuronas (Al-Chalabi y cols. 1999).

De especial interés resultan los estudios sobre los animales que presentan una mutación en la cadena pesada de la dineína (Hafezparast y cols. 2003). Esta proteína está implicada en el transporte retrógrado de sustancias a lo largo de las células neuronales, en el axón. Se han observado en ratones heterocigotos con una mutación en la cadena pesada de la misma, una progresiva degeneración en las neuronas motoras, y en los animales homocigotos, las estructuras características de degeneración neuronal, denominadas cuerpos de inclusión de Lewry, similares a las que aparecen en pacientes de E.L.A. Estos hechos apuntan a que deficiencias en el transporte retrógrado neuronal podrían ser otra causa de la degeneración de las motoneuronas

Uno estudios más completos realizados hasta el momento sobre E.L.A. esporádica humana, es el del grupo del doctor Meyer que analizó a 85 pacientes en tres centros de salud diferentes en Alemania (Homburg/Saar, Ulm y Berlín). Tras la observación de sus cariotipos, se encontraron alteraciones cromosómicas en 5 de los pacientes: en tres de ellos se detectaron traslocaciones y en los otros dos inversiones pericéntricas. Era la primera vez que se describían alteraciones constitucionales cromosómicas en enfermedades comunes como la E.L.A. (Meyer y cols. 2003) y se pensó que procesos de recombinación en el material genético podrían provocar alteraciones en genes aún no identificados. En el mismo trabajo, se proponen una serie de genes candidatos que podrían estar implicados en la enfermedad que hasta la actualidad ha sido descrita como esporádica (ver **Tabla 2.1.**)

Otro hecho que apunta hacia esta hipótesis, es que existen datos que demuestran susceptibilidad genética para la enfermedad, apareciendo los casos en la misma familia junto a otros trastornos neurodegenerativos (Lynch y cols. 1994; Hosler y cols. 2000). No obstante, y a pesar de los numerosos estudios realizados para explicar esta susceptibilidad, los únicos factores de riesgo establecidos hasta ahora son la edad y la historia familiar.

Además de un fondo genético, también se han propuesto otra serie de factores que pueden influir para desencadenar la enfermedad. Debido a que la prevalencia y la incidencia del E.L.A. son muy homogéneas, se ha pensado en un componente ambiental (por ejemplo exposición a metales pesados) como una posible causa (Rowland y Shneider 2001).

Locus	Gen	Descripción	Locus	Gen	Descripción
4p15.3	DDX15	DEAD/H ARN helicasa, polipéptido 15	20q11.2	ITGB4BP	Proteína que une integrina beta 4
4q22	GRID2	Receptor de glutamato ionotrópico, delta 2		STK4	Serina/treonina kinasa 4
	PDHA2	Piruvato deshidrogenasa, alfa2		SNTA1	Sintrofina alfa 1
12p11	KCNJ8	Canal de potasio	21q22.1	SOD1	Superóxido dismutasa 1
	DDX11	DEAD/H ARN helicasa, polipéptido 11		KCNE1	Canal de potasio regulado por voltaje
12q13	KIF5A	Familia Kinesina 5 ^a		KCNE2	Canal de potasio regulado por voltaje
	ITGA7	Integrina, alfa 7		KCNJ16	Canal de potasio regulado por voltaje
	SNC8A	Canal de sodio regulado por voltaje, tipo 8	Xp11	USP9X	Proteasa 9 ubiquitina específica
	PDE1B	Fosfodiesterasa 1B, dependiente de calmodulina		RBM3	Proteína que une ARN tipo 3
	MAP3K12	MAP Kinasa 12		RBM10	Proteína que une ARN tipo 10
	KCNH3	Canal de potasio regulado por voltaje, subfamilia H		CASK	Serina proteína kinasa dependiente de calcio

Tabla 2.1.- Genes propuestos como candidatos en la E.L.A. esporádica. Localización cromosómica y función de los mismos (Meyer y cols. 2003).

La etiología viral también ha sido propuesta como posible causante de la enfermedad. El Dr. Berger y sus colaboradores (Berger y cols. 2000) observaron en la medula espinal de enfermos enterovirus RNA, no confirmandose por otros grupos (Walker y cols. 2001). Por otra parte, la aparición de cuadros de

enfermedad de la motoneurona en enfermos de S.I.D.A, también hicieron pensar en esta posibilidad (Rowland y Shneider 2001).

Por último, en el 2003 se han relacionado los virus echovirus-7 y herpesvirus 6, 7 y 8 con la enfermedad, aunque los autores del trabajo indican que el número de enfermos (20 pacientes) es escaso para llegar a conclusiones (Cermelli y cols. 2003).

También por sus características similares se ha relacionado la etiología de la enfermedad Creutzfeldt-Jacob con la E.L.A., aunque nuevos estudios son necesarios en este campo (Worrall y cols. 2000).

Otra de las hipótesis más aceptadas sería que la inmunidad juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad (Appel y cols. 1995). En médulas espinales de enfermos de E.L.A. se han encontrado células T y microglia activada con IgGs contra las motoneuronas. Se ha propuesto, que la regulación intracelular del calcio, estaría interferida por anticuerpos contra canales del mismo (Pullen y Humphreys 2000). No obstante, estos resultados contradicen el hecho de que la inmunoterapia en los pacientes con corticoesteroides, inmunoglobulinas intravenosas, ciclofosfamida o radiaciones no haya sido efectiva. Por tanto, la teoría de la autoinmunidad es controvertida (Vincent y Drachman 1996).

Por último, otra teoría propone que la enfermedad sería ocasionada como respuesta a algún proceso tumoral, pero estudios epidemiológicos no han demostrado una relación directa (Hays y cols. 1990; Khwaja y cols. 1998; Ferracci y cols. 1999).

Como ha quedado demostrado, excepto en el caso de mutaciones de la SOD-1, la etiología de la enfermedad no está muy clara. Una hipótesis sería pensar que algunas formas de E.L.A. podrían deberse a causas multifactoriales.

2.1.3. DIAGNÓSTICO Y LESIONES.

La dificultad en el diagnóstico de la enfermedad ha llevado a instaurar unos criterios internacionales que son conocidos como “Criterios del Escorial” (www.wfnals.org). La mayor dificultad consiste en diferenciarla de otro tipo de enfermedades neurodegenerativas de la motoneurona, como la enfermedad de Kenedy o la Atrofia Muscular Espinobulbar ligada al cromosoma X. No obstante, la electromiografía y la resonancia magnética parecen ser dos de los métodos más eficaces para el seguimiento de la enfermedad (Pioro y cols. 1999; Gooch y Harati 2000; Olney y cols. 2000). Según el Dr. Jaume Coll de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, para el diagnóstico de E.L.A. debe ser necesario confirmar (por electromiografía) la presencia de lesión de la última motoneurona (asta anterior medular y bulbar) en 3 segmentos independientes de las 4 extremidades, con los signos clínicos habituales (debilidad, atrofia, fasciculaciones). Además, es preciso que exista lesión de la primera motoneurona (signos piramidales). Los estudios de neurografía sensitiva deben ser totalmente normales y la enfermedad debe ser progresiva.

Debido a la utilización de criterios tan estrictos para el diagnóstico, puede ocurrir que algunos pacientes mueran de E.L.A. sin haber sido diagnosticados (Traynor y cols. 2000).

Respecto a las lesiones, las características histopatológicas más remarcadas de E.L.A. son la degeneración y pérdida de las neuronas motoras con gliosis astrocítica. Se han observado inclusiones intraneuronales en la degeneración de la glia y las neuronas (Chou y cols. 1998; Kikuchi y cols. 2000). El descubrimiento de cuerpos de inclusión similares en pacientes con E.L.A., y de pacientes con E.L.A. y demencia, permitieron establecer una clasificación entre la demencia frontotemporal y las enfermedades de la motoneurona (Ince y cols. 1998).

La neuropatología característica observada en E.L.A. es el engrosamiento de los neurofilamentos en los axones proximales, acumulaciones periféricas y neurofilamentos en axones y cuerpos celulares neuronales, inclusiones alrededor

del cuerpo celular de neurofilamentos fosforilados, e inmunoreactividad a la ubiquitina, y en algunos casos familiares inmunoreactividad de la superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD1), cuerpos de Lewry dentro del citoplasma neuronal, fragmentación del aparato de Golgi, reducción del calibre del axón distal, degeneración walleriana axonal y atenuación de las dendritas.

Respecto a las inclusiones intraneuronales descritas, se ha encontrado en un 70% de las autopsias de pacientes los cuerpos de bunina. Raramente se encuentra en otras condiciones, por lo que la sensibilidad y especificidad de esta característica son altas. Estas inclusiones son intracitoplasmáticas, eosinofílicas, positivas para la cistatina (un inhibidor de la cisteína proteasa) y contienen hialina. En el caso de las inclusiones ubiquitinadas, se han encontrado éstas en pacientes con E.L.A., con Parkinson y con Alzheimer. Sin embargo, en el caso de la E.L.A. no reaccionan con anticuerpos contra neurofilamentos o tau, a diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas.

Los cuerpos parecidos a los cuerpos de Lewry, los cuales no contienen neurofilamentos, pueden estar relacionados con las inclusiones ubiquitinadas aunque son menos frecuentes. Por otra parte, en algunos pacientes con E.L.A. familiar las inclusiones de conglomerados de hialina contienen SOD1 inmunoreactiva. Estos conglomerados muestran un marcaje muy intenso para neurofilamentos fosforilados y no fosforilados.

También han sido observados productos glicosilados en pacientes de E.L.A. familiar con la mutación A4V en el gen SOD1. Contienen ubiquitina, neurofilamentos y SOD1. Son depositados por procesos de glicosilación y oxidación. Por otra parte han sido encontradas anomalías mitocondriales en pacientes con E.L.A. y en ratones transgénicos con la SOD mutada (Borthwick y cols. 1999; Beal 2000). Algunos pacientes, incluso, presentan fragmentación del aparato de Golgi (Gonatas y cols. 1998).

Este tipo de estudios han llevado a realizar varias teorías sobre los mecanismos de patogenicidad de la enfermedad.

2.1.4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

Aunque los mecanismos moleculares exactos que causan la muerte de las motoneuronas en E.L.A. no se conocen, existen distintas teorías que intentan explicar este hecho. Estas teorías están representadas en la **Figura 2.1.**, extraída de la revisión realizada por Rowland y Shneider, 2001. Todos estos procesos llevarían al final a anomalías en las mitocondrias y posterior apoptosis celular.

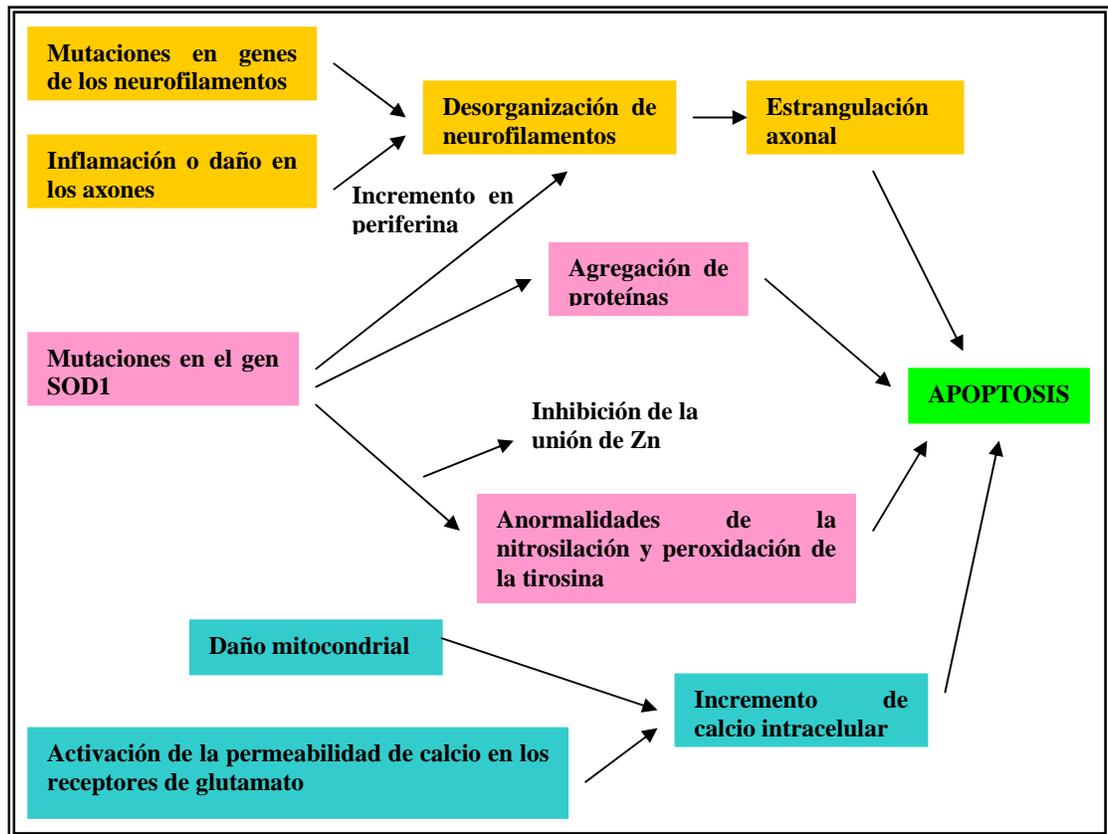


Figura 2.1.- Mecanismos que pueden contribuir a la degeneración de motoneuronas en E.L.A. Dichos mecanismos engloban los efectos tóxicos de SOD1, la agregación anormal de proteínas, la desorganización de filamentos intermedios, la excitotoxicidad debida a los canales de glutamato y otras anomalías en los mecanismos de regulación del calcio. (Rowland y Shneider 2001)

2.1.4.1. TOXICIDAD INDUCIDA POR SOD1

La SOD1 es una enzima que requiere cobre y zinc para catalizar la conversión de radicales superóxido, que son tóxicos para la célula, en peróxido de

hidrógeno y oxígeno. Un átomo de cobre en el sitio activo de la enzima es necesario para la catálisis, aportando a la SOD1 además una actividad prooxidante menor, que incluye la peroxidación, la generación de radicales hidroxilo y la nitrosilación de la tirosina. Estas reacciones quedan detalladas en la **Figura 2.2.**

En un primer momento, se consideró que las mutaciones en la enzima SOD1 conllevaban la pérdida de la función antioxidante de la misma, y que este hecho provocaría la acumulación de superóxido (Bowling y cols. 1993; Deng y cols. 1993). Sin embargo, la hipótesis de la pérdida de función fue rechazada debido a que se observó como la sobreexpresión de SOD1 mutante (contiene la mutación G93A) en ratones transgénicos, que poseían la actividad normal de su SOD-1 endógena, presentaban los síntomas propios de la enfermedad (Gurney y cols. 1994). Confirmando este hecho, se ha observado que los ratones knock out para la enzima, los cuales presentan la pérdida de función de la misma, no presentan la enfermedad (Reaume y cols. 1996). Estos resultados permitieron concluir que las mutaciones de la SOD1 ocasionan la enfermedad, debido a una ganancia en la función de la enzima que hace que sea tóxica para la célula.

Además de esta teoría, se ha desarrollado otra, supone que los daños oxidativos debidos a SOD1 podrían no ser una causa primaria de la toxicidad. Se considera que los mecanismos de ganancia de función podrían incluir un incorrecto plegamiento de la enzima mutante que formaría agregados de proteínas anormales, como ocurre en enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad (Durham y cols. 1997; Cleveland y Liu 2000).

No obstante, la primera de las teorías es la que más se ha estudiado. De este modo, se propone que una mutación en la enzima aumenta su reactividad, de forma que reacciona con sustratos que normalmente no lo haría, dando lugar a sustancias tóxicas. Así, como se muestra en la **Figura 2.2.**, si el radical peroxinitrito es utilizado como sustrato por la SOD-1, la enzima puede originar la nitrosilación anormal de tirosinas dañando a las proteínas (Beckman y cols. 1993). A este respecto se ha observado que en pacientes con E.L.A. familiar y esporádica, al igual que en ratones transgénicos para la SOD-1 mutada humana,

los niveles de nitrotirosina libres en la médula espinal están elevados, a pesar de que todavía no se han identificado patrones de nitrosilación específicos (Beal y cols. 1997; Ferrante y cols. 1997).

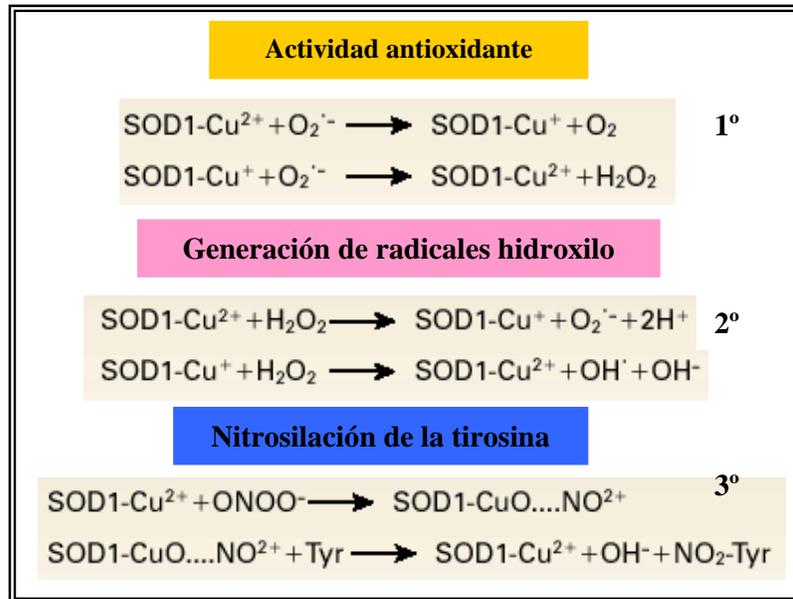


Figura 2.2.- Reacciones catalizadas por la Superoxido Dismutasa 1 (SOD 1). La SOD normalmente cataliza la reacción de aniones superóxido a peróxido de hidrógeno (1ª reacción). Mutaciones en el gen inducen a otras reacciones llevando a la producción de radicales hidroxílicos tóxicos (2ª reacción) o promover la utilización de reactivos anormales como el peroxinitrito, nitrosilando residuos de Tyr de proteínas (3ª reacción).

Por otra parte, ha sido demostrado que las mutaciones en SOD-1 disminuyen la afinidad por el zinc (Crow y cols. 1997). Por tanto, si las mutaciones de SOD-1 impiden a la enzima unirse a zinc, podrían originarse daños oxidativos. Supondría una menor eficiencia de la misma en retirar los excesos de superóxido, aumentando su propiedad de nitrosilación de tirosinas (Estevez y cols. 1999).

El cobre es otro elemento incorporado en la patogenia de la enfermedad, ya que la enzima lo necesita para ser activa, incluso cuando su actividad es anormal. A este respecto, se ha demostrado que dos quelantes captan el cobre de la SOD1 mutada deficiente en zinc, pero no en la SOD normal (Estevez y cols. 1999). Estos quelantes protegen los cultivos de motoneuronas que presentan la SOD mutada, lo que abriría un campo en el tratamiento de la enfermedad.

También una chaperona, encargada de incorporar el cobre al sitio activo de la enzima (Corson y cols. 1998), ha sido propuesta como diana terapéutica. Se ha observado que los animales knock out para este gen reducen (aunque no eliminan) la actividad SOD-1 del Sistema Nervioso Central (Wong y cols. 2000). Resultaría de gran interés comprobar si en ratones con la SOD-1 mutada, se puede eliminar el cobre con el que está unida la enzima, determinando si es requerido para el efecto tóxico.

2.1.4.2. DESORGANIZACIÓN DE FILAMENTOS INTERMEDIOS.

Los neurofilamentos también se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad. Ratones que sobreexpresaban subunidades tanto normales como mutantes de dichas proteínas mostraron disfunciones en las motoneuronas y degeneración de los axones, con un patrón similar al observado en los pacientes de E.L.A (Cote y cols. 1993; Xu y cols. 1993; Eyer y cols. 1998).

Se conoce desde hace tiempo, que en los pacientes se acumulan neurofilamentos, tanto en cuerpos celulares, como en los axones de las motoneuronas (Carpenter 1968; Hirano y cols. 1984; Rouleau y cols. 1996; Ince y cols. 1998). No obstante, a pesar de no estar claro si estas anormalidades son la causa o la consecuencia de la degeneración neuronal, existen datos que apuntarían a esta hipótesis (Julien y Beaulieu 2000). Se han encontrado mutaciones en el gen de la subunidad pesada de los neurofilamentos en pacientes con E.L.A. esporádica y familiar (Figlewicz y cols. 1994; Al-Chalabi y cols. 1999). Además, los niveles de mRNA de la subunidad ligera de los neurofilamentos en los pacientes con E.L.A. esporádica son anormalmente bajos (Bergeron y cols. 1994) . Se piensa que la expresión aberrante de los neurofilamentos podría impedir el transporte axonal de moléculas necesarias para el mantenimiento de los axones, como una “estrangulación axonal” (Willard y Simon 1983; Collard y cols. 1995).

Por último, estudios en animales transgénicos para la SOD-1 mutada humana, han demostrado que la eliminación de la expresión de la subunidad ligera o la sobreexpresión de la subunidad pesada, disminuye los efectos de la enfermedad (Couillard-Despres y cols. 1998; Williamson y cols. 1998). Aunque

en un principio estos resultados pueden resultar contradictorios, dos teorías intentan explicar este hecho. En primer lugar, se supone que los neurofilamentos podrían ser dianas de los efectos tóxicos de la SOD1 mutada, y por tanto la reducción de neurofilamentos axonales protege de la degeneración. Por otra parte, se considera que la acumulación de los neurofilamentos en las motoneuronas, podría proteger contra la enzima SOD1 al disminuir su unión a zinc o amortiguar el calcio (Lefebvre y Mushynski 1988).

Otra de las posibles proteínas candidatas en la patogenia de la enfermedad es la periferina (otro filamento intermedio), que se encuentra acompañando a los neurofilamentos en las inclusiones neuronales de los pacientes con E.L.A esporádica y de los ratones con la SOD1 mutada (Corbo y Hays 1992; Tu y cols. 1996). Se expresa normalmente en las motoneuronas, pero sus niveles se ven aumentados como respuesta a un daño celular o a una inflamación debida a citoquinas (Troy y cols. 1990; Troy y cols. 1990; Sterneck y cols. 1996). Se ha observado, que la sobreexpresión de periferina en ratones induce a la selectiva degeneración de los axones motores (Beaulieu y cols. 1999).

En ratones que no expresan la cadena ligera de los neurofilamentos y sobreexpresan la periferina, existe una clara muerte de las motoneuronas de forma selectiva. Debido a esto, se ha propuesto que el incremento de la expresión de periferina tras el daño neuronal o una inflamación podría ser la causa de la enfermedad, a través de una interacción con las subunidades medias y pesadas de los neurofilamentos, en ausencia de las subunidades ligeras, llevando consigo a la formación de agregados tóxicos (Beaulieu y cols. 1999). La sobreexpresión de periferina mata específicamente motoneuronas, ya que estas contienen niveles altos de neurofilamentos, y no lo hace con las neuronas sensitivas, ya que estas no expresan tantos neurofilamentos (Beaulieu y cols. 1999). Estos datos resultan contradictorios con lo que se ha descrito recientemente sobre la potenciación de la síntesis de neurofilamentos pesados en estos ratones, donde se ha observado que se evita la muerte de las motoneuronas, rescatándolas de la neurodegeneración (Beaulieu y Julien 2003). De nuevo observamos como la patogenia de la enfermedad es controvertida.

2.1.4.3. HOMEOSTASIS DEL CALCIO Y EXCITOTOXICIDAD.

Hay muchas evidencias que indican que en la E.L.A. hay variaciones en los niveles de calcio libre intracelulares, por tanto, se ha propuesto que una homeostasis anormal del calcio puede activar una serie de procesos, que finalmente desencadenarían la muerte celular y que trataremos en este apartado.

En pacientes con E.L.A. y en ratones con la SOD1 mutada, la resistencia de ciertas motoneuronas, como por ejemplo las oculomotoras, parece estar relacionada con la presencia de proteínas que se unen a calcio y que protegen a éstas de los efectos tóxicos de los altos niveles del mismo (Elliott y Snider 1995; Siklos y cols. 1998; Vanselow y Keller 2000). La teoría de la excitotoxicidad propone que los daños estarían causados por una excesiva entrada de calcio extracelular en la neurona a través de la activación inadecuada de los receptores del glutamato. El glutamato, un importante neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central, actúa a través de distintos receptores, uno de éstos es el denominado AMPA, que varía su permeabilidad a calcio en función de las subunidades que forman el receptor. Cuando la subunidad denominada GluR2 está presente en el receptor, el canal es impermeable a calcio. En el caso de las motoneuronas, comparada con otras poblaciones neuronales, dicha subunidad está en menor cantidad presentando una alta permeabilidad al calcio (Williams y cols. 1997).

La excitotoxicidad de glutamato en pacientes con E.L.A. esporádica, fue propuesta debido a la observación de un aumento en los niveles de glutamato en el fluido cefalorraquídeo de los mismos (Rothstein y cols. 1990; Rothstein 1995; Shaw y cols. 1995; Shaw y Ince 1997). Altos niveles de glutamato podrían ser excitotóxicos, incrementando a su vez los niveles de calcio libre en el interior celular a través de receptores permeables a calcio o de canales de calcio dependientes de voltaje.

También se ha propuesto que los niveles aumentados de glutamato en el fluido cefalorraquídeo, podrían ser debidos a un fallo en el transporte de glutamato en el Sistema Nervioso Central. La actividad sináptica del glutamato es

normalmente finalizada por recaptación a través de transportadores de aminoácidos excitatorios EAATs (excitatory amino acid transporters) normalmente EAAT1 y EAAT2 en los astrocitos perisinápticos (Rothstein y cols. 1996). Los pacientes con E.L.A. esporádica presentan una pérdida selectiva de EAAT2 que conlleva a un fallo en el transporte del neurotransmisor (Rothstein 1995). Se ha relacionado la pérdida de EAAT2 en las regiones afectadas del Sistema Nervioso Central a un splicing en su mRNA que da lugar a una forma no funcional del mismo (Lin y cols. 1998). Sin embargo, la especificidad de las regiones neuronales y su especificidad en esta enfermedad, todavía no ha sido confirmada (Nagai y cols. 1998; Meyer y cols. 1999; Honig y cols. 2000).

Por otra parte, la enzima SOD1 mutada puede también afectar a los niveles de calcio intracelulares a través de una toxicidad directa en la mitocondria, la cual es esencial para la correcta homeostasis del calcio (Carri y cols. 1997; Carriedo y cols. 2000). La alta actividad metabólica de las motoneuronas, y por tanto su dependencia de la fosforilación oxidativa, puede hacerlas vulnerables a una pérdida de la función mitocondrial.

Se ha propuesto que en pacientes con E.L.A. familiar, la SOD1 mutada podría llevar a una inactivación de EAAT2 por parte del peróxido de hidrógeno, lo que representaría un punto de unión entre la E.L.A. esporádica y la familiar (Trotti y cols. 1999).

La cascada excitotóxica es iniciada en las dendritas de las neuronas en la membrana postsináptica. Ello puede implicar la degeneración local de la sinapsis o plasticidad, o puede propagar la señal al resto de la célula llevando a ésta a la muerte (Mattson 2003). Por tanto, se propone que la muerte por excitotoxicidad está relacionada con la entrada de altas concentraciones de iones calcio en el citoplasma de la neurona procedente del exterior, o del acumulado en determinados orgánulos celulares, y que produciría radicales reactivos muy oxidantes, desencadenando la apoptosis celular.

2.1.4.4. APOPTOSIS.

Como hemos visto en el apartado anterior, al igual que altos niveles de calcio, proteínas que inducen la apoptosis como p53, Bax y Par-4 provocan cambios en la permeabilidad en la mitocondria. Como consecuencia de este cambio existe una liberación de citocromo c y la activación de proteasas como la caspasa-3.

La primera evidencia del posible papel de las caspasas en una enfermedad neurodegenerativa, procedió de experimentos realizados mediante el cruce de ratones modelos de E.L.A. (con el gen SOD1 mutado) y ratones expresando un mutante de caspasa-1 (Friedlander y cols. 1997). Estos dobles mutantes, resultaban más resistentes a la enfermedad (50% menor de progresión) que los animales transgénicos para la SOD-1 mutada. Ante estos resultados, se estudió en dichos modelos la expresión tanto de la caspasa-1, como de la caspasa-3 a lo largo de la enfermedad, demostrando que los niveles de mRNA de ambas proteínas se acumulaban con la edad de los animales (Li y cols. 2000).

También en la médula espinal de estos animales modelos se ha observado la activación de la caspasa-9, liberación de citocromo c y cambios proapoptóticos en la familia Bcl-2. Además, en ratones G93A para la SOD1 humana, la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 disminuye la muerte de las motoneuronas alargando la vida del animal (Kostic y cols. 1997; Guegan y cols. 2001; Zhu y cols. 2002).

Otro hecho que puede apoyar esta hipótesis, es que la administración intraventricular de un inhibidor de la caspasa (zVAD-fmk) en los animales modelo, muestra un efecto neuroprotector, alargando la supervivencia de los ratones en un 22%, observándose una disminución de caspasa-1 y caspasa-3 tanto al nivel de expresión de mRNA, como de actividad enzimática (Li y cols. 2000). Del mismo modo, un inhibidor de las caspasas, la enzima interleukin-1 β -converting, también mostró una disminución en la progresión de la enfermedad alargando la supervivencia de los animales (Friedlander y cols. 1997).

Estos hechos observados en animales modelos se relacionan con resultados obtenidos en humana. En muestras de la médula espinal de pacientes con E.L.A. se ha observado la activación de la caspasa-3, indicando la relevancia clínica de los estudios realizados en los animales modelo (Martin 1999).

A pesar de que la apoptosis es uno de los procesos que se dan en los estadios tardíos de la enfermedad, su inhibición podría enlentecerla y por tanto aumentar la calidad de vida del enfermo.

2.1.5. TERAPÉUTICA CONTRA LA ENFERMEDAD.

Como hemos comentado anteriormente, no existe tratamiento efectivo para la E.L.A. Sin embargo, debido a sus consecuencias, existen tratamientos, en su mayoría sintomáticos que se aplican actualmente, y numerosos tratamientos experimentales se están realizando. En este capítulo realizaremos una exposición de ambos tipos.

2.1.5.1. TRATAMIENTOS ACTUALES

El riluzol, un antagonista del glutamato, es la única droga aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de la E.L.A. En dos ensayos clínicos se observó que provocaba la prolongación en la supervivencia de tres a seis meses (Bensimon y cols. 1994; Lacomblez y cols. 1996). En uno de estos ensayos el tratamiento disminuyó levemente el decaimiento de la fuerza muscular, pero no hubo otros beneficios respecto a los parámetros medidos en otros ensayos (Bensimon y cols. 1994). Estudios posteriores demostraron que los pacientes que recibieron riluzol, permanecieron durante más tiempo en un estadio intermedio de la enfermedad, comparándolos con pacientes control (Riviere y cols. 1998). Se cree que la eficacia del riluzol, está basada en su capacidad de soportar la excitotoxicidad del glutamato en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, otros antagonistas del glutamato como aminoácidos de cadenas ramificadas, lamotrigina o dextrometorfano, no han mostrado efectos beneficiosos en los ensayos clínicos (Miller 1999; Demaerschalk y Strong 2000).

Actualmente, el fármaco con el compuesto activo riluzol, está comercializado con el nombre de Rilutek, por la compañía Aventis S.A. y se administra a los pacientes con resultados no muy satisfactorios. El resto de los tratamientos utilizados son para paliar síntomas, tanto psicológicos como físicos, sobretodo en la parte final de la enfermedad.

Normalmente una vez realizado el diagnóstico, los pacientes con E.L.A. comienzan a presentar síntomas de depresión que se tratan con antidepresivos. En un estudio con 100 pacientes con E.L.A., se observó que el 11% mostró síntomas de depresión clínica. También consideraciones psicológicas y espirituales son determinantes en la calidad de vida de los pacientes (Ganzini y cols. 1999; Murphy y cols. 2000; Simmons y cols. 2000).

Por último, el problema central del tratamiento de estos pacientes, cuando empiezan a observarse síntomas respiratorios, es la decisión entre una traqueotomía o ventilación mecánica. Pocos pacientes están de acuerdo con la elección de ventilación mecánica, ya que conlleva años de total inmovilidad y una comunicación limitada, además de la pesada carga para las familias.

Con todo lo expuesto, no es extraño que se estén llevando a cabo numerosos tratamientos experimentales que intentamos describir a continuación.

2.1.5.2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.

Los ensayos clínicos realizados en E.L.A pueden consultarse en la página de internet de la asociación americana MDA que es actualizada constantemente (<http://www.mdaua.org/disease/als.html>). Dichos ensayos actualmente se basan en cuatro estrategias: aumentar la supervivencia neuronal con factores neurotróficos y/o moléculas antiapoptóticas, disminuir los niveles de glutamato, disminuir la oxidación y por último intentar mejorar la calidad de vida de los enfermos.

En el caso de los estudios que intentan mejorar la calidad de vida del paciente, se ha probado la molécula dextrometorfano, ensayo clínico llevado a

cabo por la compañía Avanir Pharmaceuticals (San Diego, EEUU). La molécula se ha denominado AVP-923 y es una combinación de hidrobromo dextrometorfano y sulfato de quinidina. El primero es un antitusivo y el segundo es utilizado para controlar arritmias. Parece que el AVP-923 es capaz de reducir las expresiones emocionales incontroladas de los pacientes de ELA. El estudio se encontraba en fase II-III y contaba con un total de 100 pacientes, pero no produjo resultados satisfactorios y actualmente se encuentra cerrado.

Otro estudio está orientado al análisis del uso de oxandrolona y esteroides anabólicos, junto con la nutrición convencional, para el mantenimiento del peso corporal y masa muscular en enfermos con ELA. La Oxandrolona presenta actividad hormonal y se comporta como un anabolizante, aumentando la masa muscular con ejercicios de rehabilitación. Este ensayo está siendo llevado a cabo por el Centro Neuromuscular de las dos Carolinas (EEUU) y actualmente está abierto.

Algunos trabajos científicos citan alteraciones en el metabolismo de la creatina como posible desencadenante de enfermedades degenerativas neuromusculares como la ELA. Estudios previos demuestran que la ingestión oral de la misma mejora la función muscular, recuperándose del esfuerzo mucho antes, por lo que se propone como suplementación alimentaria en la ELA. Se están realizando tres ensayos clínicos por el Consorcio Noroeste para la ELA (EEUU), el Centro para enfermedades neuromusculares y para ELA (EEUU) y la Universidad de Medicina del Oeste de Virginia (EEUU).

Respecto a intentar reducir los procesos de oxidación, se ha estudiado la coenzima Q10, que es una molécula mitocondrial necesaria en la producción de energía de las células. Se ha detectado que en pacientes de ELA está reducida a niveles muy bajos comparado con personas sanas, y se propuso como nueva sustancia terapéutica para tratar la ELA. Ha sido realizado un ensayo clínico por la Universidad de Columbia y el Centro para ELA de Eleanor y Lou Gehrig. En este pequeño ensayo participaron 16 pacientes con ELA. A pesar de que se observó algún discreto beneficio, no resultó significativo estadísticamente y por tanto no se puede concluir que sea beneficioso. Son necesarios ensayos clínicos

con un número mucho mayor de pacientes si se quiere concluir resultados. Lo que se ha observado es que no tiene efectos secundarios importantes.

Otras dos sustancias (gabapentina y vitamina E) han sido también propuestas como antioxidantes. En los ratones transgénicos con la SOD1 mutada, la gabapentina igual que el riluzol, prolongaba la supervivencia de los animales, pero no afectó significativamente al comienzo de la enfermedad (Gurney y cols. 1996). Por el contrario, la vitamina E disminuyó el momento del inicio de la enfermedad y la progresión de ésta, pero no prolongó la supervivencia. Sin embargo, la gabapentina y la vitamina E no fueron eficaces en los ensayos con pacientes (Desnuelle y cols. 2001; Miller y cols. 2001).

Otro caso es el de la compañía Northeast ALS Consortium (EEUU) encargada del estudio del fármaco denominado Celebrex, inhibidor de la ciclooxigenasa-2. Esta enzima produce prostaglandinas tipo-2 y aumenta los efectos de los radicales libres. Celebrex ha sido previamente utilizado para el tratamiento de la artritis. En estudios preclínicos en modelos animales se observa la prolongación de la supervivencia, al disminuir la muerte de motoneuronas. El ensayo se llevará a cabo en un periodo de 12 meses, con un total de 300 enfermos.

Respecto a los estudios relativos a los niveles de glutamato, se realizó un estudio del compuesto denominado topiramato (nombre comercial Topamax). El topiramato es un medicamento que se usa habitualmente contra la epilepsia, y disminuye los niveles de glutamato en el sistema nervioso, tanto en el encéfalo como en la médula espinal. Ha sido realizado por el Consorcio Noroeste para la ELA en EEUU. El ensayo comenzó en julio de 1999 y contó con casi 300 enfermos de ELA pero no tuvo resultados satisfactorios.

Un ensayo todavía sin finalizar sobre los niveles de glutamato, es el caso de tamoxifén que es un medicamento usado en el tratamiento contra el cáncer. Los médicos de la universidad de Wisconsin-Madison (EEUU) observaron que enfermos de cáncer que tenían ELA, tratados con este medicamento, estadísticamente vivían más tiempo. Tamoxifén es un inhibidor de una proteína

llamada “quinasa C”, y provoca que se detengan los efectos tóxicos de las altas concentraciones de glutamato que aparecen en enfermos de ELA. Además ensayos preclínicos en modelos animales han observado el retraso de su muerte. Este hecho animó a probar esta sustancia para un ensayo clínico contra la enfermedad.

Por otra parte, se ha observado en ratones transgénicos para ELA, que la captación de glutamato por parte de los astrocitos está disminuida, se supone que este hecho ocasiona que una gran cantidad de glutamato se acumule en la neurona. La molécula llamada NAALADasa es capaz de retirar el exceso de glutamato de la cercanía de la neurona, sin interferir en el funcionamiento normal del cerebro. Por ello, se ha iniciado un ensayo preclínico en ratones transgénicos para ELA, para averiguar si tiene efectos beneficiosos o no para estos animales. Este ensayo está siendo llevado a cabo por la compañía Guilford Pharmaceuticals Inc.

Respecto a los estudios realizados con sustancias antiapoptóticas, el centro para ELA de la Universidad de Nuevo México en EEUU comenzó en el verano de 2001 un ensayo con la denominada minociclina. La minociclina es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, y es capaz de llegar al sistema nervioso central tomado por vía oral. Existen estudios que demuestran que la proteína llamada óxido nítrico sintasa inducible activa la vía de las caspasas, y provocan la muerte de neuronas motoras. La minociclina inhibe la proteína óxido nítrico sintasa inducible y la vía de las caspasas. Estudios preliminares muestran en ratones transgénicos que retrasa la evolución de la ELA.

Otro tratamiento que ha sido estudiado, es el fármaco denominado indinavir, proteína usada en el tratamiento contra el SIDA. Se observó que en enfermos de SIDA que tienen ELA se retarda la progresión de ésta al administrar dicho fármaco. Existen datos preliminares que demuestran que el indinavir puede intervenir indirectamente interrumpiendo la vía de las caspasas (Chavan y cols. 2001). Por esta razón, se inició el ensayo clínico en octubre de 2001 por el Centro Médico de Beth Israel.

Finalmente, en los estudios relacionados con factores neurotróficos, que intentan prolongar la supervivencia neuronal, encontramos el compuesto denominado xaliproden que posee actividad similar a las neurotrofinas NGF y BDNF. Se ha demostrado que promueve la regeneración de nervios en células musculares humanas, sin embargo, sus propiedades de neuroprotección no están muy claras. El ensayo fue realizado en 2000 pacientes con ELA y los resultados no fueron positivos. A pesar de que el fármaco fue bien tolerado y mostró discretos beneficios en la función respiratoria, no supera la eficacia del Rilutek. Estos estudios fueron realizados por la empresa Sanofi-Synthelabo Inc.

Otro caso es el de la compañía Cephalon, cofinanciada por la Asociación de ELA Americana (ALSA) que se encuentra en un ensayo abierto desde el invierno de 2002. El nombre comercial del fármaco es miotrofina, corresponde al factor de crecimiento neuronal llamado "IGF-1". Se ha demostrado que esta sustancia es fundamental para el desarrollo normal del sistema nervioso, bloquea las vías de muerte de las neuronas y potencia la conexión de la neurona con el músculo y su regeneración. Se ha demostrado que esta sustancia es capaz de retardar el progreso de la enfermedad por neuroprotección en estudios preclínicos en ratones transgénicos para la ELA (Kaspar y cols. 2003). Los ensayos clínicos previos son contradictorios, ya que los realizados en EEUU han sido favorables, mientras que los realizados en Europa no. Para resolver dudas se está realizando un tercer ensayo clínico que comenzó a principios de este año.

Otro ensayo preclínico que se está llevando a cabo por parte de la compañía Neo Therapeutics, Inc. es el de la denominada neotrofina. La neotrofina T es una sustancia capaz de regular la producción de factores de crecimiento beneficiosos para la regeneración de las neuronas. Ensayos preclínicos han demostrado su efecto neuroprotector en enfermedades como ELA, Alzheimer y neuropatías periféricas.

Por último, otro ensayo que se encuentra abierto es el de la buspirona que se utiliza como antidepresivo. El mecanismo de acción es algo desconocido, pero se conoce que tiene afinidad por los receptores de la serotonina, lo cual provoca la liberación de factores de crecimiento neuronal, con efecto neuroprotector como

NGF o BDNF. Se hipotetiza que la buspirona puede tener efectos beneficiosos a corto plazo en la respiración de enfermos de ELA (Bourin y cols. 2002). El estudio está siendo realizado por el multicentro para ELA en EEUU.

En los últimos años, la utilización de factores neurotróficos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ha creado gran expectación. Se ha podido comprobar su eficacia en determinados modelos animales, pero desafortunadamente, los resultados obtenidos en ensayos clínicos han sido descorazonadores. Esta diferencia podría deberse a que los modelos animales no reproducen exactamente la fisiopatología de la enfermedad humana, siendo las divergencias todavía más acusadas en la biología nerviosa (Apfel 2002).

Sin embargo existen otras circunstancias que podrían explicar estos resultados. La administración del factor neurotrófico en la mayoría de los ensayos clínicos ha sido sistémica. La concentración de proteína que penetra en el Sistema Nervioso Central es muy pequeña, debido a su obligado paso a través de una restrictiva barrera hematoencefálica. Además, la vida media de las moléculas polipeptídicas es muy corta. En cuanto a la administración intratecal, intraventricular e intraparenquimatosas, no se obtuvieron los efectos clínicos deseados pero sí aparecieron efectos adversos. Relacionados, tanto con el fármaco, como con la técnica utilizada (Moris y Vega 2003). Estos efectos secundarios extraneuronales pueden estar ocasionados por la dosis.

Además, en condiciones fisiológicas, los factores neurotróficos se sintetizan de forma continua por células próximas a las neuronas diana, modificando su concentración según el estímulo fisiológico, es decir, de manera completamente diferente a la utilizada en los ensayos clínicos.

Los ensayos clínicos de momento no han proporcionado solución a la enfermedad. Debido a esto, la terapia génica se ha propuesto como posible solución a la misma. Tales estudios deben ser realizados previamente en animales para comprobar su eficacia y seguridad. Existen dos posibilidades hasta el momento. Una posibilidad es la utilización de vectores virales conteniendo genes que puedan ser útiles en el tratamiento de la enfermedad (Silani y cols. 2001) y

otra la de la utilización de células madre que restauren las funciones motoras, aunque actualmente no hay nada hecho en este campo (Silani y Leigh 2003). Una tercera que se propone en el presente trabajo, es la utilización de proteínas específicas de la población neuronal afectada, que lleven la sustancia terapéutica de forma más específica.

2.2. FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETANICA.

En los años 70, se realizaron numerosas experiencias para conocer la estructura de las subunidades de la toxina tetánica. El estudio por fragmentación reveló ser una aproximación muy fructífera para la comprensión de la relación estructura-función de la toxina (Price y cols. 1975; Helting y cols. 1977). Estos trabajos de fraccionamiento, han ayudado a establecer la estructura en tres dominios modulares de la toxina tal y como la conocemos hoy.

Estructuralmente, la toxina tetánica está compuesta por dos cadenas. Una cadena pesada (H, 100kDa) y una cadena ligera (L, 50kDa) unidas entre sí por un puente disulfuro, cuya integridad es fundamental para la neurotoxicidad de la molécula (Schiavo y cols. 1990; de Paiva y cols. 1993). La estructura de la toxina revela tres dominios funcionalmente diferentes: la cadena ligera, y los extremos N-terminal y C-terminal de la cadena pesada. Esta organización estructural de la toxina está relacionada con el hecho de que la intoxicación de la neurona se lleve a cabo en cuatro pasos (Montecucco y cols. 1994; Montecucco y Schiavo 1995): unión a la membrana, internalización, translocación de la membrana y acción catalítica de la toxina.

Se ha propuesto que la cadena ligera es la responsable de la actividad catalítica intracelular de la toxina (Penner y cols. 1986; Poulain y cols. 1988; Ahnert-Hilger y cols. 1989; Bittner y cols. 1989; Bittner y cols. 1989; Mochida y cols. 1989; Weller y cols. 1991). El extremo N-terminal de la cadena pesada está implicado en la translocación de la membrana (Hoch y cols. 1985; Donovan y Middlebrook 1986; Blaustein y cols. 1987; Shone y cols. 1987; Gambale y Montal 1988; Montal y cols. 1992). Por último, el extremo C-terminal de la cadena

pesada puede subdividirse en dos dominios: el dominio N-terminal del TTC (TTC_N), muy similar a algunas lectinas que se unen a glicoproteínas, y el extremo C-terminal del TTC (TTC_C). Este último, contiene una secuencia aminoacídica presente en otras proteínas con funciones de reconocimiento y unión a membranas, tales como la interleukina-1 o el factor de crecimiento de fibroblastos. Por otra parte, la delección de todo o gran parte de la porción TTC_N parece no afectar la unión de la toxina a membranas, no es el caso de la delección de los 10 últimos aminoácidos del extremo TTC_C de la toxina tetánica, ya que desaparece la unión a las neuronas de la médula espinal (Halpern y Loftus 1993). En 1997 quedó demostrada la gran importancia de los últimos 34 aminoácidos del TTC y en particular la His-1294, para su unión a los oligosacáridos de los polisialogangliosidos (Shapiro y cols. 1997). Estos datos concuerdan con el modelo de unión de la toxina tetánica a la membrana presináptica mediante un doble receptor. Gracias a su dominio TTC_N se uniría a una glicoproteína, y a un polisialogangliosido mediante su porción TTC_C . Esta descripción queda resumida en la **Figura 2.3**.

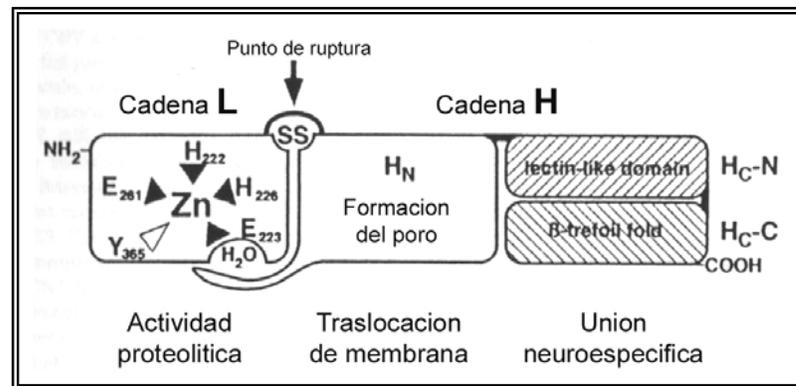


Figura 2.3.- Representación de los tres dominios de la toxina tetánica. Posee tres dominios de tamaño semejante (unos 50 kDa). El dominio de la izquierda es una endopeptidasa Zinc dependiente, la cual permanece inactiva mientras el puente disulfuro la une al resto de la molécula. La cadena pesada contiene dos subdominios, responsables de la unión a la membrana neuronal, el transporte y la translocación.

De particular interés para nosotros es el fragmento C de la toxina tetánica. El TTC ha sido clonado por PCR basándose en la secuencia conocida de la toxina tetánica. La proteína sintetizada a partir de este fragmento recombinante guarda la

capacidad de ligarse a los gangliósidos y a las células neuronales de la misma manera que si es obtenido por digestión enzimática (Halpern y cols. 1990). Gracias al clonaje de este fragmento, ha podido realizarse un estudio preciso de la región necesaria para el ligamiento mediante mutaciones por delección. Así, como se ha descrito previamente, se ha puesto en evidencia que el dominio implicado en la ligación a los gangliósidos concierne principalmente a los 10 últimos aminoácidos de la parte C-terminal del TTC (Halpern y Loftus 1993).

La característica más interesante del fragmento C es la propiedad de transportarse retrógradamente y pasar a través de las sinapsis, conservando las propiedades de la toxina entera, hecho confirmado por un gran número de estudios (Evinger y Erichsen 1986; Fishman y Carrigan 1987; Manning y cols. 1990; Cabot y cols. 1991; Fishman y cols. 1992; Coen y cols. 1997). Una vez que el fragmento C de la toxina tetánica es inyectado en un músculo, este puede ser internalizado al nivel de las terminaciones nerviosas y migrar por vía neuronal por vía retrógrada (Bizzini y cols. 1977; Bizzini y cols. 1981; Weller y cols. 1986). A pesar de que numerosos autores han demostrado su capacidad para atravesar una sinapsis, en ninguno de los estudios realizados se explica exactamente el mecanismo de como tiene lugar el transporte retroaxonal ni dicho paso transináptico.

Sin embargo, se ha discutido sobre la eficacia del fragmento C de la toxina tetánica. Por un lado se ha observado que transporte retrógrado de la toxina tetánica es comparable al de la toxina completa (Morris y cols. 1980), mientras otros estudios han observado que el transporte del TTC es mucho más eficaz en el caso de la toxina (Weller y cols. 1986).

El análisis del fragmento C de la toxina tetánica, ha mostrado su característica de no ser tóxico, además de su capacidad de unirse con una gran afinidad a los gangliósidos de las membranas neuronales (Bizzini y cols. 1977; Helting y cols. 1977; Morris y cols. 1980; Bizzini y cols. 1981; Weller y cols. 1986). Del mismo modo que en el caso de la toxina tetánica existe cierta ambigüedad respecto a la real naturaleza de la unión del fragmento C a los gangliósidos y a las membranas neuronales. De hecho, a pH ácido (pH=6,0) es

comparable a la que presenta la cadena pesada de la toxina y la propia toxina nativa en las mismas condiciones. Por el contrario, la unión en condiciones fisiológicas a las neuronas, es superior en el caso de la toxina que en la del fragmento C (Weller y cols. 1986). Estos resultados sugieren que las dos cadenas juntas, contribuyen de manera más eficaz a la unión *in vitro* o *in vivo* y demuestran que no es una característica exclusiva de la parte C terminal de la cadena pesada.

Otra característica fundamental del TTC es que su transporte retrógrado parece ser dependiente de la actividad neuronal para poder ser internalizado y posteriormente transportado (Miana-Mena y cols. 2002). Todas estas características hacen que dicho fragmento haya sido y esté siendo utilizado para numerosas aplicaciones.

2.2.1. APLICACIONES DEL FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA.

La naturaleza no tóxica del fragmento C y sus propiedades de transporte hacen de esta molécula una herramienta muy interesante desde dos puntos de vista: aplicación como trazador neuronal y posible vector en terapia génica.

En lo que respecta a su utilización como trazador neuronal, en estudios preliminares se ha utilizado el fragmento C en solitario como trazador neuronal y su detección ha sido realizada mediante anticuerpos (Evinger y Erichsen 1986; Fishman y Carrigan 1987; Manning y cols. 1990; Cabot y cols. 1991). Esta técnica presentaba el inconveniente de su difícil detección, de modo que se han realizado distintas estrategias para solventar este problema. Así el TTC se ha fusionado genéticamente a moléculas con actividad enzimática, de modo que éstas conserven su actividad y faciliten su detección en el Sistema Nervioso Central. La primera demostración de tal aplicación fue el estudio de Bizzini en 1980 (Bizzini y cols. 1980), pero posteriores estudios han aportado más datos sobre el transporte de enzimas, químicamente ligadas, hacia el Sistema Nervioso Central. Un ejemplo es la glucosa oxidasa, que conjugada al fragmento C puede ser transportada a través del nervio ciático después de ser inyectada en el músculo gastrocnemio

(Beaude y cols. 1990). También la peroxidasa (HRP), puede ser transportada a la motoneurona del Sistema Nervioso Central tras ser inyectada en la lengua o en la pata de la rata (Fishman y Savitt 1989). Además, el paso transináptico hacia las terminaciones presinápticas de las neuronas ligadas a las motoneuronas ha sido también demostrado con el conjugado HRP-fragmento C (Fishman y Savitt 1989). Más recientemente, mediante fusión génica se demostró que la proteína híbrida β -galactosidasa-fragmento C se distribuye en las neuronas del sistema hipoglosal por transporte retrógrado y transináptico tras su inyección en la lengua de ratón, observando que la actividad enzimática se mantenía, incluso en los cuerpos neuronales de las segundas neuronas (Coen y cols. 1997).

Si consideramos el fragmento C como vector de terapia génica, estas actividades enzimáticas fusionadas también pueden tener una aplicación terapéutica, de modo que las moléculas que por si mismas serían incapaces de acceder al Sistema Nervioso Central, adquieran esa propiedad y puedan ejercer su función.

Estudios *in vitro* han mostrado como algunas enzimas que intervienen en desórdenes neurológicos, fusionadas al fragmento C de la toxina tetánica, pueden ser útiles como tratamiento terapéutico. Este es el caso de la β -N-acetilhexoamidasa A (Hex-A), implicada en las enfermedades lisosomales neurodegenerativas, y la enzima CuZn Superóxido Dismutasa (SOD-1), conocida por su papel neuroprotector en los desórdenes neurológicos asociados a la presencia de radicales libres tóxicos. Estas enzimas conjugadas con el fragmento C, en el caso de Hex-A (Dobrenis y cols. 1992) o fusionada genéticamente al fragmento C en el caso de SOD-1 (Francis y cols. 1995), son capaces de internalizarse en las células neuronales en cultivo. Para la Hex-A, los resultados han mostrado que puede restaurar parcialmente la deficiencia de una enzima lisosomal en las células (Dobrenis y cols. 1992). En el caso de la SOD-1, un estudio *in vivo* ha mostrado que la fusión entre SOD-1 y el fragmento C se distribuye en las motoneuronas del hipogloso mediante transporte retrógrado tras su inyección en la lengua de ratones pero no se conoce si incrementa su función (Figueiredo y cols. 1997).

Estudios con factores neurotróficos fusionados al TTC han sido realizados *in vitro*. En concreto, Bordet y cols. en 2001 (Bordet y cols. 2001), fusionaron genéticamente el factor denominado cardiotrofina-1 al fragmento C, demostrando que la molécula mantenía la capacidad de desencadenar respuestas de supervivencia celular en las neuronas. Futuros estudios demostrarán si la fusión mantiene la capacidad de transporte de estas moléculas.

A partir de la observación de que las neurotrofinas y la toxina tetánica presentan una ruta común en su transporte retrógrado (Lalli y Schiavo 2002), se realizaron estudios de sus puntos en común. Así se ha observado como el fragmento C de la toxina tetánica es capaz de activar señales de supervivencia neuronal, como es el caso de la activación de la quinasa Akt en la cascada de señales ERK/Akt, activada a partir de receptores específicos de las neurotrofinas (Gil y cols. 2003).

2.3. FACTORES NEUROTROFICOS.

La existencia de un factor neurotrófico fue descrita por primera vez en los trabajos pioneros de los Dres. Rita Levi-Montalcini y Víktor Hamburger que le valieron el premio Nobel de Medicina (Levi-Montalcini 1987). En dichos trabajos, se describe por primera vez, la existencia de una sustancia que regula la supervivencia y maduración de las neuronas en desarrollo, en el sistema nervioso periférico. De esos trabajos, se concluye que un factor difunde al espacio extracelular, produciendo la atracción y trofismo de las neuronas simpáticas. Este factor fue denominado factor de crecimiento nervioso (Nerve growth factor, NGF). Desde entonces hasta nuestros días, han sido muy numerosos los factores que han sido descubiertos.

Los factores neurotróficos, de forma similar a las hormonas, hacen llegar su mensaje al interior celular a través de una interacción con receptores de superficie. Dicha interacción es muy específica, y en muchos casos requiere la intervención de distintas subunidades proteicas. Basándose en sus similitudes

estructurales y sus interacciones con distintos receptores se pueden agrupar en tres familias:

- Familia de las neurotrofinas.
- Ligandos de la familia de GDNF (GFLs).
- Familia de las neuroquinas.

2.3.1. FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS.

2.3.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA.

Esta familia esta formada hasta el momento por cuatro proteínas: NGF, Nerve Growth Factor (Levi-Montalcini y Hamburger 1951), BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor (Barde y cols. 1982), NT-3, Neurotrophin-3 (Jones y Reichardt 1990) y NT4/5, Neurotrophin-4/5 (Berkemeier y cols. 1992; Ip y cols. 1992). Las cuatro son codificadas como pre-pro-proteínas con tamaños moleculares que oscilan entre 31-35 kDa (Seidah y cols. 1996) siendo finalmente procesadas mediante proteólisis a proteínas de un tamaño de aproximadamente 13 kDa. Todas ellas tienen puntos isoeléctricos muy básicos, propiedad muy inusual en las proteínas secretadas, lo cual parece servir como propósito en la limitación de su capacidad de acción. Además, muestran otra característica común, la presencia de puentes disulfuro conocidos como “nudos de cistina”, identificados posteriormente en otras proteínas de secreción como la familia de TGF- β s (McDonald y Hendrickson 1993).

Todas las secuencias de las neurotrofinas en mamíferos están altamente conservadas a excepción de NT-4/5, ocurriendo lo mismo con sus receptores específicos (TrkA, TrkB y TrkC). Basándose en las secuencias de ambos, se observó que han coevolucionado a lo largo de la historia de los vertebrados. Este hecho sugiere que la evolución ha ido complementado los cambios al mismo tiempo en el par ligando receptor (Moyle y cols. 1994; Hallbook 1999). Podemos observar esta coevolución en la representación que se observa en la **Figura 2.4.**

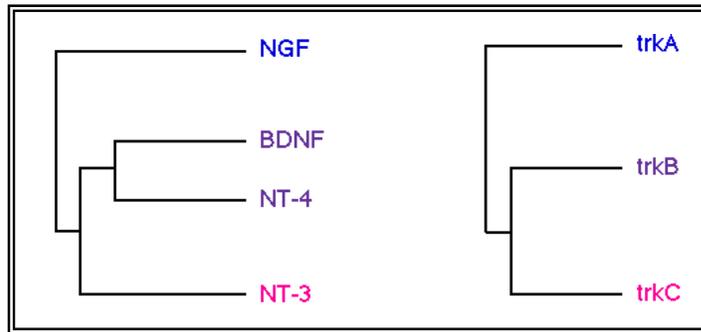


Figura 2.4.- Coevolución de las parejas ligando-receptor en la familia de las neurotrofinas en vertebrados (Ibanez 1998).

2.3.1.2. MODO DE ACTUACIÓN.

Respecto a su modo de acción, las neurotrofinas se unen a dos clases diferentes de receptores transmembranales: la familia de receptores tirosina kinasa Trk (Tropomyosin Receptor Kinase) y el receptor de neurotrofina p75.

Los receptores Trk son glicoproteínas transmembranales de 140 kDa. Son tirosinas quinasas, de modo que presentan en la zona extracelular múltiples motivos ricos en leucina (LRR1-3), dos clusters de cisteínas (C1,C2) y dos dominios de inmunoglobulinas (Ig1,Ig2), quedando unidas a la membrana por un simple dominio de membrana. Su señalización intracelular es llevada a cabo a través de tirosinas quinasas. El receptor p75 es también una glicoproteína transmembranal de 75 kDa. Contiene cuatro repeticiones de cisteínas en el dominio extracelular (CR1-CR4), siendo unido a través de una cisteína por palmitoilización a la membrana celular. La señalización que induce en el interior celular se produce a través de interacciones citoplasmáticas (Bibel y Barde 2000) (**Figura 2.5.**).

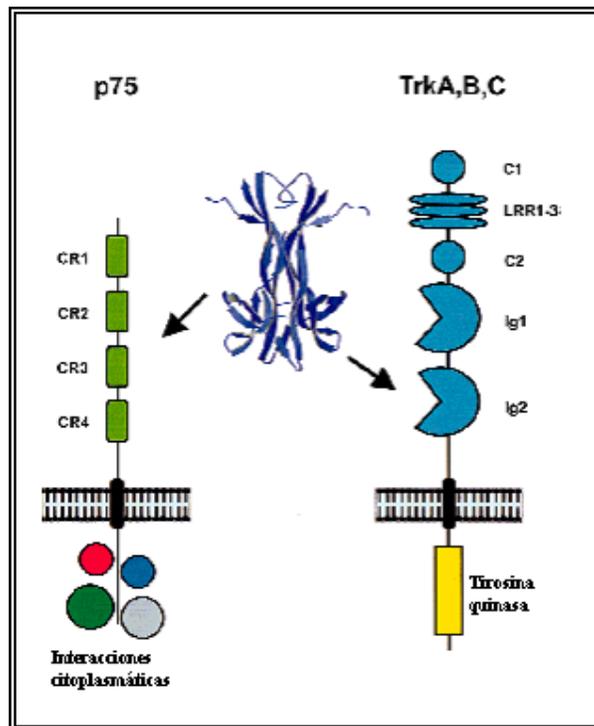


Figura 2.5.- Estructura de los receptores de la familia de las neurotrofinas. A la izquierda, el receptor p75 que presenta 4 repeticiones de cisteínas en el dominio extracelular (CR1-CR4), dominios intracelulares de interacción con otras proteínas. A la derecha los receptores Trk que presentan en la zona extracelular motivos ricos en leucinas (LRR1-3), clusters de cisteínas (C1,C2) y dominios de inmunoglobulinas (Ig1, Ig2), mientras en la zona intracelular tiene una actividad tirosina quinasa (Bibel y Barde 2000).

Los receptores Trk, presentan una interacción específica con sus ligandos, de forma que cada neurotrofina tiene su propio receptor. Dicha especificidad por las distintas neurotrofinas, viene dada por el segundo dominio de inmunoglobulinas (Bibel y Barde 2000). NGF interacciona únicamente con TrkA (protooncogen) (Kaplan y cols. 1991; Klein y cols. 1991), BDNF y NT-4 con TrkB (Squinto y cols. 1991; Escandon y cols. 1994) y NT-3 con TrkC (Lamballe y cols. 1991). Esta especificidad no es absoluta, ya que en el caso de NT-3, éste puede interaccionar con TrkA y TrkB. La interacción por parte de las neurotrofinas a p75 es inespecífica (**Figura 2.6.**).

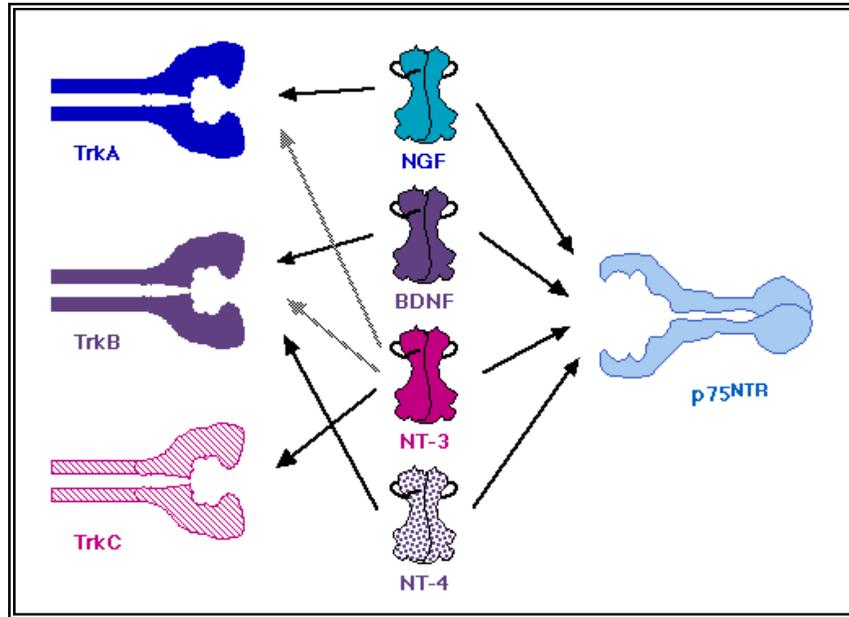


Figura 2.6.- Especificidad de ligando receptor en la familia de las neurotrofinas con los distintos receptores Trk y p75NTR (Ibanez 1998).

Las neurotrofinas presentan una alta afinidad por las neuronas. Sin embargo, tanto el receptor específico Trk, como el inespecífico p75, se unen con baja afinidad a sus ligandos (Rodríguez-Tebar y cols. 1990). Por tanto, se ha propuesto que la alta afinidad de las neurotrofinas por las neuronas es debida a una asociación entre los dos tipos de receptores: p75 y los Trk (Mahadeo y cols. 1994). Se cree que entre ambos receptores existen también interacciones, se han propuesto modelos donde el receptor p75 podría funcionar como intermediario entre las neurotrofinas y los receptores Trk (**Figura 2.7.**) (Ibanez 1998).

Sin embargo, con excepción de las neurotrofinas, para el receptor p75 todos los ligandos conocidos se unen a él mediante trimerización. En el caso de las neurotrofinas, cuando estas se presentan en su forma de proproteínas, se ha postulado que interaccionan con p75 y no con Trk, a través de la trimerización del mismo (Ibanez 2002). Como hemos descrito, no presenta una actividad catalítica en la cola citoplasmática, de modo que únicamente realiza asociaciones o disociaciones con otras proteínas en el interior celular. La secuencia de este receptor está relacionada, aunque de forma un poco distante, con dominios de muerte celular (Chapman 1995; Feinstein y cols. 1995). En concreto, en el caso

de las proneurotrofinas, se ha descrito como tras interactuar con el receptor p75 inducen la muerte celular mediante apoptosis (Lee y cols. 2001; Chao y Bothwell 2002).

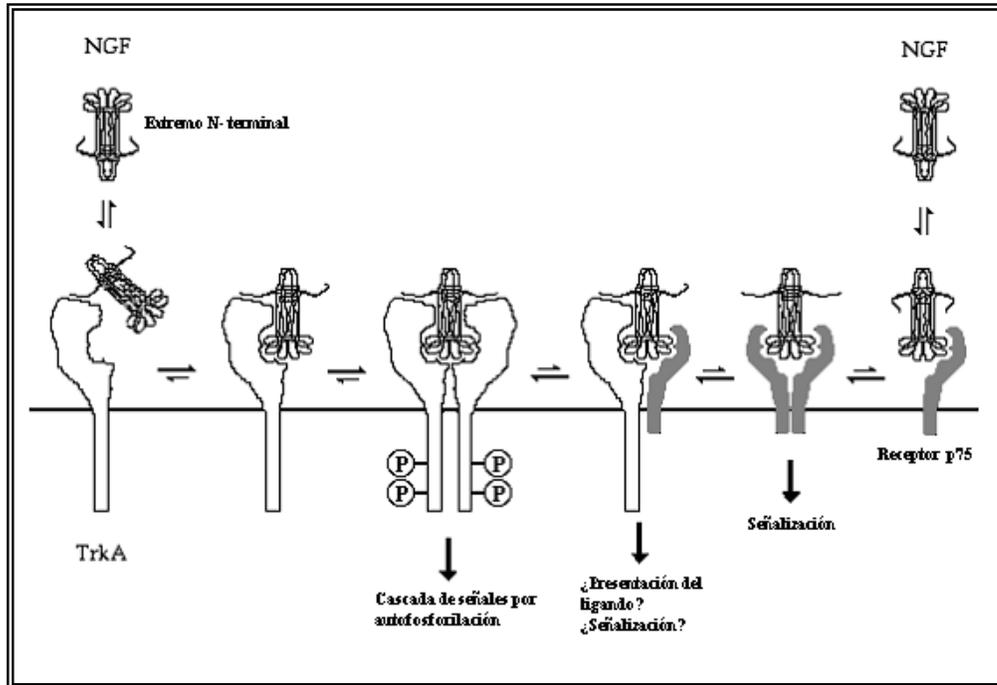


Figura 2.7.- Representación esquemática de la teoría de acción del receptor p75 como presentador de las neurotrofinas de ligando al receptor Trk. El factor neurotrófico NGF modifica la conformación del extremo N terminal para interactuar con los receptores. p75 parece actuar aumentando la concentración local alrededor de TrkA.

Este sistema dual permite la inducción de distintas repuestas tras la unión de las neurotrofinas con los distintos receptores, de modo que la unión con el receptor p75 induce una respuesta de muerte celular. Mientras, la unión a los receptores Trk, induce una respuesta de supervivencia celular tras activar una cascada de señales específica.

Cascada de señales a partir de los receptores Trk.

La dimerización del receptor inducida por las neurotrofinas (Jing y cols. 1992) provoca la fosforilación específica de los residuos tirosina localizados en el dominio intracitoplasmático (Cunningham y Greene 1998; Friedman y Greene

1999). La fosforilación de estos residuos, lleva a una conformación más abierta del receptor, resultando en una trans-fosforilación y permitiendo el acceso de sustratos a la quinasa. Los residuos de fosfotirosina en los receptores Trk actúan como sitios de unión para moléculas adaptadoras. Como podemos observar en la **Figura 2.8.**, dos tirosinas en los receptores son específicamente fosforiladas: Y490 (localizado cerca de la membrana) e Y 785 (localizado en el extremo C-terminal) (Friedman y Greene 1999). La tirosina Y490 une a la proteína Shc y a la proteína FRS2. Esto parece marcar la respuesta específica de las neurotrofinas ya que mientras Shc es unido al receptor Trk cuando NT-4/5 activa el receptor, FRS2 hace lo mismo en el caso de NGF y BDNF (Kouhara y cols. 1997; Minichiello y cols. 1998) (Easton y cols. 1999; Meakin y cols. 1999). La tirosina Y785 induce la fosforilación de la fosfolipasa-C γ (PLC- γ).

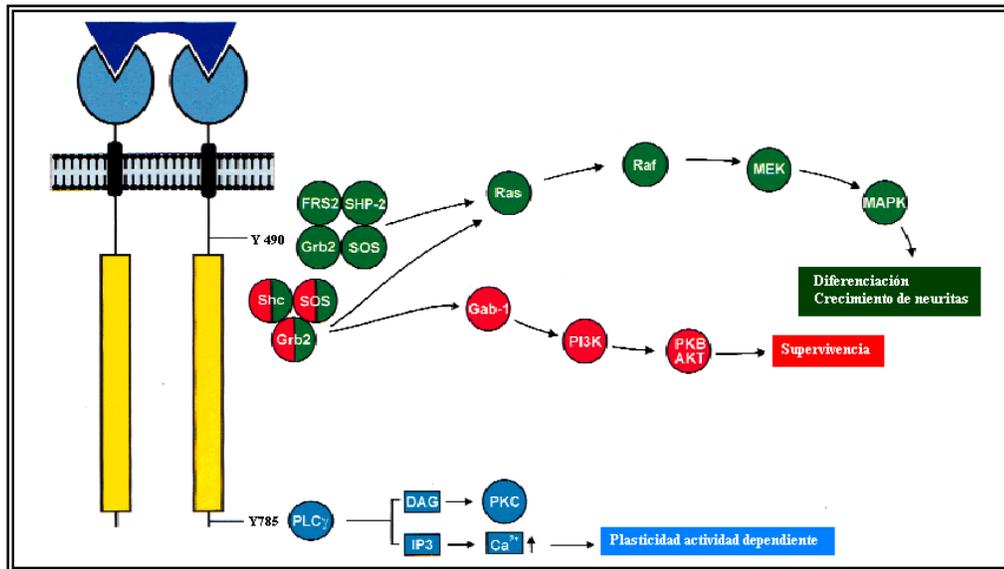


Figura 2.8.- Cascada de señales intracelular a partir de la dimerización del receptor Trk tras interaccionar con las neurotrofinas. La Tyr 490 activa los complejos FRS2/SHP-2/Grb2/SOS y Shc/SOS/Grb2. Estos adaptadores activan las vías Ras/Raf/MEK/MAPK responsable de la diferenciación y Gab-1/PI3K/PKB responsables de la supervivencia celular. La Tyr 785 activa PLC γ que a partir de PIP2 forma IP3 y DAG induciendo a la plasticidad celular (Bibel y Barde 2000).

Tres importantes cascadas de señalización parecen ser activadas por los receptores Trk y sus sustratos (**Figura 2.8.**):

- ◆ La activación de la vía Ras/Raf/MEK/MAPK se da a través de un complejo de moléculas adaptadoras. La fosforilación de Shc permite la activación de esta vía (Kaplan y Miller 2000). La proteína Shc fosforilada se une al complejo Grb2-SOS el cual a su vez activa Ras. Finalmente, la MAP quinasa es activada por raf y MEK. De un modo similar, FRS2 fosforilado se une al complejo SHP-2/Grb2/SOS y activa la vía Ras/Raf/MEK/MAPK (Kouhara y cols. 1997; Wright y cols. 1997; Hadari y cols. 1998). También la proteína SNT (suc-associated neurotrophic factor induced tyrosine phosphorylation target) parece activar esta vía, la cual produce la neurogénesis, aunque el modo en que lo hace todavía no está claro (Stephens y cols. 1994). Otras proteínas también parecen estar actuando, de modo que ayudan a que exista una fina regulación de estas respuestas de las neuronas ante los factores neurotróficos. Esta vía induce a la diferenciación y crecimiento de las neuritas.

- ◆ Una segunda vía es a través de IRS (insulin receptor substrates IRS-1 and IRS-2) y Gab-1 (Grb-associated binder-1), proteínas adaptadoras que median la asociación y la activación de PI3K (PI3-quinasa) (Holgado-Madruga y cols. 1997; Yamada y cols. 1997). PI3K está implicado en la supervivencia neuronal por activación de la vía PKB/AKT (Franke y cols. 1997) (Crowder y Freeman 1998) y posterior fosforilación e inactivación de la proteína proapoptótica BAD de la familia de Bcl-2 (Datta y cols. 1997). PKB/AKT también induce la fosforilación del factor de transcripción Forkhead el cual controla la expresión de genes relacionados con la muerte celular como el ligando Fas (Brunet y cols. 1999).

- ◆ Una tercera vía implica la asociación de PLC- γ con Trk, regulando así los niveles intracelulares de Ca^{2+} y con esto la formación de IP_3 y DAG a partir de PIP_2 . Esta vía parece jugar un importante papel en la regulación de la secreción de neurotrofinas, y en la plasticidad de las sinapsis (Canossa y cols. 1997). También ha sido descrito que PLC- γ regula la proteína periferina, filamento intermedio específico de neuronas (Loeb y cols. 1994).

Un hecho muy interesante, y específico de la señalización de las neurotrofinas en las neuronas, es el transporte retrógrado de las señales desde el axón hasta el cuerpo neuronal. Este proceso envuelve la internalización de la neurotrofina y el transporte retrógrado de un complejo ligando-receptor (Bhattacharyya y cols. 1997; Riccio y cols. 1997). Los mecanismos de transporte no están todavía claros, aunque hay evidencias de la señalización de endosomas (Grimes y cols. 1996). No obstante, parece que los mecanismos de señalización se dan de modo más rápido que el transporte de la neurotrofina hasta el cuerpo neuronal (Senger y Campenot 1997).

La activación de estas cascadas de señales lleva finalmente a la prevención de la muerte programada y a la diferenciación celular.

Cascada de señales a partir del receptor p75.

La cascada de señales que ocasiona la unión de las neurotrofinas a p75 no está tan estudiada como en el caso de Trk. Parece ser que las neurotrofinas provocan la muerte celular a través de p75 en ausencia de los receptores Trk (Bamji y cols. 1998; Yoon y cols. 1998). Por el contrario, la coactivación de los receptores Trk mediada por p75 e inducida por neurotrofinas, inhibe la apoptosis a través de distintos mecanismos, como por ejemplo, la inhibición de la interacción de p75 con otras proteínas apoptóticas tras interaccionar con Trk (Davey y Davies 1998).

Como puede observarse en la **Figura 2.9.**, las proteínas descritas que interaccionan con la cola citoplasmática de p75 son:

- la proteína con dedos de zinc NRIF (neurotrophin receptor interacting factor) (Casademunt y cols. 1999) parece que directamente interacciona con p75 y se transloca al núcleo activando la transcripción de genes relacionados con la muerte neuronal.
- la proteína de dedos de Zn SC-1 (Scwan cell factor-1), que se transloca el núcleo e inhibe el ciclo celular (Chittka y Chao 1999).

- la proteína NRAGE (neurotrophin receptor interacting MAGE), que parece detener el ciclo celular además de impedir la interacción de p75 con el receptor Trk (Salehi y cols. 2000).
- la proteína NADE (p75 NTR associated cell death executor) que induce la muerte neuronal (Mukai y cols. 2000).
- p75 activa constitutivamente la proteína GTPasa RhoA (Yamashita y cols. 1999) relacionada con el crecimiento de la neurita, de modo que cuando las neurotrofinas interaccionan con este receptor, se desactiva esta proteína.
- las proteínas de la familia de TRAFs y la proteína FAP-1 parecen asociarse a p75, de modo que finalmente acaban activando NF- κ B (Irie y cols. 1999). La activación de esta proteína estaría relacionada con la supervivencia neuronal, lo que contradice el hecho de que p75 induzca la muerte programada en la neurona.

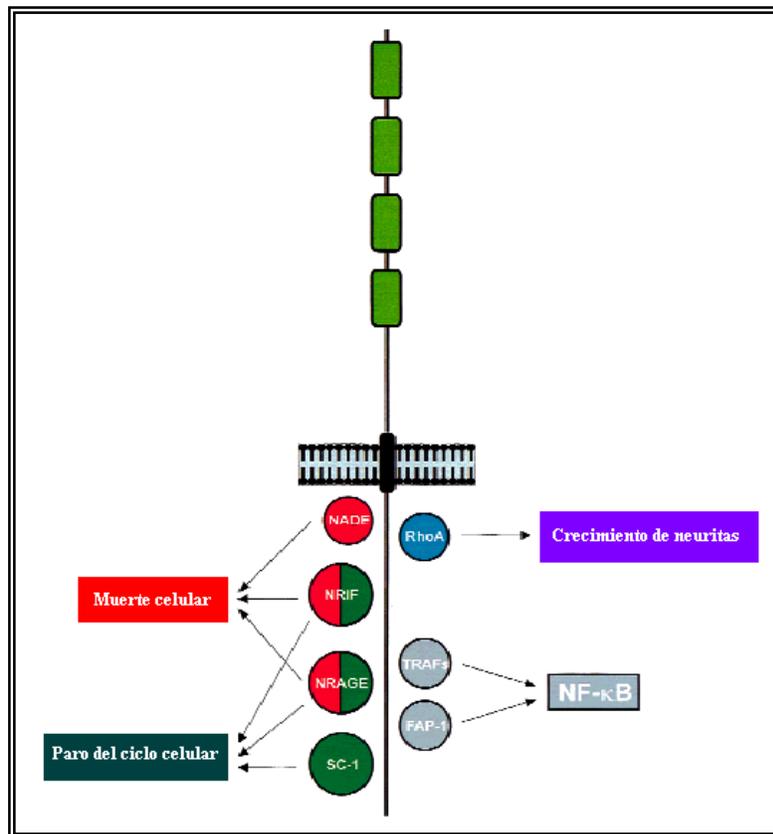


Figura 2.9.- Cascada de señales producida por la activación del receptor p75 tras interaccionar con las neurotrofinas. La activación de p75 induce a la posterior activación de NRIF, NRAGE y NADE que inducen la muerte celular. NRAGE y NRIF al igual que SC-1 están envueltas en la parada del ciclo celular. La GTPasa RhoA induce el crecimiento de las neuritas. TRAFs y FAP-1 activan el factor de transcripción NF- κ B (Bibel y Barde 2000)

En la bibliografía consultada, no se explica claramente todos los efectos de las cascadas activadas por p75. Algunos efectos observados son, la inducción de caveolina, produciendo la hidrólisis de la esfingomielina, (Bilderback y cols. 1997) (Bilderback y cols. 1999), o la inducción de apoptosis a través de la activación de caspasas, Bax/Bad, Bcl-2 y Bcl-xL, interviniendo también la proteína p53 y p73. Hasta el momento, los mecanismos de relación entre p75 y estas proteínas no están claros (Coulson y cols. 1999; Soilu-Hanninen y cols. 1999; Pozniak y cols. 2000).

2.3.1.3. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS NEUROTROFINAS.

Como hemos introducido en el capítulo anterior, las funciones atribuibles a esta familia son de tres tipos: supervivencia neuronal, modulación de la neurotransmisión y efecto en el desarrollo del Sistema Nervioso Central. Aunque los primeros estudios realizados fueron sobre neuronas en desarrollo, el efecto de rescatar neuronas en apoptosis ha sido ampliamente estudiado. Un resumen de la actuación de las neurotrofinas sobre las distintas poblaciones neuronales puede observarse en la **Tabla 2.2.** (Fizman 2003).

Numerosos estudios han sido realizados para poder llegar a conocer el efecto de dichos factores sobre los distintos tipos celulares.

Una de las propiedades más estudiadas de las neurotrofinas es su capacidad en mantener vivas la subpoblación de neuronas sensoriales. De hecho, fue así como BDNF fue identificada y purificada, al observar esta capacidad sobre neuronas que no respondían a NGF (Barde y cols. 1982).

La mayoría de los estudios han sido realizados en las neuronas sensitivas, más que en las motoras. Los ganglios de la raíz dorsal (DRG) han sido muy utilizados para establecer las propiedades de cada una de las neurotrofinas. También se han utilizado animales modelo para el estudio del efecto de los distintos factores neurotróficos. Los estudios se han basado tanto en mutaciones de las propias neurotrofinas como de los receptores asociados a ellas. Se ha observado que en ratones con el gen TrkA o el gen NGF mutado, no aparecen las

neuronas sensoriales de tamaño más pequeño y de tamaño medio. Esto corresponde a todos los axones sin mielina y al 50% de los que contienen mielina, observándose una pérdida de sensibilidad a procesos de dolor. En el caso de ratones mutantes para el gen NT-3, se observa una gran pérdida de neuronas del DRG, incluyendo la pérdida de la innervación aferente de motoneuronas de la médula espinal (Snider 1994). Por otra parte, en los animales knock out para BDNF, no se detectan mecanorreceptores, mientras para NT-4/5 carecen de receptores foliculares (Carroll y cols. 1998). Los estudios de las cuatro neurotrofinas en distintos animales modelo muestran una pérdida muy específica de innervaciones sensoriales periféricas dependiendo de la neurotrofina que se encuentra bien mutada o ausente.

Neurotrofinas	Poblaciones Neuronales
NGF	Colinérgicas del Cerebro Basal Anterior Cerebelares de Purkinje Simpáticas y Sensoriales
BDNF	Mesencefálicas Dopaminérgicas Colinérgicas del Cerebro Anterior Motoneuronas Granulares del Cerebelo Ganglionares de la Retina Ganglio Sensorial y Nodoso
NT-3	Locus Coeruleus Cerebelares de Purkinje Motoneuronas Simpáticas y Sensoriales
NT-4/5	Motoneuronas Sensoriales Granulares del Cerebelo Estriatales

Tabla 2.2.- Poblaciones neuronales sobre las que las neurotrofinas presentan efecto en ratones.

En el caso de las neuronas de los ganglios simpáticos, se ha observado mediante estudios con anticuerpos para NGF que este factor es necesario para la supervivencia de algunas de ellas (Levi-Montalcini y Booker 1960). Estos estudios han sido reforzados con los realizados sobre animales knock out para NGF y TrkA (Fagan y cols. 1996). Con estudios similares, se ha observado que también NT-3 es necesario para mantener la supervivencia en ciertas subpoblaciones de los ganglios simpáticos, y que este efecto lo realiza a través del receptor TrkA, en lugar del receptor TrkC (Wyatt y cols. 1997). Pero no solamente estas neurotrofinas ejercen una función de supervivencia, sino que también inducen a la diferenciación neuronal, observándose que NT-3 cuando interacciona con TrkC en esta subpoblación neuronal, induce a la diferenciación en neuronas colinérgicas (Brodski y cols. 2000). En el caso de NGF, al interaccionar con TrkA, promueve la diferenciación en neuronas adrenérgicas (Brodski y cols. 2000). Se observa como la señalización a partir de dos receptores distintos en la misma célula, induce a diferentes diferenciaciones.

Por otro lado, y en estudios realizados sobre el Sistema Nervioso Central, se ha observado que en ratones con mutaciones en el gen TrkB o en el gen TrkC existe muerte celular en el hipocampo y el córtex cerebral (Minichiello y Klein 1996; Alcantara y cols. 1997). En el caso de ratones knock out para BDNF existe una reducción en el número de neuronas presentes en el cerebelo (Schwartz y cols. 1997). No obstante, no está claro si este efecto de pérdida neuronal es debido a la propia mutación del gen, o al efecto masivo y temprano que dichas mutaciones ejercen en el Sistema Nervioso Periférico. Otros estudios más recientes han mostrado que el Sistema de señalización de TrkB parece esencial en el Sistema Nervioso Central adulto. Utilizando mutaciones en TrkB inducibles en estadios postnatales, observaron unas claras reducciones en el tamaño del cortex cerebral causadas por la disminución del tamaño de las neuronas, el número de éstas y el tamaño de sus dendritas (Minichiello y cols. 1999) (Xu y cols. 2000).

También se han realizado estudios seccionando el nervio, y se ha observado que la supervivencia de algunas neuronas depende de neurotrofinas. En concreto, las células del ganglio retinal mueren tras la sección del nervio óptico, siendo rescatadas una significativa proporción tras la administración de BDNF o

NT-4/5 (Sawai y cols. 1996). En el tracto corticoespinal, trabajos recientes indican que el BDNF endógeno, es esencial para prevenir la muerte de una proporción significativa de las neuronas axotomizadas. El efecto contrario muestra NT-3 endógeno, que causa la muerte de estas neuronas (Giehl y cols. 2001).

Finalmente, en el caso de las motoneuronas, población de interés en este trabajo, ha sido demostrado *in vitro* que excepto NGF, los factores BDNF, NT3 y NT4/5 son necesarios para la supervivencia de las mismas, incluso a concentraciones del orden de picomoles (Sendtner y cols. 1992; Henderson y cols. 1993; Hughes y cols. 1993). Sin embargo, en el caso del Sistema Nervioso Central la actuación de las neurotrofinas en la supervivencia neuronal no está tan clara. La determinación de sus efectos ha sido más complicada, debido a la dificultad de encontrar poblaciones homogéneas de neuronas en este tejido. Así en el caso de ratones knock out de BDNF o NT-4/5 no se encontró ningún descenso en el número de motoneuronas de la medula espinal (Liu y cols. 1995), ni tampoco en la retina (Cellerino y cols. 1997). Los estudios son contradictorios ya que en el caso de BDNF, se ha descrito su capacidad de mantener la supervivencia de las motoneuronas al tratar ratas previamente lesionadas con fibroblastos expresando el factor neurotrófico. Lo que parece demostrado es que mantiene la supervivencia pero no induce al crecimiento axonal (Lu y cols. 2001)

La observación de que las neurotrofinas son capaces de inducir la muerte de las células durante el desarrollo es bastante reciente, y todavía no se conocen exactamente los mecanismos del papel biológico que juega el receptor p75. Experimentos con cultivos de oligodendrocitos han mostrado que con el paso del tiempo, expresan p75 e inducen a muerte celular por la adición de NGF (Casaccia-Bonnel y cols. 1996). Por otra parte, se ha observado, que la sobreexpresión de p75 en ratones transgénicos causa la muerte de un gran número de neuronas en el Sistema Nervioso Central (Majdan y cols. 1997). Además, en animales donde p75 está mutado, la muerte programada celular está reducida (Frade y cols. 1996; Frade y Barde 1999). Similares resultados han sido descritos en el caso de BDNF tanto en modelos animales como en cultivos (Bamji y cols. 1998).

Otro hecho muy interesante, es que las neurotrofinas, en su forma de proneurotrofinas, parecen ser activas y tener una alta afinidad por p75, activando señales de muerte celular. Esto ha sido demostrado para la neurotrofina NGF pero parece ser extensible a todas las neurotrofinas y GDNF (Chao y Bothwell 2002).

Existen otros estudios en que el papel de p75 no está tan definido. En ratones knock out para p75, se ha observado que existe un menor número de motoneuronas en la médula espinal y en el ganglio de la raíz dorsal (Lee y cols. 1992; Lee y cols. 1994; Stucky y Koltzenburg 1997; Wiese y cols. 1999). Sin embargo, esta reducción podría ser una consecuencia indirecta de que la elongación axonal en estas neuronas se encuentre retardada, y por tanto, retarde el acceso de las mismas a las células que secretan los factores neurotróficos para su desarrollo adecuado (Yamashita y cols. 1999),.

Otra de las funciones atribuidas a las neurotrofinas, es la regulación del crecimiento de las dendritas y los axones. En ratas adultas, cuando se administra NGF directamente, las dendritas de las neuronas del sistema periférico aumentan de tamaño, disminuyendo cuando se aplican anticuerpos contra el mismo (Ruit y cols. 1990). Este hecho ha sido demostrado también en neuronas piramidales, al aplicarles BDNF, NT-3 o NT-4/5 (McAllister y cols. 1995). Sin embargo, los efectos combinados de estos factores sobre el crecimiento de las dendritas pueden llegar a ser antagonistas, como ha sido demostrado en el cortex cerebral cuando se aplican BDNF y NT-3 (McAllister y cols. 1996).

Las neurotrofinas no controlan únicamente el crecimiento de las dendritas, sino también el número de sinapsis y la eficacia de la transmisión sináptica. Experimentos, en los que se utilizaron distintas dosis de NGF, mostraron una rápida regulación en la intensidad y el número de pulsos presinápticos (Nja y Purves 1978). Ratones transgénicos, sobreexpresando BDNF en neuronas simpáticas, mostraron un aumento en el número de sinapsis, mientras en ratones knock out para el mismo gen se produjo un descenso (Causing y cols. 1997).

Si pensamos en la utilización de las neurotrofinas como tratamiento de enfermedades humanas, de especial interés son sus efectos sobre el

comportamiento. Los ratones knock out para las neurotrofinas son letales cuando están en homocigosis. Sin embargo, investigaciones con animales en heterocigosis o en ratones knock out condicionales, han comenzado a revelar interesantes resultados en el campo del comportamiento. Estos ratones condicionales desarrollan con el tiempo problemas en el aprendizaje del espacio, típicas de lesiones a nivel de hipocampo (Minichiello y cols. 1999; Xu y cols. 2000). En animales heterocigotos para el gen BDNF, se observaron también déficits en el aprendizaje (Linnarsson y cols. 1997), acompañado de una ganancia de peso en estadios tempranos de edad y desarrollando a la vez un aumento en la agresividad e hiperfagia, (Lyons y cols. 1999; Kernie y cols. 2000).

La presencia de agresividad se ha relacionado con deficiencias serotoninérgicas, ya que tratándolos, la agresividad desciende (Mamounas y cols. 2000). Respecto a la ganancia de peso, parece estar relacionado con la expresión de TrkB y BDNF en núcleos de la saciedad del hipotálamo. Tratamientos por infusión de BDNF, así como de NT-4/5 durante 6 días, han mostrado pérdidas de peso de un 30 %, relacionado por la disminución en el tamaño de los adipocitos. Tras 90 días finalizado el tratamiento los ratones pueden recuperar el peso normal (Bibel y Barde 2000).

Por ahora, existen estudios que demuestran que BDNF está implicado en un complejo patrón de comportamientos. Los knock out condicionales podrían mostrar en un futuro el amplio rango de acciones de las neurotrofinas en el Sistema Nervioso Central de los ratones adultos.

Por último, y debido a que en el presente trabajo hemos utilizado la neurotrofina BDNF, hemos considerado conveniente el realizar un apartado específico para la misma.

2.3.1.4. BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF).

Características generales.

El factor neurotrófico Brain Derived Neurotrophic Factor, denominado BDNF, fue aislado por primera vez por Barde, Y.A. en 1.982 (Barde y cols. 1982) a partir de cerebro de cerdo. Observaron que mantenía la supervivencia en neuronas sensoriales de embriones de pollo y el crecimiento de dendritas, al igual que NGF. Sin embargo, fueron necesarios varios años hasta su caracterización en la especie humana por técnicas moleculares (Leibrock y cols. 1989). Determinaron que BDNF contiene 120 aminoácidos y presenta una alta homología (54 %) con NGF.

La localización del gen de BDNF en humano fue descrita posteriormente por Maisonpierre y cols. en 1.991 (Maisonpierre y cols. 1991). La secuencia de la forma madura de BDNF, en todas las especies mamíferos, está muy conservada, así como su distribución en los distintos tejidos. Los códigos de acceso de la secuencia del gen y de su secuencia proteica en la base de datos son: [GI=179406](#); [AAA96140.1](#); [GI=203124](#); [AAA63483.1](#).

Como hemos comentado anteriormente, todas las neurotrofinas son generadas como precursores denominados pre-pro-neurotrofinas, posteriormente son procesados mediante proteólisis a una forma que denominaremos madura.

El gen de BDNF de rata, que junto al de ratón es el mejor caracterizado actualmente, consta de cuatro exones en el extremo 5' que contienen su propio promotor. Todos ellos son combinados con el exón del extremo 3' que codifica para la pre-pro-proteína correspondiente a 249 aa_x (**Figura 2.10.**) (Timmusk y cols. 1994; Timmusk y cols. 1995).

```
1  MTILEFLTMVI SYFGCMKAAP MKEANVHGQG NLAYPAVRTH GTLESVNGPR
61  LADTFEHVIE ELLDEDQKVR PNEENHKDAD LYTSRVMLSS QVPLEPPLLF
121 AANMSMRVRR HSDPARRGEL SVCDISEWV TAADKKTAVD MSGGTVTVLE
181 QYFYETKCNP MGYTKEGCRG IDKRHWNSQC RTTQSYVRAL TMSKKRIGW
241 CTLTIKRGR
```

Figura 2.10.- Secuencia codificante de la proteína formada por una secuencia de 18 aa_x y otra de 113 aa_x que serán proteolizadas en posteriores procesos de posttraducción (Lessmann y cols. 2003).

Los 18 aa_x de la secuencia pre- son eliminados al entrar la proteína al retículo endoplasmático obteniéndose la forma de proproteína de 231 aa_x (32 kDa). La transición por proteólisis a la forma madura de 118 aa_x (14 kDa), se produce posteriormente. Esta secuencia es un péptido de señalización, dirige la síntesis de la proteína hacia los ribosomas unidos al retículo endoplasmático, provocando la internalización de la proteína recién sintetizada al interior del mismo tal y como puede observarse en la **Figura 2.11.** donde es eliminada (Halban y Irminger 1994; Merighi 2002). Espontáneamente, en el interior del retículo, las proneurotrofinas pueden formar homodímeros no unidos covalentemente e incluso heterodímeros con otras proteínas. Posteriormente, las proneurotrofinas son transportadas a través del retículo endoplasmático mediante vesículas no asociadas a clatrina hacia el área *trans* del aparato de Golgi donde son fusionadas. En estas vesículas, pueden ir solas o acompañadas de otros neuropéptidos (Merighi 2002). A partir de aquí dos posibles vías de secreción por formación de vesículas se han observado para la secreción de BDNF, y posiblemente para todas las neurotrofinas. Una vía independiente de Ca²⁺, en la que se forman pequeñas vesículas de 50-100 nm. de diámetro, que finalmente son fusionadas a la membrana plasmática liberando su contenido. Esta es una vía constitutiva presente en todas las células (Harter y Reinhard 2000). Otra vía de secreción dependiente de Ca²⁺, donde se forman vesículas mayores, de 100-300 nm. de diámetro. Las vesículas en este caso se fusionan a la membrana plasmática en sitios específicos de la membrana ricos en colesterol (Lang y cols. 2001).

En la matriz de la membrana celular, la forma de proBDNF es procesada dando lugar a la forma madura. Es necesaria la N-glicosilación en el prodominio y la sulfatación de estos oligosacáridos N-glicosilados (Mowla y cols. 2001). La proteólisis de los prodominios es realizada por las denominadas convertasas de

pro-proteínas: PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7, PACE4 (paired basic amino acid cleaving enzyme 4) y furina (Khatib y cols. 2002).

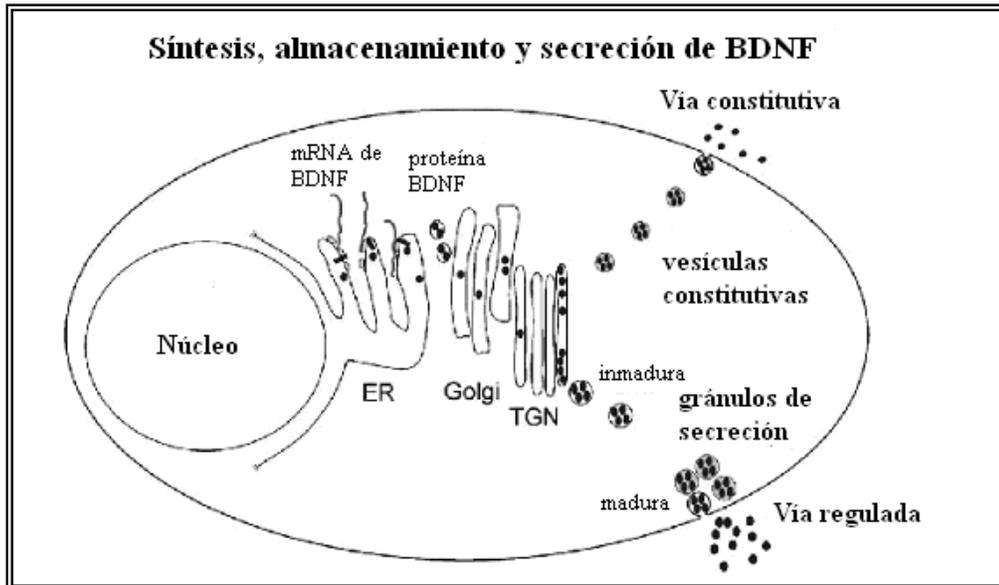


Figura 2.11.- Ruta intracelular desde la síntesis hasta la secreción de BDNF. El mRNA es traducido en el retículo endoplasmático (ER) y transportado al aparato de Golgi. En la zona trans del Golgi (TGN) es procesado por convertasas y partir de él puede seguir dos vías de secreción: una constitutiva y otra regulada por calcio. Pueden escaparse algunas vesículas conteniendo la forma del propéptido (Lessmann y cols. 2003).

En el procesamiento postranscripcional de BDNF se obtiene tanto la proneurotrofina de BDNF de 32 kDa (debido a que no toda la proneurotrofina es procesada) y la forma madura de 14 kDa. Sin embargo, la secreción de la forma de proproteína todavía no está claramente demostrada (Lessmann y cols. 2003). Se ha descrito recientemente que también se produce una forma de 28 kDa, que no parece ser un intermediario del procesamiento hacia la forma madura de la que no se conoce todavía su actividad biológica (Mowla y cols. 2001).

Tras la secreción, BDNF se une a sus receptores Trk y p75 como ha sido descrito anteriormente. El complejo receptor-ligando es endocitado y transportado retrógradamente desde el axón al soma de la neurona donde puede activar la cascada de señalización intracelular que promueve la supervivencia de las neuronas (**Figura 2.12.**) (Heerssen y Segal 2002).

Además de esta ruta retrógrada, se ha descrito una ruta anterógrada en regiones específicas del cerebro, de forma que BDNF puede presentar acciones autocrinas o paracrinas, dependiendo de donde se exprese su receptor específico TrkB (Altar y DiStefano 1998). Otro proceso interesante en la secreción de esta neurotrofina, es la re-exocitosis por parte de las neuronas del ligando una vez que este ha sido endocitado, sin necesidad de pasar por el aparato de Golgi (Butowt y von Bartheld 2001; Weible y cols. 2001).

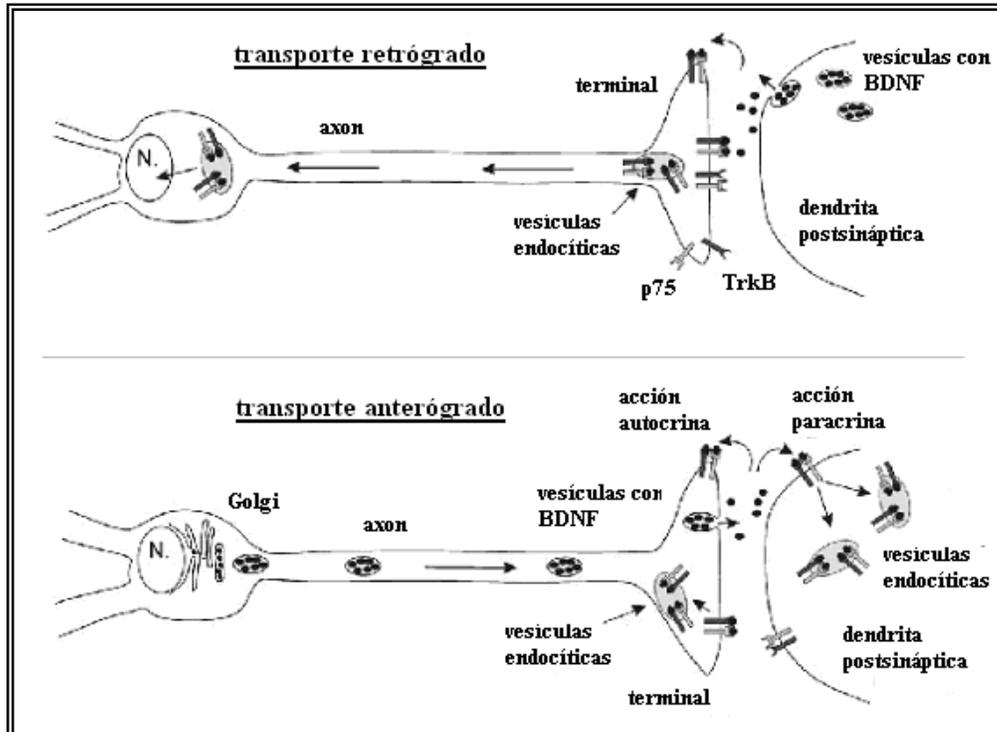


Figura 2.12.- En el panel superior, puede observarse el transporte retrógrado de BDNF a través de las neuronas. El factor neurotrófico, unido a su receptor, ejerce su función desde la membrana plasmática o vesículas mientras es transportado retrógradamente. En el panel inferior, puede observarse el transporte anterógrado de BDNF a través de las neuronas. El factor neurotrófico es transportado por el axón hacia la neurona con la que conecta.

Numerosos estudios se han ocupado de la regulación de la secreción de esta molécula. Se ha demostrado que la secreción de BDNF está modificada por variaciones en la estimulación eléctrica de la neurona, así como por la acción de hormonas, neurotransmisores y daños en la misma (Murer y cols. 2001). Existen estudios que demuestran que el propio BDNF, autorregula su expresión, incrementando los niveles intracelulares de Ca^{2+} e induciendo la activación de la

misma. Sin embargo, también se ha demostrado que una exposición prolongada a BDNF parece disminuir la expresión de TrkB lo cual es una forma de regulación negativa de su actividad (Knusel y cols. 1997). Otro modo de regulación negativa de la actividad de BDNF, es su unión a formas de TrkB que no contienen cola intracitoplasmática (Eide y cols. 1996; Ninkina y cols. 1996).

La determinación de la expresión de BDNF en el Sistema Nervioso Central en adultos no ha sido fácil. Por una parte, presenta bajos niveles de expresión, y por otra, porque la exposición de sus epítomos ante los anticuerpos que se usan para reconocerlo depende de su localización subcelular (Murer y cols. 2001).

La distribución de BDNF ha sido estudiada tanto a nivel proteico, mediante inmunohistoquímica, como a nivel de mRNA. Los estudios de localización de mRNA permiten determinar, donde se está expresando y a nivel proteico donde se encuentra. Sin embargo, además de los dominios de expresión de BDNF, es muy importante conocer donde se expresa TrkB para conocer donde actúa (**ver Tabla 2.3.**) (Murer y cols. 2001).

En humanos y roedores, se ha descrito la coexpresión de BDNF y TrkB en las neuronas piramidales del cortex cerebral y del hipocampo, determinada por la alta inmunoreactividad en estos tejidos a nivel de proteína y de mRNA (Murer y cols. 2001). Se ha sugerido la existencia de una interacción a nivel autocrino y paracrino (Kokaia y cols. 1993). Las interneuronas corticales y del hipocampo, en roedores, expresan TrkB pero no BDNF, lo que sugiere que BDNF producido por las neuronas piramidales corticales actúa sobre estos circuitos locales (Marty y cols. 1997). Además, se ha observado un transporte anterógrado en estos tejidos (Murer y cols. 2001).

En el claustrum se ha descrito la presencia de BDNF y TrkB en forma de proteína y de mRNA (Phillips y cols. 1990; Benisty y cols. 1998; Murer y cols. 2001). En el caso de las amígdalas se ha observado también en roedores pero no en humanos, la presencia de TrkB tanto a nivel de proteína como de mRNA (Phillips y cols. 1990; Conner y cols. 1997; Murer y cols. 2001).

Región del Sistema Nervioso Central	TrkB		BDNF	
	mRNA	Proteína	mRNA	Proteína
Neuronas piramidales del cortex.	+	+	+	+
Hipocampo.	+	+	+	+
Clastrum.	+	+	+	+
Amígdala.	-	-	+	+
Neuronas colinérgicas del septum y de la base del tronco del encéfalo	+	+	-	+
Neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.	+	+	-	+

Tabla 2.3. Localización de la proteína y mRNA de BDNF y TrkB en distintas regiones del S.N.C. de humanos

En las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert, del septum y de la base del tronco encefálico, no se ha observado expresión de BDNF a nivel de mRNA, aunque si de TrkB, lo que parece indicar que reciben la señalización desde neuronas aferentes. El factor neurotrófico BDNF sería aportado desde el cortex cerebral y el hipotálamo (Benisty y cols. 1998; Murer y cols. 1999; Murer y cols. 2001).

Respecto a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, se observa una fuerte inmunoreactividad de TrkB y BDNF, pero sin embargo, no existe expresión de mRNA de BDNF. Este último es aportado a la sustancia negra desde zonas inferiores al tronco encefálico (Murer y cols. 2001).

En el caso de la distribución de BDNF en el cerebelo, existen discrepancias en los estudios realizados, como la presencia o no en algunos estudios de BDNF en las células de Purkinje (Murer y cols. 2001).

Ha sido descrito como BDNF mantiene la supervivencia de las motoneuronas, subpoblación de interés en este trabajo (Henderson y cols. 1993). Henderson y colaboradores, observaron como el mRNA de BDNF se encontraba presente en la médula espinal y en tejidos musculares, así como la expresión de TrkB en las motoneuronas. Realizaron estudios de supervivencia neuronal en cultivos de motoneuronas, comprobaron que BDNF mantenía la supervivencia de éstas durante tres días.

Hemos descrito previamente las vías de señalización para el mantenimiento de la supervivencia neuronal. Una de las rutas propuestas para realizarla por parte de las neurotrofinas, ha sido la activación de la familia de proteínas IAP (inhibitor of apoptosis protein). Esta proteína bloquea la actividad de las caspasas 9 y 3, inhibiendo de este modo la ejecución de la apoptosis (Sendtner y cols. 2000).

Este efecto, de inhibición de la apoptosis y mantenimiento de la supervivencia en las motoneuronas, presenta a BDNF como un buen candidato para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de las motoneuronas.

BDNF en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

BDNF presenta un potente efecto de promoción de la supervivencia durante el desarrollo de las motoneuronas tanto *in vitro* (Henderson y cols. 1993) como *in vivo* (Koliatsos y cols. 1993). Este mismo efecto, también es observado tras la axotomización de nervios (Yan y cols. 1992; Yan y cols. 1993; Li y cols. 1994). También aumenta la actividad acetilcolintransferasa en cultivos de motoneuronas (Wong y cols. 1993), así como la actividad y maduración de las sinapsis neuromusculares *in vitro* (Lohof y cols. 1993; Wang y cols. 1995). Sin embargo, aunque se han observado efectos de supervivencia promovidos por BDNF en la médula espinal, cuando se realizan cultivos de motoneuronas procedentes del cortex cerebral se producen procesos de necrosis (Koh y cols. 1995). Como puede apreciarse, los efectos de las neurotrofinas y en este caso de BDNF, parecen variar de neuroprotección a inducción de muerte celular,

dependiendo del tipo neuronal, el tipo de receptor y el modelo experimental utilizado.

En nervios periféricos intactos, los niveles de BDNF son bajos, pero se ha demostrado que cuando son dañados, la producción de mRNA aumenta a nivel de músculo y de nervios distales. Estos datos sugieren que BDNF participa en la regeneración de las motoneuronas (Meyer y cols. 1992; Koliatsos y cols. 1993). Del mismo modo, daños en los nervios de los animales adultos reducen la actividad colinacetiltransferasa de los mismos (Friedman y cols. 1995). El tratamiento con BDNF ha mostrado prevenir la pérdida de la actividad colinacetiltransferasa, de modo que inyecciones intratecales aumentan la supervivencia, el tamaño celular, la expresión de la enzima colinérgica y el crecimiento axonal (Kishino y cols. 1997; Wang y cols. 1997).

Su efecto sobre las motoneuronas también ha sido puesto de manifiesto en algunos modelos animales de enfermedades de la motoneurona, en los que frena la progresión de la debilidad, aunque el mecanismo de acción no está totalmente aclarado (Mitsumoto y cols. 1994; Ikeda y cols. 1995). Existen estudios *in vitro* que han mostrado que el mantenimiento de la supervivencia de las motoneuronas por BDNF se debe a la inhibición de la expresión de la óxido nítrico sintasa (nNOS), enzima encargada de la eliminación de NO de la célula (Estevez y cols. 1998). El NO no eliminado tiene la capacidad de reaccionar con radicales superóxido, generando peroxinitrito y facilitando la formación de compuestos de nitrotirosina, y por tanto, induce a la posterior apoptosis de las neuronas. Estos datos justificarían la observación de la disminución de nNOS en modelos animales MND (“motor neurone diseases”) tras la administración de BDNF (Novikov y cols. 1995; Novikov y cols. 1997). Todas estas evidencias apoyan el potencial terapéutico de la utilización de BDNF en enfermedades que afectan a las motoneuronas en el ser humano.

Algunos estudios han relacionado a las neurotrofinas, principalmente NGF y BDNF, con la enfermedad del Alzheimer. En concreto, se ha observado en pacientes con esta enfermedad una disminución de los niveles de BDNF en las

regiones neocorticales e hipocampales (Phillips y cols. 1991; Narisawa-Saito y cols. 1996).

También en el caso de la Neuropatía Diabética se han realizado ensayos clínicos con BDNF, pero en fase I y II, sobre 21 pacientes no se han observado efectos (Wellmer y cols. 2001).

Para la enfermedad de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, se realizaron ensayos clínicos en fase I y II, con BDNF, que involucraron un total de 283 pacientes. ("A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III)" 1999). Los pacientes, de una forma más o menos generalizada, toleraron bien las inyecciones conteniendo BDNF, a excepción de ciertas reacciones en los puntos de inyección, y en algunos casos, ciertos síntomas gastrointestinales. Tras seis meses de estudio, se observó menor pérdida en la función respiratoria en los pacientes tratados, frente a los que habían tomado el placebo. Tras nueve meses de estudio, la supervivencia en los pacientes tratados fue superior a los no tratados, aunque esta diferencia no fue significativa. Basándose en estos resultados tan esperanzadores, se procedió a los ensayos clínicos en fase III. Este estudio involucró a 1.050 pacientes con E.L.A. Lamentablemente, los resultados no fueron los deseados, ya que los pacientes en el grupo placebo no mostraron diferencias con el grupo tratado, no observándose diferencias ni en la supervivencia, ni en la función pulmonar.

Tras estos resultados, algunos investigadores propusieron la aplicación directa del factor intratecalmente. Se observó en ovejas que la aplicación intratecal de BDNF no atravesaba el parénquima espinal y se acumulaba en las motoneuronas espinales (probablemente recogido por las raíces ventrales y transportado retrógradamente) (Dittrich y cols. 1996). Se observaba también como aumentaban los niveles de *c-fos* al aumentar las dosis aplicadas de BDNF. Tras realizar los ensayos clínicos, se confirmaron estos hechos al aplicar el factor mediante una bomba de infusión. La aplicación fue bien tolerada aunque algunos pacientes presentaron síntomas secundarios de sequedad en la boca, insomnio y agitación a dosis altas (Ochs y cols. 2000). El pequeño número de pacientes (25 en total) no permitió la obtención de conclusiones.

En febrero del 2001, la empresa Regeneron Pharmaceuticals, Inc. informó del final de los ensayos clínicos, debido a la falta de resultados satisfactorios. Actualmente no existen ensayos clínicos con BDNF para la E.L.A. No obstante, se siguen realizando estudios para conocer las causas por las que estos resultados no fueron satisfactorios (Kalra y cols. 2003).

2.3.2. LIGANDOS DE LA FAMILIA DE GDNF (GFLS).

2.3.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA.

Las primeras proteínas purificadas bioquímicamente de esta familia fueron GDNF, Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor y NRTN, Neurturina (Lin y cols. 1993; Kotzbauer y cols. 1996). Dichas proteínas fueron aisladas mediante el estudio de su actividad biológica. Posteriormente PSPN, Persefina (Milbrandt y cols. 1998) y ARTN, Artemina, (Baloh y cols. 1998) fueron aisladas mediante búsqueda por homología a los anteriores. Estructuralmente las GFLs pertenecen a la superfamilia de TGF- β y contienen siete residuos cisteína. A pesar de su baja homología de secuencia, tienen similitudes a los miembros de la familia por presentar los “nudos de cistina” característicos de la familia, y por actuar como homodímeros (Ibanez 1998).

Al igual que ocurre en el caso de las neurotrofinas, se ha observado una coevolución, mediante estudios filogenéticos, entre los miembros de esta familia y de sus receptores específicos a lo largo de la historia de los vertebrados (Ibanez 1998) como puede apreciarse en la **Figura 2.13**.

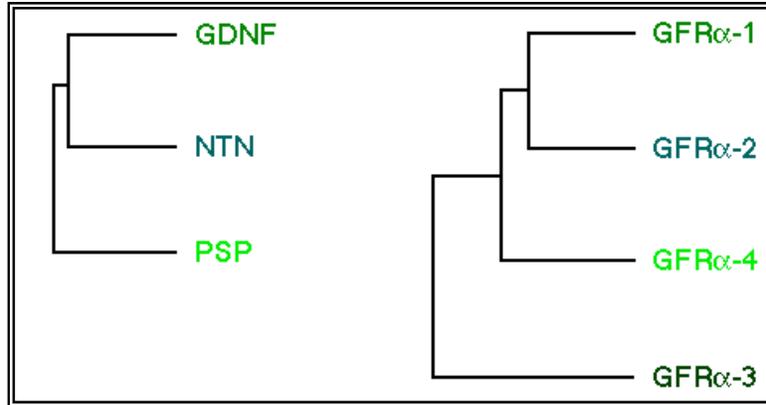


Figura 2.13.- Coevolución de las parejas ligando-receptor en la familia de GDNF. A la izquierda, la evolución de los ligandos, y a la derecha, de los receptores de los mismos (Ibanez 1998)

2.3.2.2. MODO DE ACTUACIÓN.

Las GFLs son sintetizadas, secretadas y activadas por una gran variedad de tejidos, uniéndose posteriormente a sus receptores en células específicas. Ayudan en el desarrollo, supervivencia y diferenciación de las neuronas en los animales adultos.

Todos los miembros de la familia son secretados al igual que las neurotrofinas, de modo que se sintetizan en forma de preproteína, y son proteolizados en la secreción quedando así activados. Se supone que las GFLs se unen a proteoglicanos de la matriz celular, para restringir su difusión y aumentar la concentración local (Hamilton y cols. 2001). Sin embargo, los mecanismos de regulación y secreción no son muy conocidos actualmente.

Todas las GFLs se unen al receptor RET (Receptor Tyrosine Kinase), el cual fue descubierto como un protooncogen. Para activar el receptor, las GFLs deben unirse al mismo tiempo a otra familia de receptores, que son los que marcan la especificidad de la unión ligando-receptor. Esta es la familia de receptores denominada GFR- α (GDNF-family receptor- α), los cuales se unen a la membrana por un puente GPI (glycosilphosphatidylinositol). Existen cuatro receptores GFR- α diferentes: GFR- α 1 que se une específicamente a GDNF

aunque también pueden unirse NRTN y ARTN con una especificidad menor; GFR- $\alpha 2$ que se une específicamente a NRTN, aunque también puede unirse GDNF con una especificidad menor; GFR- $\alpha 3$ que se une específicamente a ARTN, aunque también puede unirse GDNF con una especificidad menor y finalmente GFR- $\alpha 4$: que se une específicamente a PSPN (**Figura 2.14.**) (Airaksinen y cols. 1999; Baloh y cols. 2000; Lindahl y cols. 2001; Takahashi 2001)

Los receptores GRF- α suelen estar unidos a la membrana citoplasmática, pero pueden encontrarse a veces en forma soluble, al ser liberados de la membrana por una fosfolipasa o proteasa desconocida actualmente (Paratcha y cols. 2001).

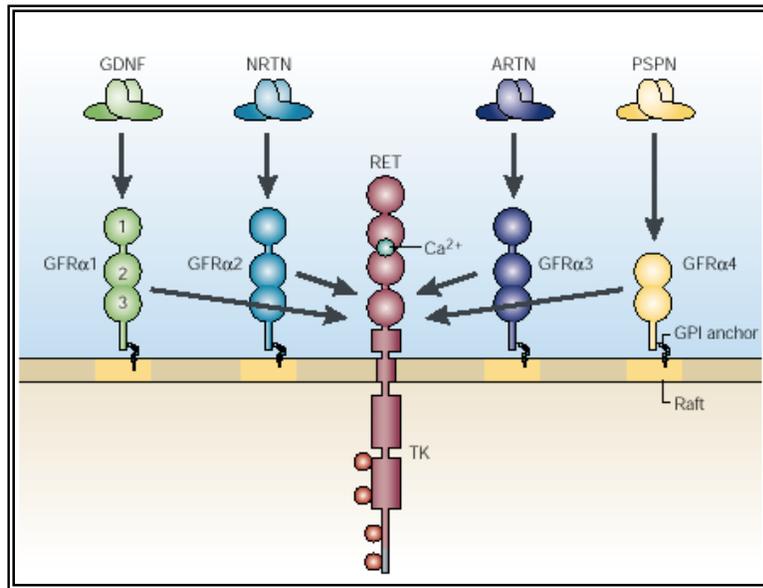


Figura 2.14.- Interacciones entre receptores y ligandos de la familia GFLs. Cada receptor interacciona específicamente con un receptor e inespecíficamente con el receptor RET (Airaksinen y Saarma 2002).

El receptor RET es una proteína transmembranal, que presenta cuatro dominios repetidos similares a los de caderina (uno de ellos une iones calcio), en la zona extracelular, y un dominio tirosina quinasa en la zona intracelular (**Figura 2.14.**) (Airaksinen y Saarma 2002). El complejo GFL- GFR- α ya formado, se une al dominio extracelular de RET activando la tirosina quinasa intracelular. Las GFLs, en forma de dímero, se unen a los receptores GFR- α (en forma dimérica o

monomérica), formando un complejo que finalmente interacciona con dos moléculas de RET, induciendo su homodimerización y su autofosforilación (Airaksinen y cols. 1999). Los receptores GFR- α muestran baja capacidad de asociación con el receptor RET si no se encuentran formando el complejo con las GFLs (Eketjall y cols. 1999).

Una vez formado el complejo GFLs-GFR α -RET, se da la autofosforilación de la cola citoplasmática de RET en sus cuatro tirosinas: Tyr905, Tyr1015, Tyr 1062 y Tyr 1096. Las vías activadas, tras la autofosforilación de RET, dependen del estado de los receptores GFR- α en forma soluble o unidos a la membrana. Así, cuando GFR- α se encuentra unido a la membrana (estimulación *in cis*) se produce la unión y activación de la proteína asociada a membrana FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2). Sin embargo, cuando GFR- α se encuentra en forma soluble (estimulación *in trans*) se produce la unión y activación de la proteína soluble Shc (Src-homologous and collagen-like- protein), como se puede observar en la **figura 2.15** (Airaksinen y Saarma 2002).

Además de Shc y FRS2, el receptor RET une otras proteínas como: DOK4/5 (downstream of tyrosine kinase 4/5), IRS1/2 (insuline receptor substrate 1/2) y Enigma. A partir de todas estas proteínas unidas a la Tyr1062, se desencadena la cascada de señales que anteriormente se han descrito con las neurotrofinas (Takahashi 2001) : activación de MAPK (mitogen activated protein kinase), activación de PI3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) y activación de PLC- γ (phospholipase- γ). El destino final de estas cascadas es similar al de las neurotrofinas.

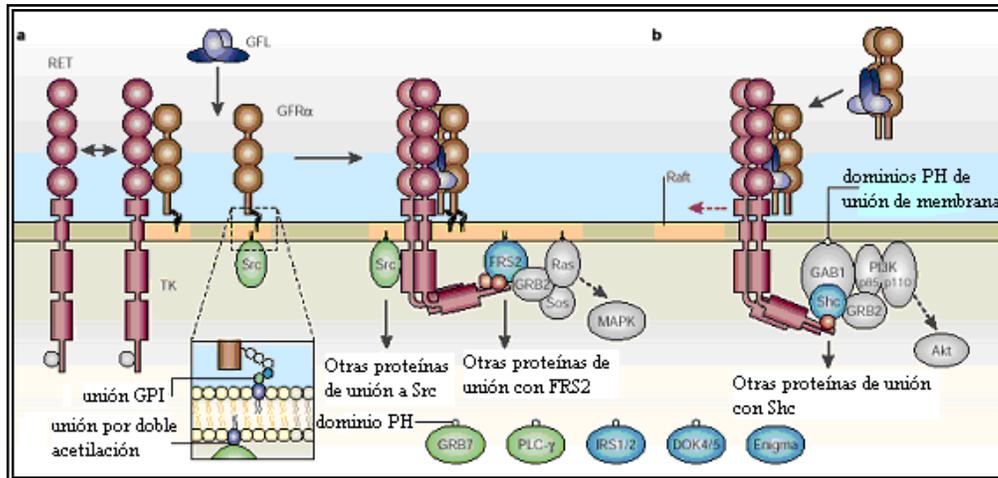


Figura 2.15.- Señalizaciones de la familia GFLs: **a)** estimulación en cis, los receptores GFR α se encuentran unidos a la membrana, activándose la actividad tirosina quinasa y FRS2 **b)** estimulación en trans, los receptores GFR α se encuentran solubles activándose otras proteínas a través de Shc. Existen otras proteínas activadas a través de RET pero los mecanismos no están tan claros (GRB, PLC- γ , IRS1/2, DOK 4/5 y Enigma) (Airaksinen y Saarma 2002)

Han sido descritas otras vías minoritarias de activación de señales intracelulares independiente de RET por parte de GDNF, representadas en la **Figura 2.16**. En este caso, es la activación de SFK (Src family kinase) y la subsiguiente activación de las vías mencionadas: MAPK, PLC- γ y PI3-kinase para activar de nuevo CREB y *c-fos* relacionados con la supervivencia neuronal (Trupp y cols. 1999). Esto no ocurre con NRTN-GFR α 2 (Pezeshki y cols. 2001). Debido a que GFR α 1 no debería poder interaccionar con SFK se postuló la existencia de un nuevo receptor transmembranal (Airaksinen y Saarma 2002). Recientemente se ha descrito que NCAM (molécula de adhesión celular) sería el receptor en esta vía (Paratcha y cols. 2003).

2.3.2.3. ESTUDIOS FUNCIONALES.

A continuación describiremos brevemente algunas de las funciones de esta familia de factores neurotróficos. Como en el caso anterior, están relacionadas con la supervivencia y diferenciación neuronal.

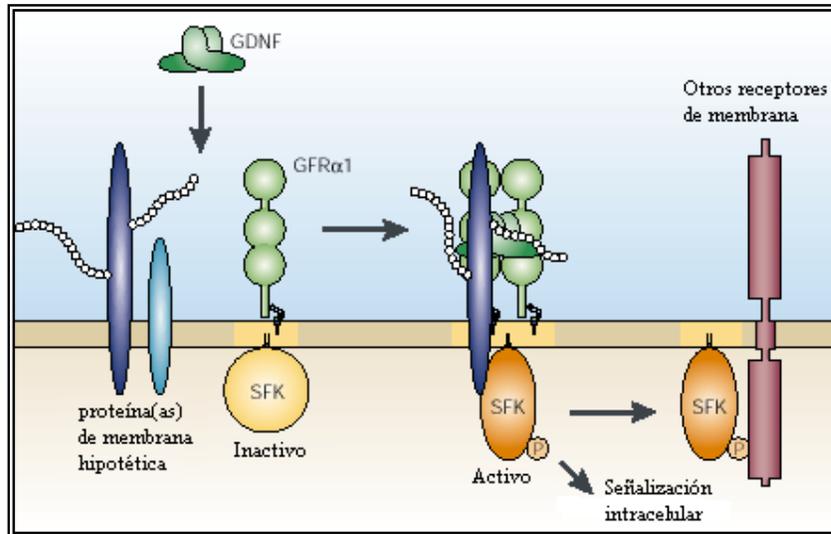


Figura 2.16.- Señalización independiente de RET para GDNF. GDNF puede activar SFK a través de GFRα1 (Airaksinen y Saarma 2002).

Se ha observado que ARTN y GFRα3 tienen su acción en la migración de las neuronas precursoras del ganglio cervical superior durante el desarrollo (Nishino y cols. 1999), pero no se ha visto si tienen algún efecto en los animales adultos. Parece ser que estas neuronas necesitan la quimioatracción de ARTN durante el desarrollo para su correcta migración. En los animales adultos son NGF y NT-3 los encargados de la supervivencia de este tipo de neuronas (**Figura 2.17**).

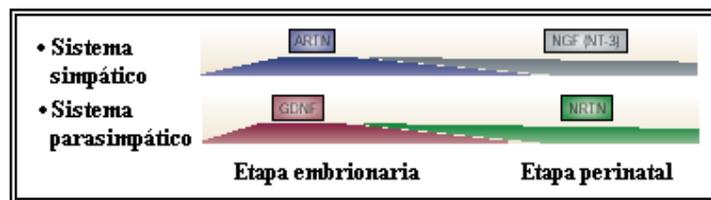


Figura 2.17.- Etapas de actuación de la familia de GDNF en el sistema simpático y parasimpático. En la etapa embrionaria ARTN es necesaria para el desarrollo del Sistema simpático siendo NGF y NT3 las responsables tras el nacimiento. En el caso del sistema parasimpático, GDNF es necesario en la etapa de desarrollo mientras NTRN lo es tras el nacimiento (Airaksinen y Saarma

Del mismo modo, en las neuronas de sistema parasimpático, se ha observado que es necesaria la acción de GDNF y GFR α 1 para su correcta migración durante el desarrollo. Sin embargo, en el animal adulto son NTRN y GFR α 2 los necesarios para la supervivencia y mantenimiento de esta población neuronal (Enomoto y cols. 2000). (**Figura 2.17**).

Ratones knock out para GDNF, GFR α -1 o RET han servido para tener más información sobre esta familia. Estos animales pierden las neuronas entéricas y las células gliales que se encuentran debajo del estómago, y que derivan de la cresta neural sacral. Esto demuestra que GDNF interviene en la formación y migración de estas neuronas en el desarrollo (Taraviras y cols. 1999). En el caso de los ratones knock out para NTRN y GFR α -2, existe únicamente una mínima pérdida de estas neuronas. Estos resultados indicarían que NTRN interviene en mantener la supervivencia y el correcto funcionamiento de este tipo neuronal en los ratones adultos.

Respecto a las neuronas sensoriales primarias, se ha observado *in vitro* que la familia de las GFLs es capaz de mantener su supervivencia, pero el papel fisiológico *in vivo* no está claro (Airaksinen y Saarma 2002). No obstante, GDNF al igual que BDNF, interviene en la señalización para la supervivencia de neuronas sensoriales primarias a lo largo del desarrollo (Erickson y cols. 2001). La mayoría de las neuronas sensoriales de la médula espinal necesitan NGF para su supervivencia durante el desarrollo, pero tras el nacimiento, deja de expresarse el receptor TrkA y comienza a hacerlo el receptor RET (Snider y McMahon 1998). GDNF se encuentra presente en las células de Schwann y en las capas superficiales de la médula espinal (Jongen y cols. 1999). GFR α -1 y RET son expresados en una subpoblación de grandes neuronas mielinizadas mecanosensoriales. Estos datos parecen implicar que GDNF mantienen la innervación sensorial cutánea (Fundin y cols. 1999). Por otra parte, se ha observado que las neuronas sensitivas del calor necesitan NTRN para su supervivencia a lo largo del desarrollo, y en la edad adulta. La ARTN es encontrada en bajos niveles en las raíces de los nervios periféricos.

En el caso de las neuronas dopaminérgicas, está demostrado que GDNF y NTRN son potentes factores en el mantenimiento de su supervivencia. Sin embargo, solo GDNF promueve el crecimiento y la hipertrofia axonal (Akerud y cols. 1999). Ambos factores parecen realizar su efecto a través del complejo GFR α -1-RET, el cual se encuentra presente en este tipo de neuronas, tanto en el desarrollo, como en las neuronas adultas. Sin embargo, parece que no es esencial su señalización a lo largo del desarrollo, como puede observarse en los ratones knock out para estos receptores (Airaksinen y cols. 1999).

Finalmente, y en las motoneuronas, población de interés en el presente trabajo, se ha observado que los factores neurotróficos son producidos por el músculo y las células gliales, actuando de forma sinérgica para mantener su supervivencia. Durante el desarrollo GDNF es producida por las células de Schwann (Arce y cols. 1998). En los ratones sin GDNF o GFR α -1 hay una pérdida importante de motoneuronas (del 20 al 40 % dependiendo la región). Ratones que sobreexpresan GDNF en el músculo presentan una mayor supervivencia de motoneuronas (Garces y cols. 2000; Oppenheim y cols. 2000). Incluso se conoce que la sobreexpresión, mediante transgénesis de GDNF tras comenzar un periodo de muerte celular programada, produce una hiperinnervación de las conexiones neuromusculares (Zwick y cols. 2001).

Sin embargo, NRTN *in vitro* mantiene la supervivencia de motoneuronas a través de GFR α -1, en ratones que carecen del gen, pero no existe una pérdida en el número de motoneuronas (Garces y cols. 2000).

Como en el caso anterior, debido a que en el presente trabajo hemos utilizado GDNF, pasaremos a describirlo con más detalle.

2.3.2.4. GLIAL CELL LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF).

Características generales.

El factor neurotrófico Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor, denominado GDNF, fue caracterizado por Lin y cols. en 1993 como una glicoproteína homodimérica capaz de mantener la supervivencia, e inducir la diferenciación morfológica de neuronas dopaminérgicas de rata (Lin y cols. 1993).

Schindelhauer y Bermingham mapearon el gen humano de GDNF (Schindelhauer y cols. 1995) (Bermingham y cols. 1995). Los códigos de acceso de la secuencia del gen y de su secuencia proteica en la base de datos son: [GI=306761](#); [AAA67910](#); [GI=6634484](#) y [NP_062012.1](#).

La estructura genética completa de GDNF no está muy clara según la bibliografía consultada. Existen diferencias entre el gen humano y el de roedores, observándose tres exones en el primero y cuatro en el segundo. Además, los promotores en las dos especies también parecen diferir (Grimm y cols. 1998; Woodbury y cols. 1998). No obstante, la secuencia y estructura proteica sí son comunes. El gen de este factor neurotrófico presenta dos splices de modo que forman preproteínas de 211 (representada en la **Figura 2.18.**) y 185 aa_x respectivamente (Cristina y cols. 1995; Springer y cols. 1995), aunque ambas finalmente producen la misma proteína madura. Un segmento de 20 aa_x es deleccionado de la zona precursora, generándose dos formas de la proteína precursora, denominadas alfa (forma larga) y beta (forma corta). Estas formas son proteolizadas para dar lugar a la proteína en forma madura que contiene 134 aa_x, correspondiente a un peso molecular de 20 kDa (15 kDa en el caso de la proteína recombinante debido a la falta de glicosilaciones)(Lin y cols. 1993; Schindelhauer y cols. 1995).

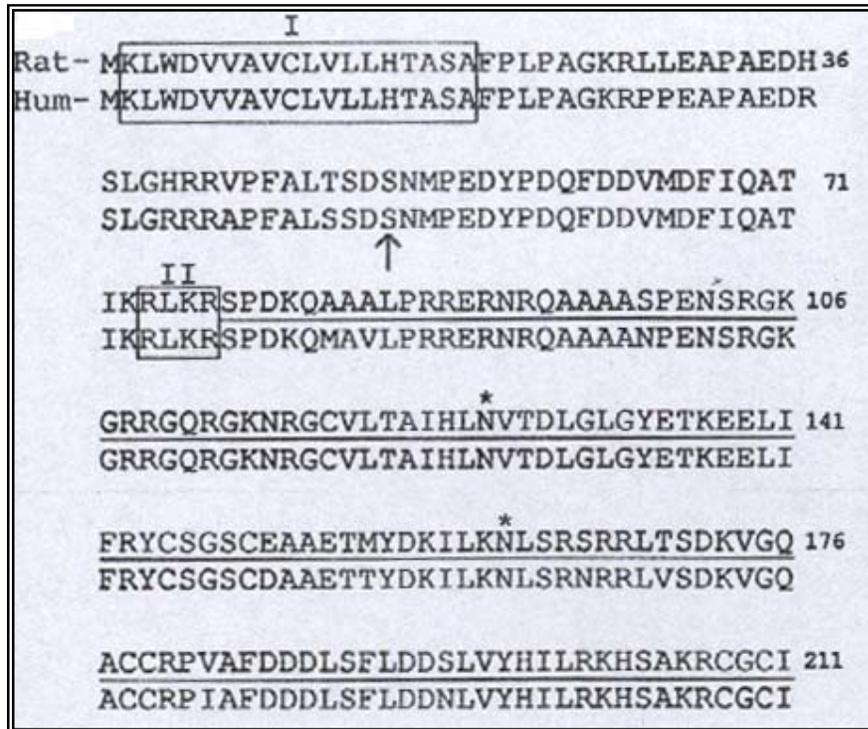


Figura 2.18.- Secuencias aminoacídicas de la forma preproteína de GDNF de rata y humano (Lin y cols. 1993) **I:** secuencia de 20 aax deleccionada para dar lugar a la forma preproteína; **II:** secuencia deleccionada para dar lugar a la forma madura.

El proceso de síntesis y secreción no se encuentra tan estudiado como en el caso de las neurotrofinas, pero a pesar de que no se han realizado estudios que lo demuestren, se supone similar. Como ya hemos descrito previamente, GDNF se une, una vez secretado al receptor RET, y de forma más específica, al receptor $GFR\alpha 1$. Una vez unido a estos receptores se desencadenan las señales intracelulares que inducen la supervivencia y diferenciación neuronal.

La expresión de GDNF se extiende a lo largo de todo el Sistema Nervioso Central (ver **Tabla 2.4.**) dando un inmunomarcaje en forma de puntos (como si estuviese contenido en vesículas), en los cuerpos y en los procesos neuronales. No obstante, la intensidad y la densidad de la señal varía en las distintas poblaciones neuronales (Kawamoto y cols. 2000). Del mismo modo que comentábamos para BDNF con sus receptores, en el caso de GDNF es interesante observar la expresión su receptor específico $GFR\alpha 1$, para poder determinar las poblaciones neuronales donde actúa.

Región del Sistema Nervioso Central	GDNF		GFR α 1	
	Proteína	mRNA	Proteína	mRNA
Neuronas piramidales del hipocampo	+	+	+	+
Stratium	+	+	?	?
Hipotálamo	+	?	+	?
Médula espinal	+	-	+	+

Tabla 2.4. Expresión proteica y de mRNA de GDNF y GFR α 1 en distintas regiones del S.N.C. humano.

Se ha observado una señal para GDNF muy intensa en las neuronas piramidales del hipocampo entre las regiones CA2-CA4, al igual que ocurría con BDNF (Murer y cols. 1999). De forma similar, se observa señalización, aunque débil, de GFR α 1, en este caso la expresión tiene lugar en las regiones CA1-CA3 (Matsuo y cols. 2000).

Respecto a la zona denominada stratium, se ha observado la expresión del mRNA de GDNF (Pochon y cols. 1997), viéndose posteriormente que es algo más específico de las interneuronas colinérgicas y GABAérgicas (Bizon y cols. 1999). Estas observaciones han sido confirmadas mediante estudios inmunohistoquímicos, observando la expresión de la proteína GDNF (Kawamoto y cols. 2000). En la bibliografía consultada, no se han encontrado datos sobre la expresión de GFR α -1 en esta región.

En la zona del hipotálamo, se ha observado señalización mediante inmunohistoquímica en el núcleo hipotalámico posterior, tanto en el caso de GDNF como de su receptor GFR α -1, correspondiendo a neuronas histaminérgicas (Golden y cols. 1998).

En el sistema motor espinal, el mRNA de GDNF es expresado con mucha intensidad en los músculos esqueléticos, y sin embargo, apenas es expresado en las neuronas del asta anterior de la médula espinal (Suzuki y cols. 1998) donde sí son expresados el mRNA de Ret y GFR α 1 (Mitsuma y cols. 1999). Esto sugiere

que GDNF es expresado en el músculo esquelético, y posteriormente transportado retrógradamente a las neuronas del asta anterior de la médula espinal, donde ejerce su función sobre los receptores. Estudios inmunohistoquímicos de GDNF en este sistema, refuerzan la hipótesis, observando una baja expresión de la proteína GDNF en la médula espinal del mismo modo que en las neuronas motoras craneales (Kawamoto y cols. 2000).

GDNF en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Desde su descubrimiento, GDNF ha recibido mucha atención como agente terapéutico para el tratamiento de ciertas enfermedades neurológicas. A pesar de que ha mostrado efectos secundarios, inducción a la formación de ciertos tumores y pérdida de peso, se ha propuesto que una administración más local evitaría estos problemas (Meng y cols. 2000).

Ha sido demostrado que los cambios anormales de las neuronas sensoriales inducidos por axotomía pueden prevenirse por la aplicación de GDNF regenerando los nervios periféricos. Dicha regeneración llega a producirse incluso en la médula espinal, restableciendo conexiones funcionales en ésta y rescatando la función sensorial (Ramer y cols. 2000).

Por otra parte, en modelos experimentales de isquemia local, administraciones locales antes y justo después de la anoxia, pueden reducir los daños (Wang y cols. 1997) (Kitagawa y cols. 1998). Se ha propuesto que el efecto de GDNF sería la reducción de la exotoxicidad, más que el rescate de la muerte celular (Nicole y cols. 2001).

Finalmente, relacionado con las enfermedades de la motoneurona, se ha observado como tras la axotomía del nervio ciático, aumenta la expresión de GDNF en el músculo denervado, de GDNF y GFR α 1 en las células de Schwann y de RET y GRF α 1 en las motoneuronas. Además, esta axotomía también estimula la liberación de GFR α 1 en forma soluble desde las células de Schwann (Paratcha y cols. 2001). También ha sido descrito como GDNF administrado exógenamente,

tras realizar un daño en el nervio periférico, tanto en animales recién nacidos y adultos, puede mantener la supervivencia de las motoneuronas a largo tiempo (Hottinger y cols. 2000).

GDNF puede ejercer su función de mantenimiento de la supervivencia en las motoneuronas gracias a su efecto sobre la regulación de dos proteínas denominadas IAPs, la proteína NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) y XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). Se ha demostrado, que tras eliminar su expresión, los efectos de GDNF desaparecen, mientras que los de BDNF se mantienen. Estos datos parecen indicar que ambos neurotróficos utilizarían distintas vías en la señalización de la supervivencia (Perrelet y cols. 2002).

Los efectos de GDNF han sido estudiados experimentalmente en nervios axotomizados. Se observó que tras provocar daños en los nervios motores de ratas adultas, el tratamiento con GDNF mostró mejorar significativamente la velocidad de conducción en el nervio motor de manera dependiente a la dosis, mientras la conducción nerviosa de los nervios sensoriales apenas se vio afectada (Munson y McMahon 1997). Del mismo modo, el estudio de aplicaciones por infusión intracortical durante largo tiempo (42 días) de GDNF en ratas adultas con motoneuronas corticoespinales axotomizadas, mostraron una prevención de la muerte neuronal (Giehl y cols. 1997; Giehl y cols. 1998).

Los resultados obtenidos en modelos animales de las enfermedades de la motoneurona no son muy homogéneos. Estudios preliminares con GDNF en ratones transgénicos con la SOD1 humana mutada, no mostraron efectos beneficiosos (Mitsumoto y Tsuzaka 1999). Del mismo modo, en ratones con neuropatía motora primaria (pnm), el tratamiento con GDNF, administrado en cápsulas de polímeros conteniendo células de riñón transfectadas con el gen GDNF humano, no previno la degeneración de los axones motores, ni prolongó la supervivencia de los animales, pero sí disminuyó la pérdida de las neuronas motoras (Sagot y cols. 1996). Sin embargo, en otros modelos animales se ha observado como inyecciones subcutáneas de GDNF reducen significativamente la disfunción motora, particularmente en estadios tempranos de la enfermedad. Incrementan el número de motoneuronas inmunoreactivas a acetilcolintransferasa

en más del 100% de los animales tratados. El número de axones motores en la raíz ventral fue también un 20% mayor en los animales tratados (Mitsumoto y Tsuzaka 1999).

Finalmente, respecto a los enfermos de E.L.A., se ha observado que el mRNA de GDNF se incrementa en la médula espinal mientras es reducido en el músculo esquelético (Yamamoto y cols. 1996).

Se comenzaron ensayos clínicos con GDNF en el tratamiento del Parkinson y la E.L.A. Se realizaron ensayos con inyecciones intraventriculares e intratecales de la molécula recombinante, pero lamentablemente no se observó ningún beneficio sobre los pacientes. En abril de 1.999, la empresa Regeneron informó de la paralización de los ensayos clínicos con GDNF, debido a la falta de eficacia observada en los estudios realizados en fase I. Uno de los problemas era la existencia de muchos efectos secundarios que podrían evitarse con un adecuado sistema de distribución. Un cambio en la vía de administración podría suponer una estrategia a probar.

En el caso del Parkinson, muchos estudios han sido realizados con GDNF debido al resultado obtenido en modelos animales, donde previno la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Grondin y Gash 1998). Sin embargo, estos resultados no son iguales a los obtenidos en la especie humana, donde la aplicación de GDNF no fue efectiva, además de presentar efectos secundarios (pérdida de peso) (Kordower y cols. 1999).

2.3.3. FAMILIA DE LAS NEUROQUINAS.

A pesar de que ningún miembro de esta familia ha sido utilizado en el presente trabajo, se ha creído conveniente realizar una pequeña exposición de la misma.

2.3.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA FAMILIA.

Denominamos neuroquinas a una subfamilia de proteínas dentro de la familia de las citoquinas. Estructuralmente son muy similares, se diferencian de las citoquinas por su efecto específico a nivel del Sistema Nervioso Central (Murphy y cols. 1997). A pesar de presentar similitudes en su estructura (Bazan 1991) no ocurre lo mismo con su secuencia aminoacídica o nucleotídica. Esta subfamilia se encuentra integrada por las proteínas CNTF, Ciliary Neurotrophic Factor (Barbin y cols. 1984), LIF, Leukaemia Inhibitory Factor (Gough y cols. 1988), OsM, Oncostatin M (Zarling y cols. 1986), GPA, Growth-promoting Activity (Eckenstein y cols. 1990) y CT-1, Cardiotrophin 1 (Pennica y cols. 1995).

2.3.3.2. MODO DE ACTUACIÓN.

Los ligandos, LIF, CT-1 y OsM, tienen como receptores a gp130 y LIFR β , presentando distintos grados de afinidad. La proteína LIF muestra baja afinidad por el receptor LIFR β , que incrementa cuando LIFR β forma un complejo con gp130, lo que provoca una señal de traducción. El receptor gp130 es el responsable de la transducción (Gearing y cols. 1992). CT-1 muestra el mismo tipo de receptores e interacciones que LIF (Pennica y cols. 1996), mientras OsM se une con baja afinidad primero a gp130, y posteriormente se acompleja con LIFR β , formando un complejo de mayor afinidad (Gearing y Bruce 1992).

Para CNTF existe un receptor específico, CNTRF α , relacionado estructuralmente con gp130 (Davis y cols. 1991). Es un receptor con un dominio extracelular unido a la membrana celular mediante un puente GPI (glcosyl-phosphoinositol) que se expresa únicamente en el Sistema Nervioso Central y en el músculo esquelético. CNTF se une a CNTR α y posteriormente, este complejo se une al complejo formado por gp130 y LIFR β desencadenando la señal intracitoplasmática a través de gp130 (Stahl y Yancopoulos 1994). GPA realiza su señalización del mismo modo que CNTF, aunque su receptor específico es el

denominado GPAR α (Heller y cols. 1995). Estas interacciones con los distintos receptores quedan reflejados en la **Figura 2.19**. (Heinrich y cols. 2003).

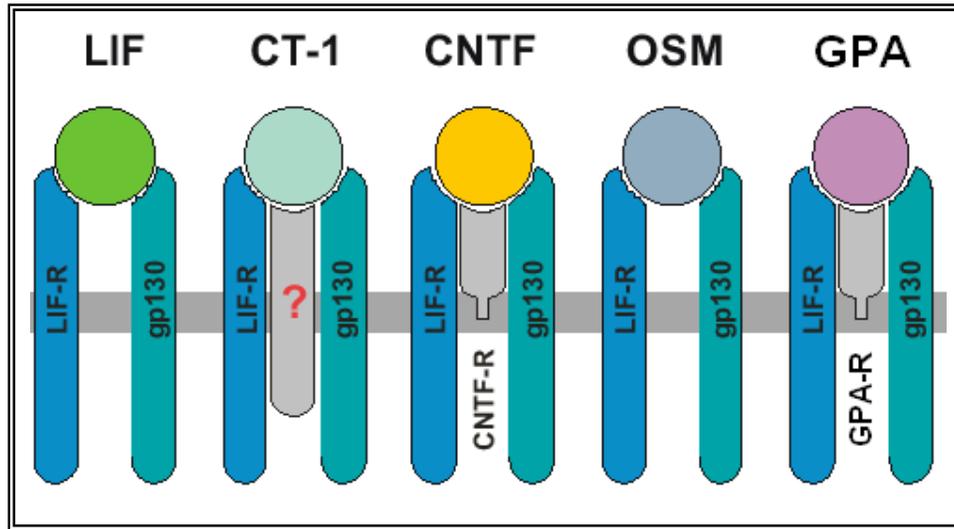


Figura 2.19.- Interacción entre los distintos ligandos y receptores de la familia de las neuroquinas.

La cascada de señales, que se genera a partir de la unión receptores-ligando, es la vía de la activación de las tirosinas quinasas citoplasmáticas, conocidas como Jak/Tyk quinasas (ver **Figura 2.20**). Estas quinasas están asociadas a gp130 en un estado inactivo, siendo activadas tras la heterodimerización de gp130 con LIFR mediante fosforilación (Stahl y Yancopoulos 1994). Jak/Tyk activan diferentes moléculas responsables de la señalización intracelular, siendo muy características las proteínas de la familia STAT, activadores transcripcionales en el DNA tras su fosforilación, dimerización y posterior translocación al núcleo (Stahl y Yancopoulos 1994; Segal y Greenberg 1996). Otra proteína que es activada tras la unión ligando-receptor, es la proteína denominada SHP2, la cual tras su fosforilación activa a su vez la cascada de señales de MAPK, descrita anteriormente en el apartado de la familia de las neurotrofinas (Heinrich y cols. 2003).

Estos procesos se encuentran muy regulados, las proteínas STAT tras ser activadas y translocadas al núcleo, inducen la expresión de SOCS (suppressor of cytokine signalling proteins). Esta familia de proteínas acaba inhibiendo a las proteínas STAT, como un proceso de autoinhibición de las mismas. Otro proceso

de autorregulación es la endocitosis del complejo ligando-receptor (Heinrich y cols. 2003).

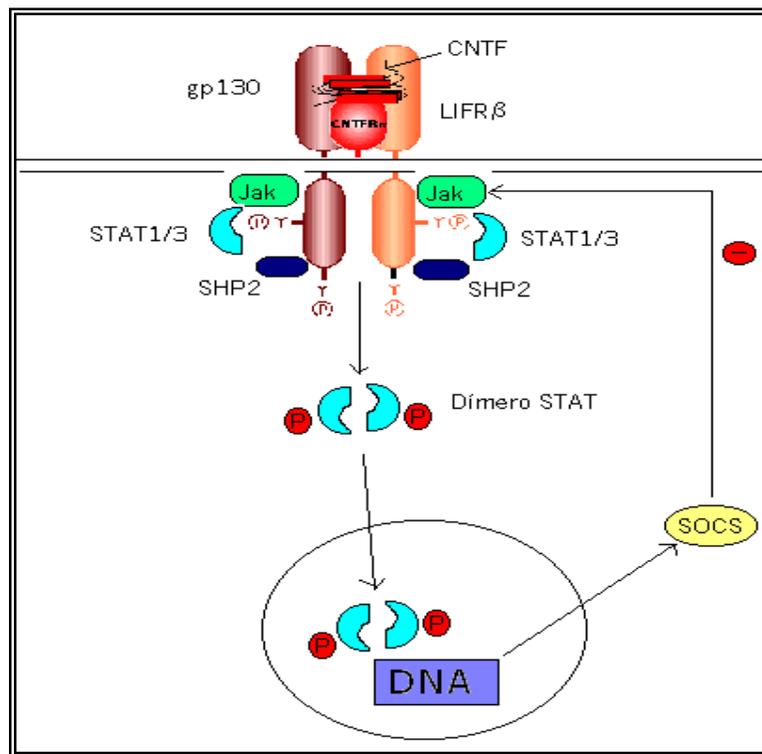


Figura 2.20.- Cascada de señales inducida tras la formación del complejo de CNTF con sus receptores. La heterodimerización de los receptores al unirse a CNTF induce a la activación de STAT que se fosforila y dimeriza para ejercer su función. Existe una autorregulación negativa realizada por la activación de SOCS.

2.3.3.3. ESTUDIOS FUNCIONALES.

CNTF fue purificado y caracterizado (Barbin y cols. 1984) tras observar que un extracto de embrión de pollo era capaz de promover la supervivencia de neuronas del sistema parasimpático (Adler y cols. 1979). Se ha demostrado posteriormente que GPA muestra las mismas características con la misma eficacia (Eckenstein y cols. 1990). Con CT-1 se ha visto las mismas propiedades aunque con una eficacia 1000 veces menor (Pennica y cols. 1995).

Respecto al sistema simpático, se conoce poco la influencia de las neuroquinas en este tipo neuronal, aunque se ha descrito que CNTF a través del

receptor LIF induce la muerte programada de estas neuronas inhibiendo la expresión del receptor para NGF (Kessler y cols. 1993). Sin embargo, en presencia de células de Schwann, actúa como un factor de supervivencia (Burnham y cols. 1994).

En otro tipo de poblaciones neuronales, se ha observado que a lo largo del desarrollo, LIF parece ser necesario antes de que las neuronas sensoriales primarias comiencen a depender de NGF (Ernsberger y Rohrer 1988). No obstante, una vez están diferenciadas, LIF sigue actuando en una subpoblación, manteniendo la supervivencia y la diferenciación (Murphy y cols. 1993).

Finalmente, en la población de neuronas de la médula espinal, se ha descrito que a lo largo del desarrollo, las neuronas que formarán la medula espinal necesitan los ligandos del receptor LIF para su diferenciación, aunque no para la supervivencia (Richards y cols. 1996). *In vitro* se ha observado que CNTF y CT-1 mantienen la supervivencia de las neuronas de la medula espinal incluyendo las motoneuronas (Arakawa y cols. 1990; Pennica y cols. 1996). *In vivo* también se ha observado el efecto de rescate de motoneuronas por parte de CNTF y CT-1 (Sendtner y cols. 1990; Pennica y cols. 1996).

A nivel del cerebro, CNTF consigue rescatar motoneuronas *in vitro* (Magal y cols. 1993) e *in vivo* (Dale y cols. 1995). También es capaz de rescatar neuronas de la sustancia negra (Hagg y Varon 1993).

Respecto a sus posibles aplicaciones terapéuticas, CNTF es el miembro de la familia más estudiado. Diferentes estudios han demostrado su acción trófica sobre las motoneuronas, bien sea previniendo la degeneración neuronal tras la lesión axónica, o enlenteciendo la progresión de la enfermedad en modelos animales (Arakawa y cols. 1990; Davis y cols. 1991; Mitsumoto y cols. 1994; Sendtner y cols. 1994). En el año 1996, se publicaron dos ensayos clínicos con un total de 1300 enfermos diagnosticados de E.L.A. tratados con dosis variables de CNTF en administración subcutánea ("A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group" 1996; Miller y

cols. 1996). Los resultados de ambos estudios fueron muy desfavorables, con aparición de efectos secundarios intolerables en las dosis más altas, presencia de anticuerpos circulantes y una aceleración de la progresión de la enfermedad con incremento en el número de fallecimientos. Finalmente, se ha utilizado la vía de administración intratecal apareciendo sólo efectos a nivel local con cefalea o dolor radicular con desaparición de los efectos secundarios (Penn y cols. 1997).



3.-MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

La infraestructura utilizada en el presente trabajo está disponible actualmente en el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y la Unité d'Embryologie Moleculaire del Instituto Pasteur de París.

3.1. CONSTRUCCIONES GENETICAS

3.1.1. PLASMIDOS UTILIZADOS PARA LAS DISTINTAS ESTRATEGIAS DE CLONAJE.

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado construcciones cedidas por grupos de investigación y algunos plásmidos comerciales. Como vectores cedidos por grupos de investigación fueron tres los utilizados:

1. El vector pcDNA3.1.-GDNF cedido por el Dr. Carlos Ibáñez del Instituto Karolinska (Suecia). Dicho vector contiene el cDNA del factor GDNF de rata en forma de proproteína bajo el control del promotor citomegalovirus.
2. El vector pcDNA3.1.-BDNF cedido por el Dr. Alberto Pérez Mediavilla de la Universidad de Navarra. Dicho vector contiene el cDNA del factor BDNF de humano en forma de proproteína bajo el control del promotor citomegalovirus (**Figura 3.1.**).
3. El vector pGex-TTC presente en el laboratorio de Genética bioquímica y Grupos Sanguíneos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Dicho vector contiene el cDNA del fragmento C de la toxina tetánica (TTC) fusionado al cDNA de la enzima GST (Glutation-S-Transferasa) bajo el promotor Ptac (**Figura 3.2.**).

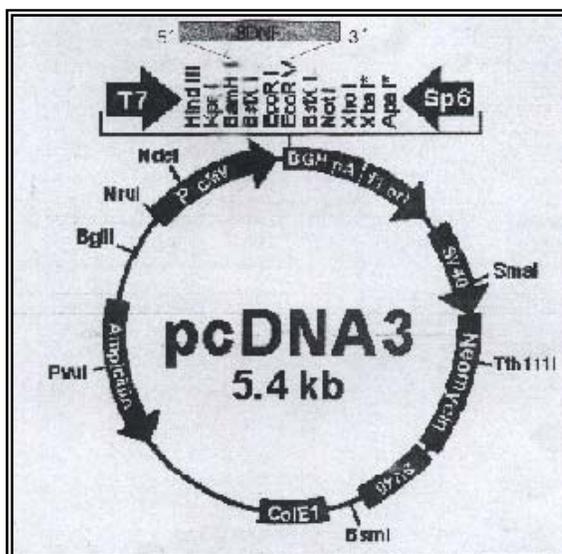


Figura 3.1.- Carta genética de pcDNA 3.1.- BDNF

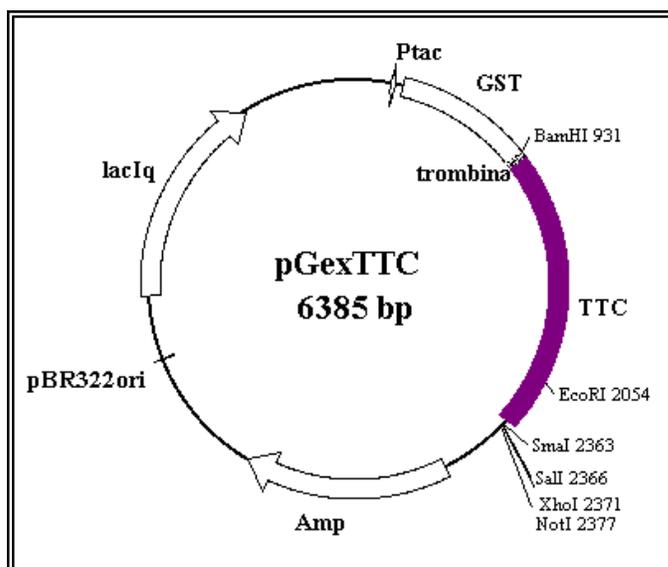


Figura 3.2.- Carta genética de pGex-TTC

Han sido utilizados plásmidos comerciales, dos de ellos suministrados por la casa comercial Amersham-Pharmacia (pGex 4T-2 y pMosBlue) y un tercero suministrado por la casa comercial Promega (pGem-T-Easy):

1. pGem-T-Easy: vector específico para el clonaje de productos PCR. Contiene un sitio de inserción para productos PCR (cola de poliT capaz de complementarse con la cola de poliA adicionada normalmente por la Taq polimerasa en la amplificación de fragmentos PCR). Dicho sitio se encuentra,

dentro de la secuencia del cDNA de la β -galactosidasa de modo que si el producto PCR es insertado, el gen queda inactivo. Esto permite la posterior identificación de los clones, si han insertado el producto PCR producirán colonias de color blanco y si no, serán de color azul. (**Figura 3.3.**).

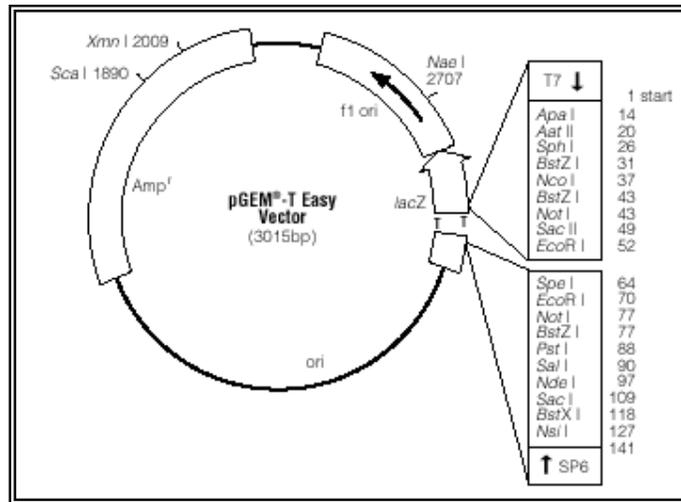


Figura 3.3.- Carta genética de pGem-T-Easy

2. *pMosBlue*: estructura similar al anterior pero es necesario realizar un tratamiento previo al producto PCR extraído (**figura 3.4.**).
3. *pGex 4T-2*: vector de expresión procariota. Presenta un polilinker para clonar cDNAs que quedarán fusionados al cDNA de Glutation-S-Transferasa. Esto permite la posterior producción de proteínas de fusión recombinantes, facilitando su purificación mediante cromatografía de afinidad con una matriz conteniendo glutation. Entre los cDNA clonados y de Glutation-S-Transferasa existe un sitio de reconocimiento para la proteasa trombina. Utiliza el promotor *Ptac*, inducible con IPTG (**Figura 3.5.**).

Para poder llegar a obtener los vectores de expresión fue necesario la realización de mutagénesis dirigida que pasamos a describir en el siguiente apartado.

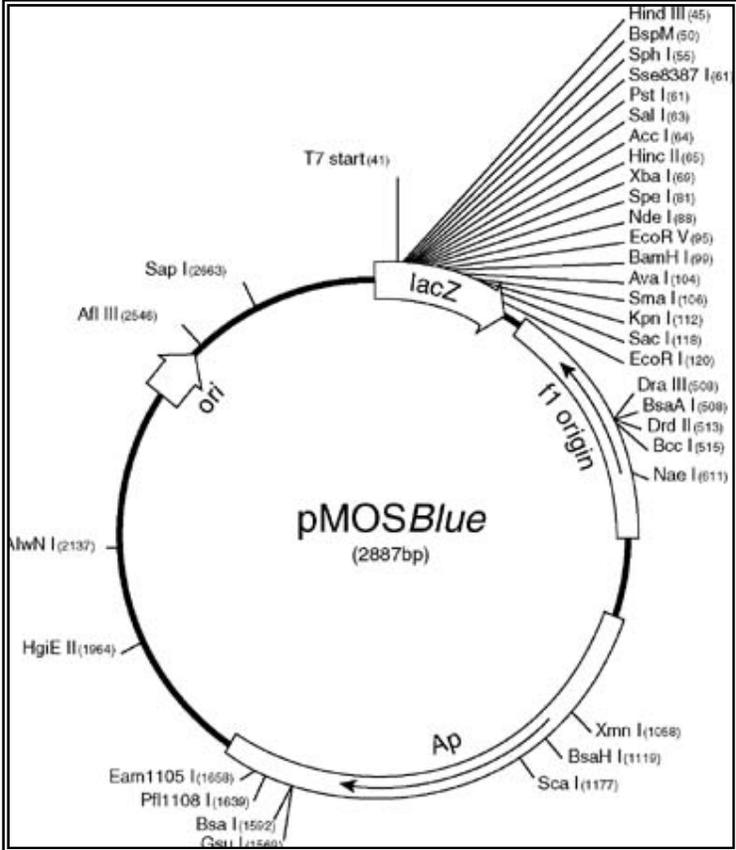


Figura 3.4.- Carta genética de pMosBlue

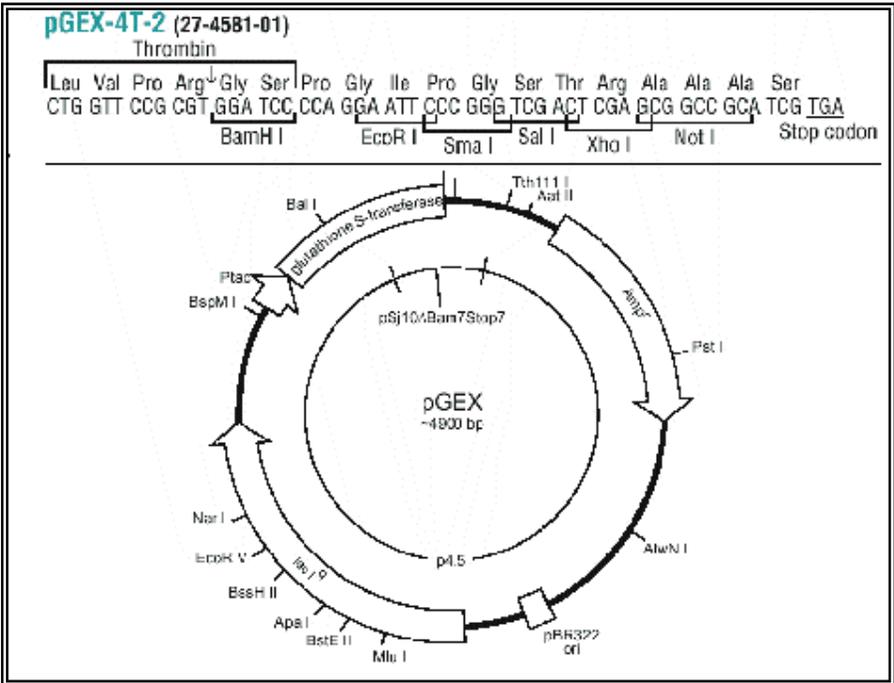


Figura 3.5.- Carta genética de pGex4T-2

3.1.2. MUTAGENESIS DIRIGIDA.

Se comenzó con una amplificación mediante PCR a partir de los cDNA de pro-GDNF y pro-BDNF descritos en el apartado anterior. Los oligonucleótidos fueron diseñados para introducir las modificaciones necesarias. Dichas modificaciones consistieron en la introducción de sitios de restricción adecuados para el posterior clonaje, la eliminación del péptido señal y el codon de parada de lectura.

Los oligonucleotidos diseñados fueron los siguientes:

GDNF 3:	5´ CCGCGTGGATCCTCACCAGATAAAACA	3´
GDNF R2:	5´ GAATTCGGATCCAAGCCATGGTCCGATACATCC	3´
GDNF 4:	5´ TCCTGGGGATCCTCAGATACATCCAC	3´
GDNF 5:	5´ CCGCGTGGATCCATGAAGTTATGGGAT	3´
GDNF pas2:	5´ TCCTGGGGCGCCGCTCAGATACATCCAC	3´
BDNF 1:	5´ CCGCGTGGATCCCCTCTGACCCTGCC	3´
BDNF 2:	5´ CCCGGGGAATCATCTTCCCCTTTTAAT	3´
BDNF 3:	5´ CTGGGGATCCTCTTCCCCTTTTAAT	3´
BDNF 4:	5´ CCGCGTGGATCCATGACCATCCTTTTC	3´

Las parejas de oligonucleotidos utilizados en el clonaje de cada molécula quedan representadas en la **Tabla 3.1**.

El DNA de partida para la realización de la mutagénesis dirigida fue el pcDna 3.1 proGDNF o el pcDna 3.1 proBDNF, dependiendo del factor neurotrófico a clonar. Las concentraciones de los distintos componentes utilizados en la reacción de amplificación fueron de 100 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleótido, 0,4 pmol/ µl de cada oligonucleótido y 0,05 unidades/µl de Taq polimerasa (Gibco) en un volumen final de 50 µl.

Molécula	primer 5'→ 3'	primer 3'→ 5'
pro-GDNF	GDNF 5	GDNF pas2 y GDNF4
proGDNF-TTC	GDNF 5	GDNF R2
GDNF _m	GDNF 3	GDNF pas2 y GDNF4
GDNF _m TTC	GDNF 3	GDNF R2
proBDNF	BDNF 4	BDNF 2
proBDNF-TTC	BDNF 4	BDNF 3
BDNF _m	BDNF 1	BDNF 2
BDNF _m TTC	BDNF 1	BDNF 3

Tabla 3.1.- Oligonucleótidos utilizados para la realización de mutagénesis dirigida mediante PCR de cada molécula.

Al volumen final de la reacción se le añadió una o dos gotas de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra en el termociclador. Las condiciones utilizadas en la amplificación fueron de 5 minutos a 94 °C, y 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C, para terminar con una elongación de 10 minutos a 72 °C. La cantidad de producto amplificado fue medida por espectrofotometría.

Una vez realizada la PCR, se le añadieron 25 µl. de buffer de carga (1% sacarosa, 0.05% bromofenol) al volumen total de la reacción, y se depositaron sobre un gel de agarosa al 1% (0.5 gramos de agarosa en 50 ml de TBE 1x) con 2 µl. de bromuro de etidio, a una concentración de 5 mg./ml. Se sometió a electroforesis a 100V durante 15 minutos. Una vez realizado el corrido electroforético, se procedió a la visualización del inserto amplificado en un transiluminador con luz U.V.

El inserto observado en el gel de agarosa al 1% se recortó con una cuchilla, y se depositó en un *ependorf* para proceder a su obtención mediante el

kit de la casa GIBCO (“Rapid Gel Extraction”). Este protocolo también fue utilizado para la obtención de insertos extraídos a partir de plásmidos.

3.1.3. CLONAJE DE LOS FRAGMENTOS PCR

Tras la extracción del producto PCR se procedió a la ligación del mismo en los vectores descritos en el apartado 3.1.1. El protocolo seguido fue diferente en función del vector utilizado.

- Vector pGem-T-Easy.

Se realizaron distintas pruebas, variando la proporción de inserto para una misma cantidad de vector. Las concentraciones utilizadas fueron de 1 ng/ μ l, 2 ng/ μ l o 3 ng/ μ l de inserto frente a una concentración constante de 5 ng/ μ l de vector. Respecto al resto de componentes de la reacción de ligación, su concentración fue de 30 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 5 % polietilenglicol y 0,3 unidades de T4 DNA ligasa, todo ello en un volumen final de 10 μ l.

La incubación tuvo lugar a 4 °C durante toda la noche. Como control siempre se utilizó el vector sin inserto.

- Vector pMosBlue.

Para el clonaje en este vector fue necesario el tratamiento previo del producto PCR extraído. La reacción para el tratamiento consistió en las siguientes concentraciones de reactivos: 1 ng/ μ l, 2 ng/ μ l y 3 ng/ μ l de producto PCR extraído (se realizaron pruebas con distintas concentraciones), 5 mM DTT, pk buffer 1x, y 1 μ l de mezcla de enzima pk, tal y como describe la casa comercial, en un volumen final de 10 μ l.

Se incubó la reacción a 22 °C durante 40 minutos. Posteriormente se centrifugó, para recoger todo el contenido de la reacción en la base del tubo y se

calentó a 75 °C durante 10 minutos para inactivarla. Tras la inactivación, se enfrió en hielo durante dos minutos y se centrifugó de nuevo para recoger el contenido en la base del tubo.

Tras este tratamiento previo se realizó la ligación. Así sobre 10 µl del producto PCR tratado, se adicionó una concentración de 4,16 ng/ µl del vector pMosBlue y 0,33 unidades/µl de T4 DNA ligasa en un volumen final de 12 µl.

Las condiciones de la reacción fueron 22 °C durante 2 horas. Como en el caso anterior, el vector sin inserto fue utilizado como control de la reacción.

Una vez realizados las distintas ligaciones se procedió a la obtención de los distintos clones para su posterior estudio.

3.1.4. TRANSFORMACION EN BACTERIAS COMPETENTES

3.1.4.1. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

Para la transformación de los plásmidos fueron utilizadas las cepas de *Escherichia coli* que a continuación se detallan:

- ✓ DH5α (F⁻, φ80*dlacZ*ΔM15, Δ*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).
- ✓ TOP10F'(F'⁺{*lacI^qTn10*(Tet^R)}*mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), φ80*lacZ*, ΔM15 Δ*lacX74*, *recA1*,*deoR*, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, (Str^R) *endA1 nupG*).
- ✓ JM109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rk⁻, mk⁺), *relA1*, *supE44*, Δ(*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *laqI^qZ* ΔM15]).

3.1.4.2. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO.

Los medios utilizados fueron LB y TB. El medio LB consistió en 10gr. de bacto-trytone (Gibco), 5 gr bacto-yeast extract (Gibco) y 10 gr de NaCl disueltos en 1 litro de agua destilada tras ajustarlo a pH 7.0. Previamente a su utilización se adiciona ampicilina a una concentración de 50 ng/ml. Para prepararlo en medio sólido, se añadieron 15 gr de agar (Gibco) por cada litro de medio.

Cuando las placas de medio sólido utilizadas se utilizan para vectores que poseen el gen de β -galactosidasa se añaden 0.5 ml de IPTG a una concentración 1M y 1 ml de X-Gal a una concentración de 40 mg/ml por cada litro de medio

El medio TB fue utilizado para las bacterias transformadas con plásmidos que resultaron difíciles de crecer, ya que resulta un medio más rico en nutrientes que el LB. Para su realización, se disolvieron 12 gr de bacto-trytone (Gibco), 24 gr de bacto-yeast extract (Gibco) y 4 ml de glicerol, en 900 ml de agua destilada. De forma paralela se prepararon 100 ml de una disolución 0,17 M KH_2PO_4 y 0,72 M K_2HPO_4 . Se autoclavaron ambas disoluciones y posteriormente se mezclaron. Se dispensaron en tubos de 2 ml que posteriormente se autoclavaron para su posterior uso. Finalmente, se añadió el antibiótico en la concentración anteriormente mencionada.

3.1.4.3. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.

Para transformar las bacterias se utilizaron dos tipos de metodología: el choque térmico y la electroporación. Para ambas estrategias fue necesaria la creación de bacterias competentes.

Transformación mediante choque térmico

Las bacterias competentes se obtuvieron mediante tratamiento con CaCl_2 . Tras dejar crecer las bacterias en placas de LB sin antibiótico, se inocularon 5 ml

de LB también sin antibiótico y se dejaron crecer en un orbital toda la noche a 37°C. Una vez crecidas las bacterias, se inocularon 3 ml de las mismas en 200 ml de LB y se dejaron crecer a 37 °C durante tres horas, para posteriormente incubar en hielo durante 10 minutos. Tras centrifugar a 1600xg durante 7 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió cada sedimento en 10 ml de disolución fría de CaCl₂ (CaCl₂, 60 mM, glicerol 15% (v/v), PIPES 10 mM, pH 7, autoclavado y conservado a 4 °C). De nuevo, y tras otra centrifugación a 1100xg durante 5 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 20 ml de disolución fría de CaCl₂. Finalmente, se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó a 1100xg durante 5 minutos a 4 °C donde se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 2,5 ml de disolución fría de CaCl₂ y por último se alicuotó la solución en 50 µl., almacenándose a -80 °C. Para comprobar que no habían adquirido resistencias, se sembró una alícuota en una placa con antibiótico y como control de la competencia se realizó una transformación con un plásmido control.

Para la transformación mediante choque térmico, se dispensaron entre 1 y 3 µl. de reacción de ligación en una alícuota de 50 µl. de bacterias competentes. Como control de la transformación se dispuso también un vector en el mismo volumen con otra alícuota de bacterias competentes (p. e. Puc 19). Tras una incubación en hielo de 30 minutos se realizó un choque térmico de 37 °C durante 20 segundos e inmediatamente, se incubó en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se añadió 450 µl. de medio LB y se dejó en un orbital a 37 °C, durante una hora. Por último, se sembró 100 µl. en placas de agar de LB con el antibiótico (en el caso de la β-galactosidasa, se añaden IPTG y X- Gal) y se incuban toda la noche a 37 °C.

Transformación mediante electroporación.

Para la transformación de bacterias mediante electroporación se obtuvieron bacterias electrocompetentes mediante lavados con glicerol. Tras dejar crecer las bacterias en placas de LB sin antibiótico, se inocularon colonias en 5 ml de LB de nuevo sin antibiótico, y se dejaron crecer en un orbital toda la noche. Una vez

crecidas, se inocularon 1 ml de estas bacterias en 200 ml de medio LB sin antibiótico y se dejaron crecer a 37 °C con una agitación de 225 r.p.m. hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,4 a 0,5. Una vez alcanzada dicha OD₆₀₀, se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C a 4.000xg y se resuspendió el sedimento de bacterias en el mismo volumen inicial de una solución fría de glicerol 10% (v/v). Se centrifugó de nuevo, en las mismas condiciones, y se lavó el precipitado con la disolución de glicerol. Finalmente, se centrifugó otra vez en las condiciones establecidas, y se retiró el sobrenadante, dejando una pequeña cantidad para resuspender el sedimento. Por último, se alicuotó en volúmenes de 80 µl. y se almacenó a -80°C. Como control de que no han adquirido resistencias se sembró una alícuota en una placa con antibiótico y como control de la competencia se realizó una transformación con un plásmido control.

Para la transformación mediante electroporación, se inocularon 5 µl. de la reacción de ligación (unos 80 ng. de plásmido) en 80 µl. de bacterias electrocompetentes previamente descongeladas, removiendo suavemente con la pipeta. Como control de la transformación, se dispuso también un vector en el mismo volumen con otra alícuota (p. e. Puc 19). Se realizó la electroporación dispensando las bacterias con la reacción de ligación en cubetas estériles de 0,1 cm., y se le aplicó un impulso eléctrico con una capacitancia de 25 µF, un voltaje de 2,5 kV y una resistencia de 200 Ω. Tras el pulso eléctrico, se diluyeron las bacterias en 450 µl. de medio LB sin antibiótico y se dejaron crecer durante una hora a 37 °C. Finalmente se sembraron 100 µl. en placas de agar de LB con el antibiótico correspondiente al vector utilizado (en el caso de la β-galactosidasa, se añade IPTG y X- Gal) y se dejaron crecer a 37 °C durante una noche.

3.1.5. OBTENCION Y DIGESTION DE DNA PLASMIDICO

A partir de las colonias positivas se procedió al estudio del DNA plasmídico. La obtención de DNA se realizó mediante el kit de la casa comercial Amersham Pharmacia denominado “GFX™ Micro Plasmid Prep Kit” basado en una modificación del protocolo tradicional de extracción plasmídica mediante lisis

alcalina, usando columnas con matriz de fibra de vidrio. Mediante este método hemos obtenido concentraciones del orden de 2 µg por ml de cultivo.

Las digestiones fueron utilizadas para:

- a) Comprobación de las tallas adecuadas de los insertos de las colonias blancas obtenidas por el clonaje de productos PCR.
- b) Obtención de insertos a partir de plásmidos o plásmidos, para posterior clonaje.
- c) Comprobación de los clones positivos conteniendo los insertos esperados en las construcciones finales.

Las enzimas utilizadas en cada molécula se muestran en la **Tabla 3.2**. Todas las enzimas procedieron de la casa comercial Promega.

En los casos en los que únicamente se utilizó una enzima (*BamHI*), las digestiones se realizaron a 37°C entre 1 y 4 horas. Las concentraciones de los reactivos fueron de 4,5 µg de DNA plasmídico, 6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml de BSA y 0,75 unidades/ µl de *BamHI* en un volumen final de 20 µl.

Si se utilizó más de una enzima, las digestiones se realizaron a 37°C entre 1 y 4 horas con las siguientes concentraciones de reactivos: 4,5 µg de DNA plasmídico, 25 mM Tris acetato (pH 7,8), 100 mM de acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM de DTT, 0,1 mg/ml de BSA y 0,75 unidades/ µl de cada enzima de restricción (*BamHI*, *EcoRI* ó *NotI*) en un volumen final de 20 µl.

Las digestiones se comprobaron en geles de agarosa al 1% mediante tinción con bromuro de etidio.

Para la obtención de insertos o de vectores digeridos para su posterior clonaje, previamente a la digestión se realizó una concentración del DNA

plasmídico por precipitación con etanol, y posterior resuspensión en 10 µl. de agua milli Q.

Molécula	Enzimas utilizadas
proGDNF	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>
proGDNF-TTC	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>
GDNFm	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>
GDNFmTTC	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>
proBDNF	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>Not I</i>
proBDNF-TTC	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>
BDNFm	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>Not I</i>
BDNFmTTC	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>

Tabla 3.2.- Enzimas de digestión utilizadas en el estudio de cada molécula

En los casos en los que el vector de expresión fue digerido únicamente por *BamHI*, fue necesaria su defosforilación para evitar su posible recircularización. Sobre la digestión obtenida, se adicionaron las siguientes concentraciones de reactivos: 50 mM Tris-HCl, pH 9, 1 mM de MgCl₂ 1,33 unidades/ µl de *CIAP* (“Alkaline Phosphatase Calf Intestine” de la casa comercial Amersham Pharmacia) en un volumen final de 30 µl.

La reacción de defosforilación se llevo a cabo entre 30 minutos y 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción mediante adición de fenol:cloroformo y posterior precipitación con etanol

Las concentraciones de los vectores digeridos y en su caso defosforilados fueron medidas en un espectrofotómetro (Amersham Pharmacia), a una longitud de onda de 260 nm. Las alícuotas se diluyeron con agua milli Q a una concentración de 50 ng./µl.

3.1.6. CONSTRUCCION DE LOS VECTORES DE EXPRESION PROCARIOTAS

Una vez obtenidos los insertos y los vectores de expresión, digeridos y en los casos necesarios defosforilados, se procedió a la ligación. Las combinaciones de vectores de expresión e insertos en las ligaciones pueden observarse en la **Tabla 3.3.**

Para la reacción de ligación se probaron distintas concentraciones de inserto, manteniendo constante la concentración del vector a 5 ng/μl. Las concentraciones de inserto utilizadas fueron desde 1 ng/μl hasta 6 ng/μl. Con las distintas proporciones vector:inserto, se adicionaron concentraciones de 66 mM Tris-HCl, pH 7,6, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 66 μM ATP y 1 unidad de T4 DNA ligasa en un volumen final de 50 μl. Las ligaciones se dejaron a 16 °C toda la noche. En todos los casos una ligación sin inserto se utilizó como control.

Posteriormente, se transformaron las ligaciones en bacterias *E. Coli* competentes, y se obtuvieron placas de agar con clones candidatos a contener la construcción de interés. Se testaron a las 24 horas en las siguientes etapas:

1. Detección de clones que han introducido el inserto mediante boiling-PCR.
2. Comprobación mediante digestión de la presencia del inserto y por PCR para determinar la correcta dirección.
3. Secuenciación de la construcción obtenida.

Molécula	Inserto	Primers utilizados	Enzimas utilizadas	Vector de expresión	¿Vector defosforilado?
proGDNF	proGDNF	GDNF 5 y GDNF pas2	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>	pGex 4T-2	No
proGDNF-TTC	proGDNF sin codon stop	GDNF 5 y GDNF R2	<i>Bam HI</i>	pGex 4T-2-TTC	Sí
GDNFm	GDNFm	GDNF 3 y GDNF pas2	<i>Bam HI</i> y <i>Not I</i>	pGex 4T-2	No
GDNFmTTC	GDNFm sin codon stop	GDNF 3 y GDNF R2	<i>Bam HI</i>	pGex 4T-2-TTC	Sí
proBDNF	proBDNF	BDNF 4 y BDNF 2	<i>Bam HI</i> y <i>Eco RI</i>	pGex 4T-2	No
proBDNF-TTC	proBDNF sin codon stop	BDNF 4 y BDNF 3	<i>Bam HI</i>	pGex 4T-2-TTC	Sí
BDNFm	BDNFm	BDNF 1 y BDNF 2	<i>Bam HI</i> y <i>Eco RI</i>	pGex 4T-2	No
BDNFmTTC	BDNFm sin codon stop	BDNF 1 y BDNF 3	<i>Bam HI</i>	pGex 4T-2-TTC	Sí

Tabla 3.3.- Esquema de las condiciones utilizadas en la obtención de cada molécula.

1. Detección de clones que han introducido el inserto mediante boiling-PCR.

La técnica consiste en realizar una PCR directamente sobre la colonia bacteriana. Con un palillo esterilizado se coge la colonia bacteriana, y se deposita en un tubo para PCR conteniendo 5 µl. de agua milli Q. A la vez, se deposita también sobre una placa de agar identificando el tubo PCR y la incisión en la placa de agar con el mismo número.

Sobre los 5 µl. conteniendo la colonia bacteriana, se adicionaron las siguientes concentraciones de reactivos: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleótido, 0,4 pmol/ µl de cada

oligonucleótido y 0,05 unidades/ μ l de Taq polimerasa (Gibco) en un volumen final de 20 μ l. Los oligonucleótidos utilizados para cada molécula se muestran en la **tabla 3.4.**

Molécula	Primers
proGDNF	GDNFR 2 y pGex 5
proGDNF.TTC	GDNFR 2 y pGex 5
GDNF _m	GDNFR 2 y pGex 5
GDNF _m TTC	GDNFR 2 y pGex 5
proBDNF	BDNF 2 y pGex 5
proBDNF-TTC	BDNF 2 y pGex 5
BDNF _m	BDNF 2 y pGex 5
BDNF _m TTC	BDNF 2 y pGex 5

Tabla 3.4.- Oligonucleótidos utilizados en boiling PCR para la detección de cada molécula.

Las secuencias de estos oligonucleótidos fueron:

GDNF R2: 5' GAATTCGGATCCAAGCCATGGTCCGATACATCC 3'

BDNF 2: 5' CCCGGGGAATTCTCTTCCCCTTTTAAT 3'

pGex5: 5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'

Las condiciones de la amplificación fueron de 5 minutos a 94 °C seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. El primer paso de 94 °C es suficiente para liberar el DNA de la bacteria, desnaturalizarlo y que la amplificación tenga lugar. La amplificación fue visualizada en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Para comprobar mediante digestión los clones considerados como positivos, las colonias obtenidas en las inserciones realizadas se crecieron en placa. Al día siguiente se extrajo el plásmido como ha sido descrito en el apartado 3.1.5. La concentración de los plásmidos extraídos se determinó en un espectrofotómetro.

2. Comprobación mediante digestión de la presencia del inserto y por PCR para la determinación de la correcta dirección.

La comprobación de la talla del inserto mediante digestión se realizó con las enzimas *BamHI* y *NotI*. Con estas enzimas, se comprobó la presencia o ausencia de los factores neurotróficos, así como la del fragmento C de la toxina tetánica. Las concentraciones utilizadas en la reacción de digestión fueron de 4,5 µg de DNA plasmídico, 25 mM Tris acetato (pH 7,8), 100 mM de acetato de potasio, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM de DTT, 0,1 mg/ml de BSA y 0,75 unidades/ µl de cada enzima de restricción (*BamHI* y *NotI*) en un volumen final de 20 µl.

Todas las digestiones se realizaron a 37°C entre 1 y 4 horas, fueron visualizadas en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio y luz ultravioleta.

Para observar la correcta dirección del inserto adoptada en cada molécula se realizó una PCR mediante un oligonucleótido externo y uno interno al mismo. Los oligonucleótidos utilizados en cada molécula fueron los mismos que los utilizados en la técnica boiling PCR. Las condiciones de la PCR fueron las mismas que en el caso de la mutagénesis por PCR.

Las amplificaciones obtenidas se observaron en geles de agarosa al 1 % (0.5 gr de agarosa en 50 ml de TBE 1x) con 2 µl. de bromuro de etidio 5 mg/ml tras una corriente de 100V durante 15 minutos.

3. Secuenciación de la construcción obtenida.

Las moléculas se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de DNA del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) donde fueron analizados con un Secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer). Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de cada molécula se señalan en la **Tabla 3.5.** siendo sus secuencias:

pGex 5: 5'GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3'

pGex 3: 5'CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG 3'

TTC 1: 5'GGTAACTCGTAGACCTATAC 3'

Molécula	Primers
proGDNF	pGex 5 y pGex 3
proGDNF-TTC	pGex 5 y TTC1
GDNF _m	pGex 5 y pGex 3
GDNF _m TTC	pGex 5 y TTC1
proBDNF	pGex 5 y pGex 3
proBDNF-TTC	pGex 5 y TTC1
BDNF _m	pGex 5 y pGex 3
BDNF _m TTC	pGex 5 y TTC1

Tabla 3.5.- Oligonucleótidos utilizados en la secuenciación de cada molécula.

Todos los oligonucleótidos fueron utilizados a una concentración de 5 pmol/μl. y los plásmidos a 100 ng./μl disueltos en agua milliQ.

3.2. PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES

3.2.1. EXTRACCION PROTEICA

Como puede observarse en el mapa genético del vector pGex4T-2, las distintas proteínas clonadas en este sistema quedan fusionadas a la proteína glutation-S-Transferasa. Esta proteína presenta una alta afinidad por el péptido glutation, lo que permite la purificación de la proteína recombinante fusionada mediante cromatografía de afinidad. De este modo, se puede aislar la proteína recombinante del resto de proteínas bacterianas presentes en el medio de extracción tras la ruptura de las bacterias. Una vez aisladas las proteínas recombinantes, y tras lavar la matriz de impurezas, se pueden obtener mediante digestión con la proteasa trombina. El vector de expresión contiene una secuencia aminoacídica reconocida por esta proteasa, la cual se encuentra entre la proteína Glutation-S-Transferasa y la proteína recombinante clonada. Todos estos procesos

se realizaron en tampones de extracción conteniendo antiproteasas, y a 4°C, para evitar procesos de degradación de las proteínas de interés. En la **figura 3.6.** se puede observar un esquema que resume el proceso de la extracción proteica.

A continuación detallaremos más concretamente la extracción de la proteína a nivel metodológico. Para la obtención de las distintas proteínas fue utilizada la cepa de *Escherichia Coli* B121 caracterizada por carecer de algunas proteasas (*E. coli* B F⁻, *ompT*, *hdsS* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*, *dcm*).

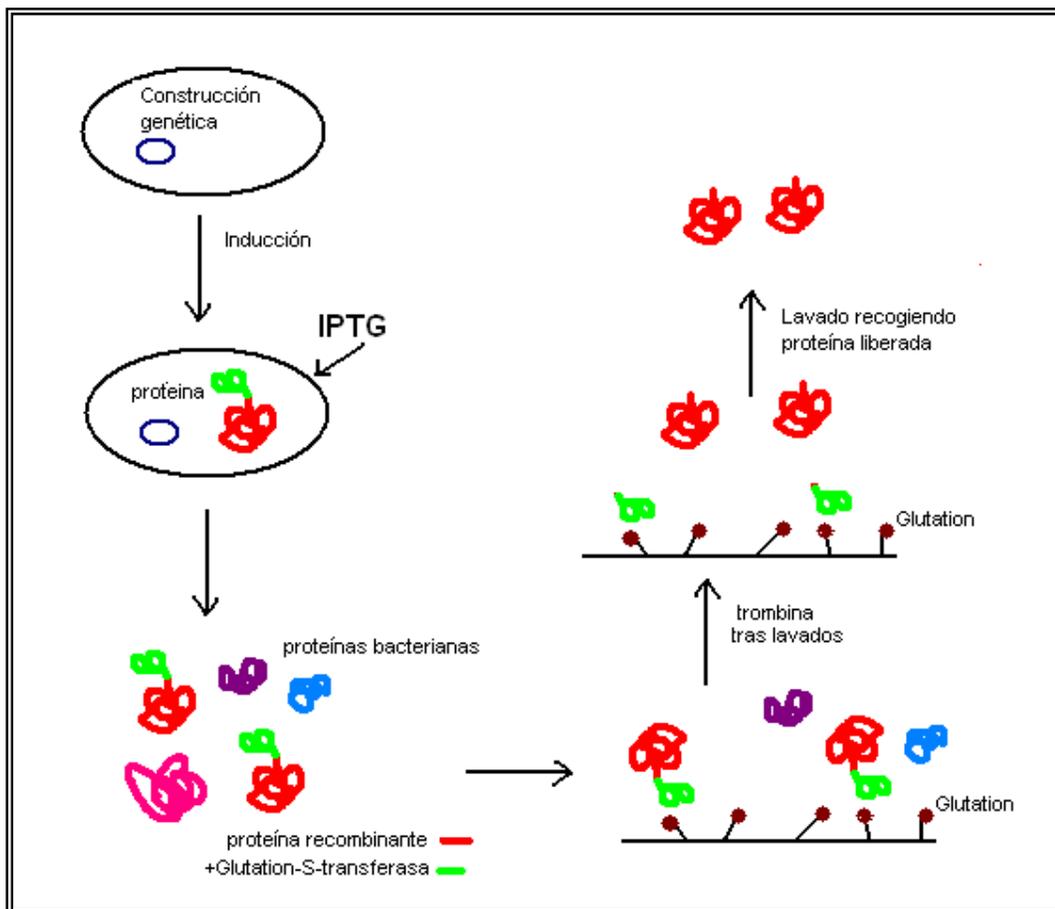


Figura 3.6.- Esquema de las bases de la extracción proteica con el vector pGex4T-2. Se induce la producción mediante IPTG y tras la extracción de las proteínas bacterianas, se aísla las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad y digestión con trombina.

Tras la transformación de las mismas y su cultivo en medio sólido, los clones obtenidos se inocularon en 5 ml de medio LB, dejándolos crecer durante una noche a 37 °C. Se añadieron 15 ml de éstos (3 tubos) en un litro de LB hasta

un total de cuatro litros de LB. Las bacterias se dejaron crecer entre 0.4 y 0.6 (fase exponencial de crecimiento de las bacterias).

Una vez alcanzada la OD₆₀₀ esperada se procedió a la inducción durante hora y media de la expresión proteica mediante la adición de IPTG (100 mM) y MgCl₂ (100 mM). Tras una centrifugación a 3.000 r.p.m. (1000xg) durante 15 minutos a 4°C el precipitado bacteriano fue obtenido.

Las bacterias fueron resuspendidas en un tampón de resuspensión conteniendo EDTA 10 mM, NaCl 0,1 M, TritonX100 0,1%, DTT 4 mM, TrisHCl pH 7,8 , 0,1 M, glicerol 20 % y lisozima 1 mg/ml en PBS, además de una combinación de antiproteasas. Las antiproteasas fueron añadidas en forma de pastillas (“protease inhibitor cocktail tablets” de la casa comercial Roche) o como una mezcla conteniendo antipapaina 4 ng/ml, quimostatina 4 ng/ml. y PMSF 4 μM. El volumen de resuspensión del precipitado bacteriano fue de 50 ml.

Para producir la ruptura de la pared bacteriana, dos métodos fueron utilizados, ultrasonidos (sonicación) o presión (French Press). Así en el caso de la sonicación se realizaron dos pruebas: 6 pulsos de ultrasonidos de 5 minutos a una intensidad máxima, con 5 minutos de descanso entre cada uno, y 3 pulsos de ultrasonidos de 10 segundos a una intensidad máxima, con 30 segundos de descanso entre cada uno. En el caso de la French Press se realizó a una presión de 20.000 psi.

Tras 30 minutos de agitación se realizó una centrifugación de 30.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, al que se añadió 1 ml de matriz equilibrada, dejando en contacto toda la noche a 4°C en agitación.

Para equilibrar la matriz (Sheparose) eliminando el alcohol acompañante, se lavó 1 ml de matriz (para cada cuatro litros de medios de cultivo iniciales) con 10 ml de PBS y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C, retirando posteriormente el sobrenadante.

Al día siguiente, es necesario realizar el lavado progresivo de la matriz para eliminar las proteínas bacterianas. Tras centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C se eliminó el sobrenadante del cultivo. Posteriormente se realizan 3 lavados mediante la adición de 50 ml de tampón de lavado, manteniéndolos 30 minutos en agitación suave a 4°C. La centrifugación para eliminar el sobrenadante de la matriz se realiza a 3000 r.p.m. durante 5-10 minutos para evitar su apelmazamiento. La composición del tampón de lavado es de Tris 0,1M pH 7,8, NaCl 0,1M, EDTA 10mM, DTT 4mM y la combinación de antiproteasas. A los sobrenadantes que se retiraron de cada centrifugación para comprobar la presencia o ausencia de proteínas, se les realizó una medida en el espectrofotómetro a 280 nm. Los lavados fueron interrumpidos cuando la OD₂₈₀ alcanzó un valor de cero. Tras estos lavados, es necesario eliminar las antiproteasas mediante 2 lavados con PBS ya que podrían interferir con la trombina que posteriormente es utilizada.

Por último, se introduce la matriz en un tubo *Ependorf* de 1,5ml. y se centrifuga a 3.000 r.p.m. para eliminar el resto de sobrenadante. Se añaden 600µl de PBS y de trombina a una concentración de 10 unidades/ml. Durante este proceso, hemos lavado la matriz de impurezas y por medio de la trombina, se rompe la unión existente entre la proteína híbrida y la matriz, de manera que la proteína quedará libre en el medio y será recogida mediante centrifugación a 3.000 r.p.m.

La digestión con trombina se realizó en un primer paso incubando a temperatura ambiente durante 5 horas, recogiendo el sobrenadante, y posteriormente adicionado de nuevo trombina e incubando a 4 °C toda la noche. La proteína obtenida fue utilizada para concentrarla o directamente se alicuotó en volúmenes de 50 µl. almacenándose a -80°C.

3.2.2. CONCENTRACION DE LA PROTEINA.

Para conseguir una proteína más concentrada fue utilizado el sistema denominado centricón, basado en la filtración de la proteína. Por distintos

tamaños de poros. Para cada proteína se utilizaron los centricones detallados en la **Tabla 3.6.**

Proteína	Tamaño centricon (kDa)
proGDNF	50,10 y 3
proGDNF-TTC	100 y 50
GDNFm	50,10 y 3
GDNFmTTC	100 y 50
proBDNF	50,10 y 3
proBDNF-TTC	100 y 50
BDNFm	50,10 y 3
BDNFmTTC	100 y 50

Tabla 3.6.- Centricones utilizados en cada molécula.

Se realizó un tratamiento previo a los centricones con Tween 20 al 5% durante una noche, retirando la disolución mediante lavados con agua milliQ. La centrifugación fue realizada a 1.000xg (Centricon 100) durante 30 minutos, 5.000xg durante 15 minutos (Centricon 50), 5.000xg durante 1 hora (Centricon 10) o 7.500xg durante 2 horas (Centricon 3), todos ellos a 4°C.

3.2.3 VISUALIZACION DE LA PROTEINA.

Para el control de la pureza de la proteína se realizaron geles de acrilamida y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie y/o con nitrato de plata, o fueron utilizados para la realización de Western-Blotting.

Los reactivos utilizados para realizar los geles de acrilamida fueron:

- Low buffer gel 5x (LGB5x): 0,5 % (p/v) de SDS, 22,7 % (p/v) de Tris base, 30 % (v/v) de HCl 1M a un pH 8,8.
- Upper buffer gel 5x (UGB5x): 0,5 % (p/v) de SDS, 7,57 % (p/v) de Tris base a un pH 6,8. La solución debe ser filtrada antes de utilizarla.

3. Material y métodos

- Buffer de electroforesis 10 x: 3,025 (p/v) de Tris base, 14,42 (p/v) de glicina y 1% (p/v) de SDS.
- Buffer de carga 2x: 8 % (p/v) de SDS, 40 % (p/v) de glicerol y 10 % (v/v) de UGB 5x con 1 mg de bromofenol

Se realizaron distintos geles de separación en función del peso molecular de las proteínas. En el caso de las proteínas fusionadas a TTC con pesos superiores a 50 kDa, se prepararon geles de acrilamida de separación al 12 % y al 10 %, y en el resto de las proteínas con pesos inferiores a 50 kDa, se prepararon geles de acrilamida de separación al 15 % y al 10%. En la **tabla 3.7.** se puede observar la composición de un gel al 10%. En el caso de una concentración del 12% se incrementa en 1 ml la acrilamida, y en el caso del 15%, se incrementa en 2,5 ml Este volumen incrementado es disminuido de la cantidad de agua utilizada.

Separating Gel 10 %	Stacking Gel 4%
5 ml. acrilamida al 30 %	1 ml. acrilamida al 30 %
3 ml. de LGB 5x	1,5 ml. de UGB 5x
7 ml de agua	5 ml de agua
56 µl. de APS al 10%	80 µl. de APS al 10%
7 µl. de Temed	10 µl. de Temed

Tabla 3.7.- Composición de un gel de acrilamida para proteínas al 10%.

Los marcadores de tallas utilizados fueron “Kaleidoscope Prestained Standards” que comprende pesos moleculares de 216 a 7,6 kDa y “Prestained SDS-PAGE Standards, low range” que comprende pesos moleculares entre 103 kDa y 20,7 kDa, ambos de la casa comercial Bio-Rad.

Se realizó la electroforesis a 150V entre una hora y media, y una hora en todos los casos observando el recorrido del marcador de talla para determinar el momento de finalización de la misma.

3.2.3.1. VISUALIZACION MEDIANTE TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE.

Una vez finalizado el corrido electroforético, se tiñeron los geles con azul de Coomassie durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a la decoloración durante 1 a 3 horas cambiando varias veces la solución. La composición de las soluciones fue:

- ✓ Solución de azul de Coomassie: 40 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético y 0,1% (p/v) de azul de Coomassie R-250.
- ✓ Solución decolorante: 40 % (v/v) de metanol y 10 % (v/v) de ácido acético.

Una vez decolorado el gel se procedió al secado del mismo para su conservación. Se depositó el gel sobre papel Whatman, y se realizó el secado en un secador de geles de Biorad a una temperatura de 80 °C durante 30 minutos en vacío.

3.2.3.2. VISUALIZACIÓN MEDIANTE TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Con la finalidad de obtener mayor sensibilidad en la tinción, y asegurar la pureza de la muestra, se realizó también la tinción de geles con nitrato de plata, la cual detecta menor cantidad de proteína. Así se fijó el gel en una solución al 50% metanol y 10 % ácido acético durante 30 minutos. Posteriormente se rehidrató en una solución 10% metanol, 10% ácido acético, calentando durante un minuto al microondas. Tras eliminar la solución anterior, se añadió agua, y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez rehidratado, se eliminó el agua y se adicionó una solución de 100 ml. agua y 33 µl. de DTT 100mM calentando al microondas un minuto. Posteriormente se eliminó la solución anterior y se tiñó con una solución de AgNO₃ 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con agua destilada se procedió al revelado. Este revelado se realizó con una solución fría consistente en 40 ml. de Na₂CO₃ 15% (6 gr. /200ml.) y 200 µl.

de formaldehído al 37% en un volumen final de 200 ml con agua. Se detuvo la reacción con 10 ml. de una solución de ácido cítrico 2,3 M, y finalmente tras retirar esta solución se procedió al secado del gel.

3.2.3.3. WESTERN BLOTTING

Tras el corrido electroforético en geles de acrilamida, se procedió a la transferencia a membranas de nitrocelulosa o PVDF. En el caso de las membranas de PVDF, fue necesario un tratamiento previo de la misma que consiste en introducirla 3 segundos en metanol, 3 minutos en agua y un mínimo de 10 minutos en el tampón de transferencia cuya composición fue: 0,145 % (p/v) de Tris base 124 mM, 0,72 % (p/v) de glicina 6 mM y 20 % (v/v) de metanol.

Se realizó la transferencia a la membrana mediante inmersión en el tampón de transferencia durante dos horas y media a 100 V. Posteriormente la membrana fue incubada en buffer de bloqueo que consiste en 1% de leche desnatada en la solución NET1x. La solución NET10x está compuesta por 8,76 % (p/v) de NaCl 1,5 M, 1,86 % (p/v) de EDTA 0,05 M, 6,05 % (p/v) de TrisHCl 0,5M y 0,5 % (p/v) de Tritón 100x 0,5% a un pH final de 7,4.

Tras la incubación durante 30 minutos en buffer de bloqueo, se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con el primer anticuerpo disuelto en tampón NET1x. Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- ✓ Ac antiGDNF: anticuerpo contra la proteína GDNF:
 - ✓ AntiGDNF producido en conejo (casa Santa Cruz). Dilución 1:500.
 - ✓ AntiGDNF producido en pollo (casa Promega). Dilución 1:1000.
- ✓ Ac antiBDNF: anticuerpo contra la proteína BDNF:
 - ✓ AntiBDNF producido en conejo (casa Santa Cruz). Dilución 1:500.

- ✓ AntiBDNF producido en pollo (casa Promega). Dilución 1:1000.
- ✓ Ac anti TTC: anticuerpo contra la proteína TTC:
 - ✓ SP 48: producido en conejo. Dilución 1:500.
 - ✓ SP 49: producido en conejo. Dilución 1:500.

Tras el tiempo de incubación con cada uno de los anticuerpos, se realizaron tres lavados con NET1x de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario diluido en NET1x durante una hora a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios fueron utilizados:

- ✓ Ac anticonejo marcado con peroxidasa (Amersham-Pharmacia): se aplicó a una dilución de 1:3000.
- ✓ Ac antipollo marcado con peroxidasa (Sigma): se aplicó a una dilución de 1:200 en NET1x (dos gotas del Ab en 10 ml de NET1X)
- ✓ Ac anticonejo marcado con fosfatasa (Vector): se aplicó a una dilución de 1:1000.
- ✓ Ac anticonejo biotinilado (Vector): se aplicó a una dilución de 1:200 en NET1x (dos gotas del Ab en 10 ml de NET1X).
- ✓ Ac antipollo biotinilado (Promega): se aplicó a una dilución de 1:200.

Tras la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con NET1X antes de pasar al revelado. Dependiendo del anticuerpo secundario utilizado, distintos métodos fueron usados. Los anticuerpos marcados con peroxidasa se revelaron con diaminobenzidina (DAB, Sigma) parando la reacción con agua destilada y obteniendo señales de color marrón. Los anticuerpos marcados con fosfatasa, se revelaron con 44 µl. de NBT y 33 µl. de BCIP. Se paró la reacción con agua obteniendo señales de color violeta. Y finalmente si el anticuerpo estaba marcado con biotina, se incubó con el complejo ABC que amplifica la señal para finalmente revelarlo con DAB.

3.2.4. CUANTIFICACION DE LA PROTEINA.

La concentración proteica fue calculada mediante el método de Bradford, BCA y por comparación visual frente a una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en geles de acrilamida.

Método BCA.

Dicho método está basado en la formación de un complejo entre proteínas y Cu^{2+} que en condiciones alcalinas reduce el Cu^{2+} a Cu^+ . El Cu^+ obtenido, forma un complejo con BCA (bicinchoninic acid) de color azul-púrpura, estimable mediante espectrofotometría, de modo que la cantidad de complejo coloreado será proporcional a la cantidad de Cu^{2+} reducido, y por lo tanto, a la cantidad de proteína presente en el medio (Smith y cols. 1985).

Concentración final	Volumen de agua	Volumen de BSA 1 mg/ml.
0 $\mu\text{g/ml}$.	500 μl .	0 μl .
10 $\mu\text{g/ml}$.	400 μl .	100 μl .
20 $\mu\text{g/ml}$.	300 μl .	200 μl .
30 $\mu\text{g/ml}$.	200 μl .	300 μl .
40 $\mu\text{g/ml}$.	100 μl .	400 μl .
50 $\mu\text{g/ml}$.	0 μl .	500 μl .

Tabla 3.8.- Concentraciones de la recta patrón de BSA utilizadas en el método BCA.

Para la realización de la recta patrón, se tomaron 100 μl . de cada una de las distintas concentraciones proteicas. Se preparó el reactivo BCA mezclando 50 ml. del reactivo A (contiene biocinchoninic acid; Sigma) y 1 ml. de reactivo B (contiene cobre; Sigma). Por cada 100 μl . de la muestra de la recta patrón, se adicionaron 2 ml de la mezcla del reactivo, obteniendo así las concentraciones finales.

Para las muestras de proteína extraída tanto concentrada, como sin concentrar, se realizaron distintas diluciones en agua milli Q, procediendo del mismo modo para realizar la reacción con el reactivo BCA.

Se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Los datos obtenidos se estudiaron mediante el programa Excell.

Método Bradford

Dicho método está basado en la unión inespecífica del colorante azul de Coomassie a las proteínas (Bradford 1976).

Concentración final	Volumen de agua	Volumen de BSA 1 µg/10 µl.
0 µg/ml.	800 µl.	0 µl.
2 µg/ml.	780 µl.	20 µl.
4 µg/ml.	760 µl.	40 µl.
6 µg/ml.	740 µl.	60 µl.
8 µg/ml.	720 µl.	80 µl.
10 µg/ml.	700 µl.	100 µl.
12 µg/ml.	680 µl.	120 µl.

Tabla 3.9.- Concentraciones de la recta patrón de BSA utilizadas en el método Bradford

Las muestras de proteína fueron diluidas en 800µl. Tanto a las muestras de la recta patrón (concentraciones expuestas en la **Tabla 3.9.**) como a la muestra conteniendo la proteína se le añadieron 200 µl. del reactivo de Bradford. Se incubó cinco minutos a temperatura ambiente y se procedió a la lectura espectrofotométrica a 595 nm. Los datos obtenidos se estudiaron mediante el programa Excell.

Estimación visual en geles de acrilamida.

Se cargaron los geles con las distintas muestras de la recta patrón cuya composición podemos observar en la **Tabla 3.10.** acompañadas de las proteínas problema. Tras el corrido electroforético y posterior tinción en plata y/o en azul de Coomassie, se comparó visualmente la concentración aproximada de la proteína extraída en función de la intensidad de las bandas obtenidas en el gel.

Concentración final	Volumen de PBS	Volumen de BSA 1 mg/ml
0 µg/ml.	1000 µl.	0 µl.
0,1 ng/µl.	900 µl.	1 µl.
0,5 ng/µl.	500 µl.	5 µl.
1 ng/µl.	900 µl.	10 µl.
5 ng/µl.	500 µl.	50 µl.
10 ng/µl.	900 µl.	100 µl.
50 ng/µl.	500 µl.	500 µl.

Tabla 3.10.- Concentraciones de la recta patrón de BSA utilizadas en la estimación visual en geles de acrilamida

3.3. CULTIVOS CELULARES

3.3.1. CULTIVOS PRIMARIOS DE MEDULA ESPINAL

Para la realización de estos cultivos se prepararon de forma previa placas de cultivo con cristales de adherencia mediante la incubación con poliornitina (5 µg/ml.) en una dilución 1/100 en PBS toda la noche a 37 °C. Tras la eliminación por aspiración de la poliornitina y esterilización durante 15 minutos en ultravioleta, se adicionaron 400 µl. del medio L15/SFV, previamente filtrado. La composición del mismo fue 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 0,28 % (p/v) de bicarbonato sódico (Gibco), en medio L15 con glutamato (Gibco).

El material de disección fue esterilizado 45 minutos en rayos U.V. La ratona en el estado de gestación de 12 días fue sacrificada mediante intoxicación

con CO₂, para posteriormente extraer los fetos que se colocaron en una placa de Petri, y retirar el saco vitelino. La medula espinal de dichos fetos fue aislada y se colocaron un mínimo de seis en una solución de PBS estéril con glucosa al 0,15%.

Tras el troceado de las médulas, se realizó una incubación durante 15 minutos a 37°C en 1 ml de solución de PBS-glucosa, junto con 20 µl. de tripsina-EDTA (Gibco) para la disgregación del tejido. Se retiró el sobrenadante obtenido por decantación, y se realizaron posteriormente dos lavados con 2 ml de solución L15.

Con el fin de disgregar las células, se realizaron tres tratamientos progresivos con una solución compuesta por 10% (v/v) de BSA en medio L15, y distintas concentraciones de Dnasa 1 µg/µl, que fueron disminuyendo en cada tratamiento. La cantidad de Dnasa presente en el primer tratamiento fue una dilución del 5% (v/v) y en los dos posteriores del 2% (v/v). De forma inversa a la disminución de la cantidad de Dnasa en cada tratamiento, se aumentó la homogeneización mediante pipeteo de la solución con las células disgregadas, recogiendo los sobrenadantes obtenidos de cada tratamiento por homogeneización.

Se sometió la solución a un pulso de centrifuga para precipitar las células que contenía. Se adicionó 2 ml. de BSA con una pipeta Pasteur en el fondo del falcon, y tras centrifugar a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos a 24 °C se retiró el sobrenadante.

A 50 ml de medio neurobasal se le añadió B27 1X (Gibco), glutamax I 1X (Gibco), β-mercaptoetanol 50 nM (Gibco), penicilina 10 unidades/ml y estreptomycin 10 µg/ml (Gibco) (filtrado y conservado a 4°C). El precipitado obtenido conteniendo las células de interés, se resuspendió en 2 ml. de dicho medio con 15 µl. de Dnasa 1 µg/µl.

Del precipitado resuspendido conteniendo las neuronas de interés, se realizó un conteo mediante Trypan Blue (Gibco), que permite diferenciar células

vivas de muertas. Se aplicaron las diluciones necesarias con el medio neurobasal, para poder depositar sobre cada pocillo 150.000 células en 400 µl tras retirar el medio L15/SFV.

Tras la incubación a 37°C/5% CO₂/ humedad y cada 3-4 días se realizaron cambios de 200 µl. de medio neurobasal. Se observó el crecimiento y diferenciación de las neuronas del cultivo en un microscopio invertido.

3.3.2. LINEA CELULAR NEURO 2A

Propagación de la línea

La línea Neuro2A es una línea celular obtenida de neuroblastoma de ratón (Olmsted y cols. 1970). Para propagar las neuronas en una placa de cultivo, se partió de una alícuota almacenada a -80°C (en un 10% de DMSO). Se dispensa 1 ml de esta alícuota en 12 ml de medio de cultivo compuesto por medio Eagle (Gibco), y suero fetal bovino (Gibco) al 10%. El cultivo se realizó a 37°C/5% CO₂/humedad.

Mantenimiento de la línea

La línea crece rápidamente, y por tanto es necesario su replicación cada 3 días, cuando las células se encuentran confluentes. Tras retirar el medio de cultivo por aspiración, se añade tripsina al 10% en PBS1X a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se recoge el medio que contiene ya las células en suspensión y se centrifuga a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos a 25 °C. El pellet conteniendo las neuronas se resuspende en 5 ml de medio compuesto por medio DMEM (Dubelco Med Eagle Medium), Suero Fetal Bovino (Gibco) al 10 %, L-glutamina 2 mM (Gibco), penicilina a 10 unidades/ml y estreptomicina a 10 µg/ml (Gibco).

De los 5 ml. resuspendidos, se toma 1 ml. que se adiciona a 12 ml. de medio en una placa de cultivo para pasar a incubar a 37°C/5% CO₂/ humedad.

3.3.3. CULTIVOS CORTICALES PRIMARIOS

Como en el caso de los cultivos descritos en el apartado 3.3.1., es necesario acondicionar las placas con un polímero que permita la adhesión de las neuronas a su base, donde se han colocado cristales esterilizados, para poder observar las neuronas posteriormente al microscopio. Con este propósito, se prepara una dilución 1/20 de “matrigel” en medio Hanks (Gibco), y se deja a temperatura ambiente hasta que están preparados los cultivos para dispensar en las placas. Del mismo modo que en el caso anterior, el material de disección utilizado fue esterilizado previamente mediante rayos ultravioletas.

Para la realización de cultivos primarios corticales, se partió de cerebros de ratones neonatos. Se diseccionó la cabeza del ratón, se extrajo el cerebro y se depositó sobre medio Hanks (Gibco) con penicilina/estreptomicina 1x (Gibco). Se retiró el hipocampo disecando el cortex cerebral, depositándolo en el mismo medio.

Posteriormente, se cortó con una cuchilla estéril haciendo cortes lo más finos posibles. Se recogieron los cortes con el medio y se depositaron en un falcon. Para retirar el medio se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos a 22 °C. Se descartó el sobrenadante por aspiración y se añadió 2 ml de DMEM/F12 (Gibco) y 200 µl. de tripsina 0,25% (Gibco). Este es el proceso de dispersión química. Se dejó actuar durante 2-3 minutos en tripsina a temperatura ambiente. En este momento se añadieron 60 µl. de Dnasa 2 µg/µl durante 2-3 minutos a temperatura ambiente.

Para detener la reacción se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos a 22 °C retirando el sobrenadante por aspiración. Posteriormente se adicionaron 2 ml de DMEM/F12(Gibco) con 200 µl. de suero fetal bovino (Gibco) para finalizar la dispersión química.

Para realizar la dispersión física, se pipeteó arriba y abajo con una pipeta Pasteur flameada en la punta, hasta que quedó perfectamente resuspendido el

sedimento de células. Una vez resuspendido se filtró estos 2 ml sobre una membrana de 80 µm., adicionando otros 2 ml de DMEM/F12(Gibco).

Se procedió a la cuantificación de células viables mediante Trypan Blue (Gibco), tomando una alícuota de 10 µl. y diluyendo ésta dos veces con el reactivo. Se cuantificó las células mediante un microscopio invertido, para depositar una concentración en cada placa de 50.000-100.000 células/2 ml de cultivo.

El medio está compuesto por 50 ml. de DMEM/F12 (Gibco) con selenito de sodio 20 nM (Gibco), 10 µg/ml de transferrina (Gibco) y 100 µg/ml de insulina (Gibco). Mediante un microscopio invertido se controló el crecimiento y diferenciación. Esta última tiene lugar tras una o dos semanas.

3.4. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD “IN VITRO” DE LOS FACTORES NEUROTROFICOS FUSIONADOS A TTC.

3.4.1. EFECTO DE LAS MOLECULAS DE FUSION SOBRE MARCADORES RELACIONADOS CON LA APOPTOSIS.

La apoptosis (muerte celular programada) es la forma de denominar la desaparición genéticamente controlada de las células durante el desarrollo. Neuronas dañadas y células que han perdido su regulación en el ciclo celular, tales como células tumorales o células con algún tipo de mutación genética, también sufren procesos de apoptosis. La apoptosis es distinta de la necrosis tanto en aspectos bioquímicos como morfológicos. Al contrario que las células necróticas, las células apoptóticas se caracterizan morfológicamente por la compactación de la cromatina nuclear, la fragmentación del citoplasma y la producción de cuerpos apoptóticos unidos a la membrana. Bioquímicamente, la apoptosis se distingue por la fragmentación del genoma, y la proteólisis o degradación de varias proteínas celulares (p.e. caspasa 3).

Al igual que ocurre en la medida de la viabilidad celular, no existe ningún parámetro que defina totalmente la muerte celular, por lo que se suelen utilizar aproximaciones que identifiquen el proceso de apoptosis. Por otra parte, varios métodos han sido desarrollados para diferenciar células vivas de células apoptóticas, tanto en estadios tempranos como tardíos del proceso.

3.4.1.1. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD CASPASA-3

La caspasa 3 es una cisteína-proteasa que posee la habilidad de proteolizar otros péptidos tras un residuo de aspartato. Basándose en esta característica peculiar de las caspasas, se han diseñado péptidos específicos para cada una de las proteínas de la familia de las caspasas, los cuales se unen a fluoróforos o sustancias colorimétricas de modo que cuando la proteína proteoliza el péptido en cuestión, libera la sustancia fluorométrica (o colorimétrica en su caso), emitiendo una señal que puede ser medida (Gurtu y cols. 1997). En el caso de la caspasa 3, el sustrato específico consiste en un tetrapéptido denominado DEVD, cuyas siglas corresponden a los aminoácidos que lo componen (Nicholson y cols. 1995). Uno de los sustratos fluorométricos más comúnmente utilizados, es el denominado AFC o 7-amino-4-trifluorometil cumarina, mientras en el caso de los sustratos colorimétricos es el denominado pNA o p-nitroanilida (**Figura 3.7.**).

En nuestro caso, la determinación se realizó con fluorimetría y el reactivo utilizado fue el DEVD-AFC.

El estudio de la determinación de la caspasa 3 se realizó en la línea celular Neuro2A. Para ello, se partió de cultivos con 10^6 células en 4 ml de medio. La degeneración de dichos cultivos fue llevada a cabo por la adición al medio de trombina, a una concentración de 6 unidades/ml de cultivo. Los estudios se realizaron a las 48 horas de adicionar la droga.

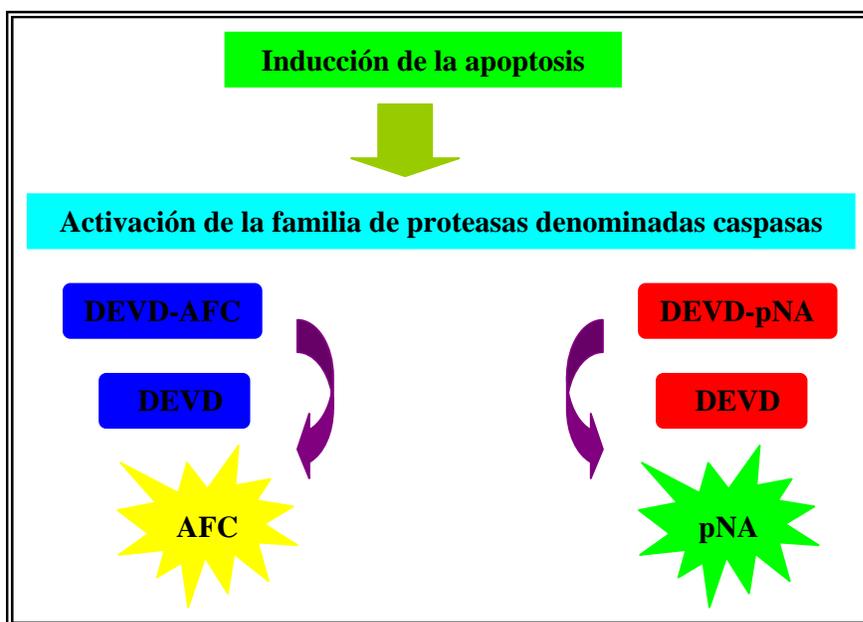


Figura 3.7. – Detección fluorométrica y colorimétrica de la actividad proteasa dependiente de DEVD

Las proteínas estudiadas (GDNF-TTC y BDNF-TTC) se adicionaron en una concentración de 3 ng/ml. de cultivo.

A las 48 horas se procedió a recoger las células. Para ello, se retiró por aspiración el medio y se trypsinizó adicionando 4 ml de tripsina 10%. Se dejó actuar durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se recogieron las células trypsinizadas y se centrifugaron a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos a 25 °C, retirando el sobrenadante por aspiración.

Los pellet conteniendo las células de estudio, se resuspendieron en el que denominaremos buffer de lisis, compuesto por 100 mM Hepes pH=7,5, 1% Tritón 100x, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 µg/ml. leupeptina, 1 µg/ml. pepstatina A y 1 mM EDTA (Smirnova y cols. 1998).

Se incubó la resuspensión en este buffer durante 30 minutos en hielo. Finalizada la incubación se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. De los sobrenadantes de cada muestra, se dispensaron 50 µl en pocillos de una microplaca de 96 pocillos. A cada pocillo se le

adicionaron otros 50 μ l del reactivo DEVD-AFC 40 μ M. En todos los experimentos se establecieron pocillos sin muestra, conteniendo el buffer de extracción de proteínas junto al reactivo, para determinar la fluorescencia endógena de éstos. Esta fluorescencia fue sustraída de la fluorescencia de cada una de las muestras.

Las medidas se realizaron en las placas de 96 pocillos mencionadas, excitando las muestras a una longitud de onda de excitación 360 ± 15 nm. y adquiriendo la emisión del fluoróforo a una longitud de onda de $530 \pm 12,5$ nm. Se tomaron adquisiciones cada 30 minutos durante 24 horas, incubando a 37 °C. A cada una de las muestras se les realizó una medida de la cantidad de proteína contenida mediante el método Bradford, que nos permitiría corregir las distintas cantidades de proteína de las muestras. La fluorescencia de cada una de las muestras, corregida para la fluorescencia endógena del reactivo, se dividió por la cantidad de proteína total correspondiente como método de estandarización de cada una de ellas.

3.4.1.2. EFECTO SOBRE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.

La citometría de flujo o FACS es una técnica descrita para la medida de células en apoptosis en una población neuronal, tras adicionar un marcador específico para estas células con muerte programada, anexina-V (Vermes y cols. 1995). Existen estudios donde se ha realizado este tipo de técnica para la determinación de la proporción de neuronas apoptóticas en una línea celular (Boccellino y cols. 2003), aunque no es la más comúnmente utilizada.

El programa apoptótico está caracterizado por ciertos hechos fisiológicos que incluyen la pérdida de la asimetría de la membrana, la condensación del citoplasma y el núcleo, y la fragmentación del DNA. La pérdida de la asimetría de la membrana es uno de los primeros hechos que se producen en los procesos apoptóticos. En las células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina, es translocado de la capa interna de la membrana plasmática a la

capa externa de ésta, exponiéndolo al entorno extracelular. La anexina V es una proteína de 35-36 kDa, que se une a los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente con una mayor especificidad por la fosfatidilserina que por otros fosfolípidos. Esto la hace una sonda específica para la identificación de células apoptóticas (Koopman y cols. 1994; Homburg y cols. 1995; Martin y cols. 1995; Vermes y cols. 1995).

Estos estudios se realizaron en la línea celular Neuro2A. Para ello, se prepararon en todos los casos poblaciones de 10^6 células por cada 3 ml de medio, en cada una de las condiciones estudiadas.

Con la finalidad de inducir apoptosis, se utilizó la adición de la droga THA (DL-threo- β -hydroxy-aspartic acid) a distintas concentraciones: 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M y 12,5 μ M o la privación de suero a los cultivos.

Las distintas proteínas problema objeto de estudio (GDNF-TTC, BDNF-TTC y TTC) fueron añadidas a distintas concentraciones: 10 ng/ml; 50 ng/ml; 250 ng/ml. de cultivo. Las medidas fueron realizadas tras 24, 48 y 72 horas del tratamiento.

Las neuronas unidas a la base de la placa de cultivo se recogieron en tubos falcon mediante la adición a la placa de 3 ml de tripsina 10% en PBS1x a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos a 25°C y se retiró el sobrenadante por aspiración.

Los pellet obtenidos conteniendo las neuronas de cada condición, se resuspendieron en 100 μ l. del tampón de la anexina (0,14 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ en 0,01M de Hepes a pH=7,4). A este tampón de anexina conteniendo las neuronas se les adicionó 1 μ l. de anexina y se dejó incubar protegido de la luz a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Posteriormente, se le adicionó a cada muestra 1 μ l. de yoduro de propidio (marcador de células muertas o en estadios tardíos de apoptosis mediante unión a

DNA) y 900 μ l. de tampón de anexina. En cada experimento siempre se prepararon células sin degenerar y sin adición de proteínas para la estandarización de las condiciones de adquisición en el citómetro de flujo, el cual se dividió en cuatro partes: una a la que se le adicionó anexina y ioduro de propidio, una segunda a la que sólo se le adicionó anexina, una tercera a la que solamente se le adicionó ioduro de propidio y finalmente una cuarta, a la que no se le adicionó ningún marcador.

Finalizado todo el proceso, se procedió a la adquisición de cada muestra mediante el citómetro de flujo (FACS). En un primer lugar, se estandarizaron las condiciones en el proceso de adquisición del citómetro de flujo utilizando las células sin teñir. Se determinó el tamaño de las células a medir. La línea Neuro 2A, no presenta gran variabilidad en el tamaño celular, de modo que se observaron únicamente dos valores distintos de tamaño, uno en alta proporción de menor tamaño, que fue el adquirido y otro en una proporción menor, que se descartó. El número de células adquiridas por el sistema de la población neuronal con el tamaño seleccionado fue de 30.000 células. Del mismo modo, se estandarizaron las condiciones de medida de los detectores para los dos marcadores (anexina y ioduro de propidio), realizando adquisiciones de células teñidas únicamente con cada uno de los marcadores, frente a células sin teñir y células teñidas con ambos marcadores. Las longitudes de onda de adquisición utilizadas fueron en el caso de la anexina de 660 nm, y en el caso del ioduro de propidio de 562-588 nm.

3.4.2. DETERMINACIÓN SUBCELULAR DE Akt.

La medida de la quinasa Akt activada mediante western blotting, es una buena estimación de la supervivencia neuronal. Sin embargo, en nuestro caso, la activación de la quinasa Akt fue medida en cultivos corticales primarios mediante la realización de inmunocitoquímicas. Sobre los cultivos corticales se adicionaron las distintas proteínas, poniendo siempre un control negativo (cultivos sin adicionar proteínas) y un control positivo (BDNF a. 10 ng/ml.). Las concentraciones de las proteínas problema (GDNF-TTC, BDNF-TTC y TTC)

fueron de 10 ng/ml de cultivo. Una vez depositada la alícuota de proteína, se permitió que esta actuara durante 1 hora a 37°C/5% CO₂.

Transcurrida una hora, se tomaron los cultivos del incubador y se le realizaron dos lavados con PBS, conteniendo calcio y magnesio, para evitar que las neuronas se suelten de la base de la placa. Posteriormente, se procedió a la fijación de las células con PFA (paraformaldehído) al 4 %, dejándole actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Tras tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno, se realizó una incubación de una hora a temperatura ambiente con buffer de bloqueo compuesto por Tritón 100x al 0,3% (150 µl.), BSA al 6% (3 ml) en PBS 1x (50 ml).

El anticuerpo utilizado fue p-Akt, que es un anticuerpo policlonal purificado de conejo, que reconoce una corta secuencia aminoacídica que contiene la serina 473 fosforilada. Este aminoácido es uno de los que se fosforilan tras la activación de la quinasa por PI3 quinasa, responsable de dicha fosforilación, y por tanto marcará la proteína Akt en un estado activado (Meier y cols. 1997).

Se incubó con el anticuerpo primario (Santa Cruz) a una dilución de 1/1000 en el buffer de bloqueo durante una hora y media a temperatura ambiente. Previamente se realizó una centrifugación de 4.000 r.p.m. durante 5 minutos para retirar los posibles precipitados formados por los anticuerpos.

Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo marcado con fluorescencia en verde. La dilución aplicada fue de 1/1500 en el mismo buffer de bloqueo (se realiza la misma centrifugación que en el anticuerpo primario), incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. A partir de esta incubación, se realizó la experiencia protegiendo de la luz las preparaciones, ya que los fluorocromos se pueden ver afectados.

Finalizada esta última incubación, se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Se limpiaron los cristales con agua, se secaron y se montaron

en portacristales pegándolos con fluromont-G a temperatura ambiente durante un día.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio confocal de la casa comercial Zeiss. Se utilizó como longitud de onda de excitación 488 nm, a una intensidad del 21% de la lámpara. La emisión fue recogida en la franja del color verde, con un filtro que permite recoger señales entre 500-550 nm. El propósito de este experimento fue observar las diferencias en la intensidad provocada por las distintas inducciones de cada proteína. Tomando un zoom constante, se estableció cual de las proteínas marcaba la mayor de intensidad de fluorescencia (máximo de saturación en el detector). Recogiendo posteriormente las medidas de intensidad del resto de las muestras en las mismas condiciones, nos permite la comparación posterior de las intensidades de cada muestra.

3.5. ESTUDIO *IN VIVO* DEL TRANSPORTE RETRÓGRADO DE LOS FACTORES NEUROTROFICOS FUSIONADOS A TTC.

Para comprobar la funcionalidad de TTC en las proteínas quimeras obtenidas, es decir, su capacidad de transportar actividades enzimáticas al Sistema Nervioso Central, se utilizó el sistema hipoglosal. Dicho sistema ha sido utilizado para demostrar el transporte retrógrado y transináptico del fragmento C (Fishman y Carrigan 1987; Fishman y cols. 1992) y para el estudio del comportamiento de la proteína de fusión β -galactosidasa-fragmento C (Coen y cols. 1997; Miana-Mena y cols. 2003). En este sistema, el núcleo hipogloso o núcleo XII, constituye el centro motor que controla el movimiento de la lengua mediante el nervio motor XII. Los cuerpos celulares de las motoneuronas del núcleo XII proyectan sus axones hacia la lengua, con la cual establece placas motoras.

Así para la realización de los estudios *in vivo* en ratón del transporte de las moléculas quimera BDNF-TTC y GDNF-TTC se colocó al animal anestesiado en *decúbito supino* y se inyectó abordando la lengua desde su parte dorsal. El volumen de proteína inoculado fue de 20 μ l. En todos los experimentos se

conservó un ratón sin inyectar como control negativo. Durante todo el proceso, es de vital importancia mantener las condiciones de máxima esterilidad para evitar posibles infecciones en el animal.

A los 15 minutos y 8 horas tras la inyección, los animales fueron sacrificados por estrangulamiento, para posteriormente, y tras su decapitación, extraer los cerebros y las lenguas de los mismos. Dichos órganos se congelaron hasta su procesado. Fueron estudiados distintos métodos de extracción proteica a partir de dichos tejidos.

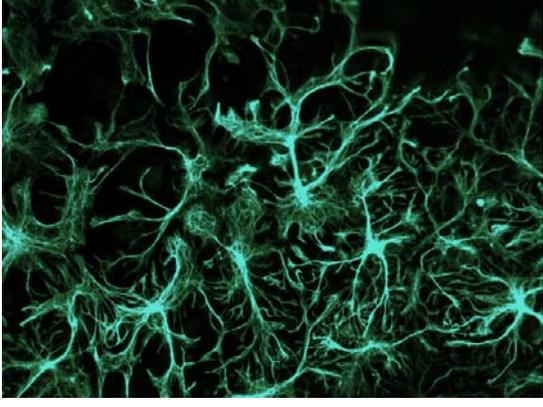
El tampón utilizado fue el de la casa comercial *Prionics*. Se adicionó 0,5 ml de tampón por cada 0,1 g de tejido y se sometió a homogeneización mediante la utilización de batidoras. El extracto obtenido fue recogido y conservado a -20°C para su posterior estudio mediante western-blotting.

Los estudios de western-blotting fueron realizados como se ha descrito anteriormente para las proteínas recombinantes. Se modificó la composición del tampón del anticuerpo secundario. En un intento de enmascarar las señales inespecíficas observadas en nuestras membranas se utilizó la misma composición que el tampón de bloqueo. La concentración del anticuerpo primario fue aumentada al doble para intentar aumentar el nivel de detección de la técnica.

3.6. METODOLOGÍA INFORMÁTICA.

Para el estudio de todas las secuencias de las construcciones se utilizó el programa informático *Bioedit*.

Para obtener los valores de las cuantificaciones de la intensidad de la fluorescencia, se utilizó el programa *LSM 5 Image Browser* incorporado en el microscopio confocal. Para el caso de análisis estadístico de los datos, (test de t de Student, medias, desviaciones estándar, etc.) y la construcción de las gráficas fueron utilizados los programas para PC *Statistica v 5.0* y *Excel 2000*.



4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSION

El apartado de resultados y discusión ha sido dividido en tres subapartados. En el primero de ellos se describe la metodología utilizada para el clonaje de los factores neurotróficos al fragmento C de la toxina tetánica. Un segundo capítulo donde se detallará la obtención de las proteínas recombinantes en vectores procariotas. Y un último en el que nos referiremos al estudio funcional de las proteínas obtenidas. Posteriormente, se realizará una discusión conjunta de los resultados.

4.1. CREACION DE VECTORES DE EXPRESION EN PROCARIOTAS MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Debido a su interés en neurología, la producción de las proteínas recombinantes de los factores neurotróficos (GDNF y BDNF) en *E. Coli* ha sido realizada en distintos sistemas y condiciones. Sin embargo, ambos factores neurotróficos forman cuerpos de inclusión, perdiéndose gran cantidad de la proteína recombinante producida. No es extraño que numerosos estudios se hayan realizado para incrementar la cantidad de proteína recombinante obtenida tanto con BDNF como GDNF (Meyer y cols. 1994; Negro y cols. 1994; Fukuzono y cols. 1995; Liew y cols. 1997; Zhang y cols. 1998; Mari y cols. 1999). Solamente se han observado incrementos en la producción de proteína cuando se expresa en vectores de fusión de expresión en procariotas como pGex-4T(Liew y cols. 1997).

Ante estos antecedentes, se decidió realizar el clonaje en el vector de fusión pGex4T-2, en un intento de buscar el sistema de mayor estabilidad para la producción y purificación de las proteínas recombinantes. El sistema fue utilizado tanto para la producción de los factores neurotróficos (GDNF y BDNF) como de la fusión de los mismos al fragmento C de la toxina tetánica (TTC). Se consideró necesaria la producción de los factores neurotróficos sin fusionar a TTC debido a que a pesar de que estos pueden conseguirse comercialmente, el hecho de

purificarlos del mismo modo que las fusiones a TTC los haría controles más idóneos en los futuros estudios de funcionalidad.

Sin embargo, tal y como ha sido descrito previamente, los factores neurotróficos (GDNF y BDNF) se producen en forma de proproteínas para posteriormente ser proteolizados a formas maduras, siendo estas las formas activas de los mismos (Leibrock y cols. 1989; Lin y cols. 1993). En un futuro, si nuestras proteínas resultan funcionales, se pretende que dichos factores sean producidos por células eucariotas tras la inyección de DNA desnudo. Por esta causa, del mismo modo que nos planteamos el estudio de la producción y reconocimiento de las proteínas en forma madura, creímos conveniente realizarlo también en la forma de proproteínas.

4.1.1 MUTAGENESIS DIRIGIDA MEDIANTE PCR.

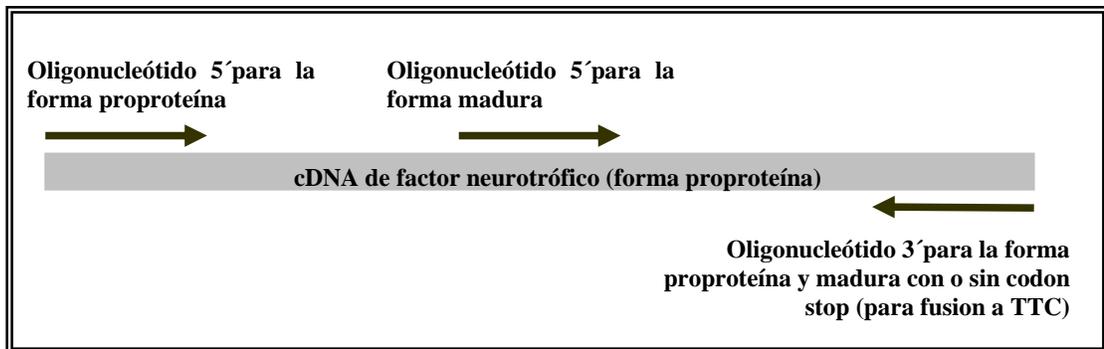
Antes de establecer la estrategia de clonaje fue necesario determinar los sitios de restricción presentes en los vectores de expresión procariota, sobre los que se iba a realizar el clonaje final de nuestras moléculas. En el caso de pGex4T-2, los sitios de restricción compatibles eran *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I, *Sal*I, *Xho*I y *Not*I (**Figura 3.5.**). Para las proteínas de fusión se utilizó el vector pGex4T-2 con el cDNA de TTC (pGex TTC), que poseía los mismos sitios de restricción que el anterior excepto *Eco*RI (**Figura 3.2.**).

Tras secuenciar y digerir los plásmidos que contenían los cDNA de GDNF proproteína y BDNF proproteína, se observaron sitios compatibles de clonaje, tanto en el caso de GDNF (*Bam*HI), como de BDNF (*Bam*HI en el extremo 3' y *Not*I en el extremo 5'). No obstante, estos sitios no mantenían el correcto marco de lectura de nuestras proteínas si eran insertados directamente en pGex 4T-2. Este hecho nos obligó a la modificación de los sitios mediante mutagénesis dirigida por PCR.

En todos los casos, se eligió en la región 5' *Bam*HI como sitio de restricción, debido a su posición en el extremo del polilinker. De este modo, se

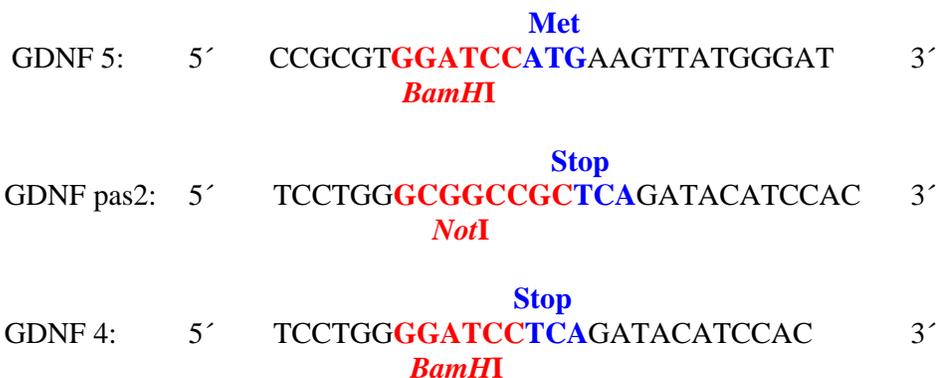
evitaba en la traducción de la construcción final que delante del primer aminoácido de la secuencia proteica obtenida, aparecieran aminoácidos correspondientes al polilinker del vector. Además, en el caso del vector pGex-TTC, debido a que la inserción debía realizarse en el extremo 5' del cDNA de TTC, el único sitio de restricción posible también fue *Bam*HI (**Figura 3.2.**). Otra modificación necesaria de los factores neurotróficos fue suprimir el codon stop, para su clonaje en el vector pGex-TTC.

En el caso de las formas de preproteínas, los oligonucleótidos correspondientes al extremo 5' fueron diseñados de modo que hibridaran comenzando a partir del primer codon del cDNA de partida. En el caso de las formas maduras, se diseñaron oligonucleótidos que hibridaran a partir del primer codon que codifica estas formas (en el caso de GDNF a 231 pb. de la primera base del cDNA y a 384 pb. en el caso de BDNF). Debido a que estas formas maduras son obtenidas en estado fisiológico por proteólisis y no contienen metionina, no se incluyó un codon correspondiente a este aminoácido, aprovechando para el inicio de la transcripción la metionina de la glutation-S-transferasa. De este modo, pretendemos que las proteínas recombinantes maduras, producidas en los vectores de expresión, reflejen de modo más aproximado la situación fisiológica. En el siguiente esquema queda resumida la estrategia mencionada:



Una vez realizada una descripción general, pasaremos a exponer de forma particular la estrategia para las proteínas maduras y de fusión. En primer lugar describiremos la realización de las proteínas recombinantes que contienen GDNF. Fueron 4 las obtenidas: GDNF proproteína (Gp), GDNF madura (Gm), GDNF proproteína fusionada a TTC (GpT) y GDNF madura fusionada a TTC (GmT).

El plásmido de partida fue el pcDNA 3.1.- GDNF proproteína, que posee la secuencia del propéptido. En el caso de Gp, fue necesaria la introducción de un sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 5´del gen (GDNF5), delante del codon de iniciación de lectura. En el extremo 3´fueron 2 los cebadores utilizados que introducían, un sitio *Bam*HI (GDNF4) o *Not*I (GDNFpas2):



Para Gm, la estrategia seguida fue idéntica en el extremo 3´. En el extremo 5´del cDNA, se introdujo el oligonucleótido GDNF3 que hibridaba con la base 231 del cDNA. Este cebador evitaba la zona del cDNA correspondiente al propéptido, e introducía un sitio de restricción para *Bam*HI, eliminando a la vez la metionina:



Para realizar la fusión GpT, fue necesaria la eliminación del codon de parada del neurotrófico, para lo cual se sintetizó un nuevo cebador (GDNFR2) que hibridase con la parte 3´del gen:



En el caso de la proteína GmT, la estrategia fue similar, manteniendo en el extremo 5´ las modificaciones descritas para Gm.

4.1.2. CONSTRUCCIONES FINALES OBTENIDAS

Una vez obtenidos los fragmentos de PCR por mutagénesis dirigida, fue necesario su clonaje en vectores específicos para producto PCR. Tras la etapa intermedia, se clonaron los vectores de expresión procariotas en bacterias competentes, por el método químico y por electroporación, no observándose mejores eficacias por un método u otro. Para la clonación tanto de los productos PCR, como de los vectores de expresión, se utilizaron distintas cepas de *E. Coli* (DH5 α ; TOP10F'; JM109), siendo la cepa DH5 α la que mejores resultados produjo como algunos autores han descrito (<http://www.vetmed.lsu.edu/vmp/genelab/sequence.tips.html#Host%20Strain%20Recommendations>). Como puede observarse, la naturaleza de la cepa bacteriana puede influir en la eficacia de las transformaciones realizadas (Peacock y cols. 1981). Un esquema de la estrategia de clonaje puede observarse en la **Figura 4.1**.

La detección de los clones positivos, se realizó en primer lugar por boiling PCR. La disposición de los oligonucleótidos, uno externo al inserto de interés (pGex5), y otro interno (GDNF R2 y BDNF 2), nos indicaría la presencia del inserto, y la correcta orientación del mismo. Este paso se realizó debido a que en el caso de la utilización de una sola enzima de restricción, la inserción inversa del fragmento era frecuente

4.1.2.1. FACTOR GDNF EN SUS FORMAS DE PROPROTEINA Y MADURA.

Tras la amplificación de GDNF proproteína con los oligonucleotidos GDNF 5 y GDNF 4, se intentó el clonaje en pGem con la enzima BamHI. Sin embargo al pasar al clonaje en el vector de pGex 4T-2, y tras el testaje mediante boiling PCR, en ningún momento se obtuvieron colonias positivas con el inserto en la dirección adecuada. Para evitar ese problema se pensó en la utilización de oligonucleótidos que introdujeran distintos sitios de restricción en la parte 5' y en el 3'. Para ello el cebador GDNF4 fue sustituido por GDNF pas2 con el fin de conseguir el sitio de restricción *NotI*. Esta última estrategia permitió la obtención

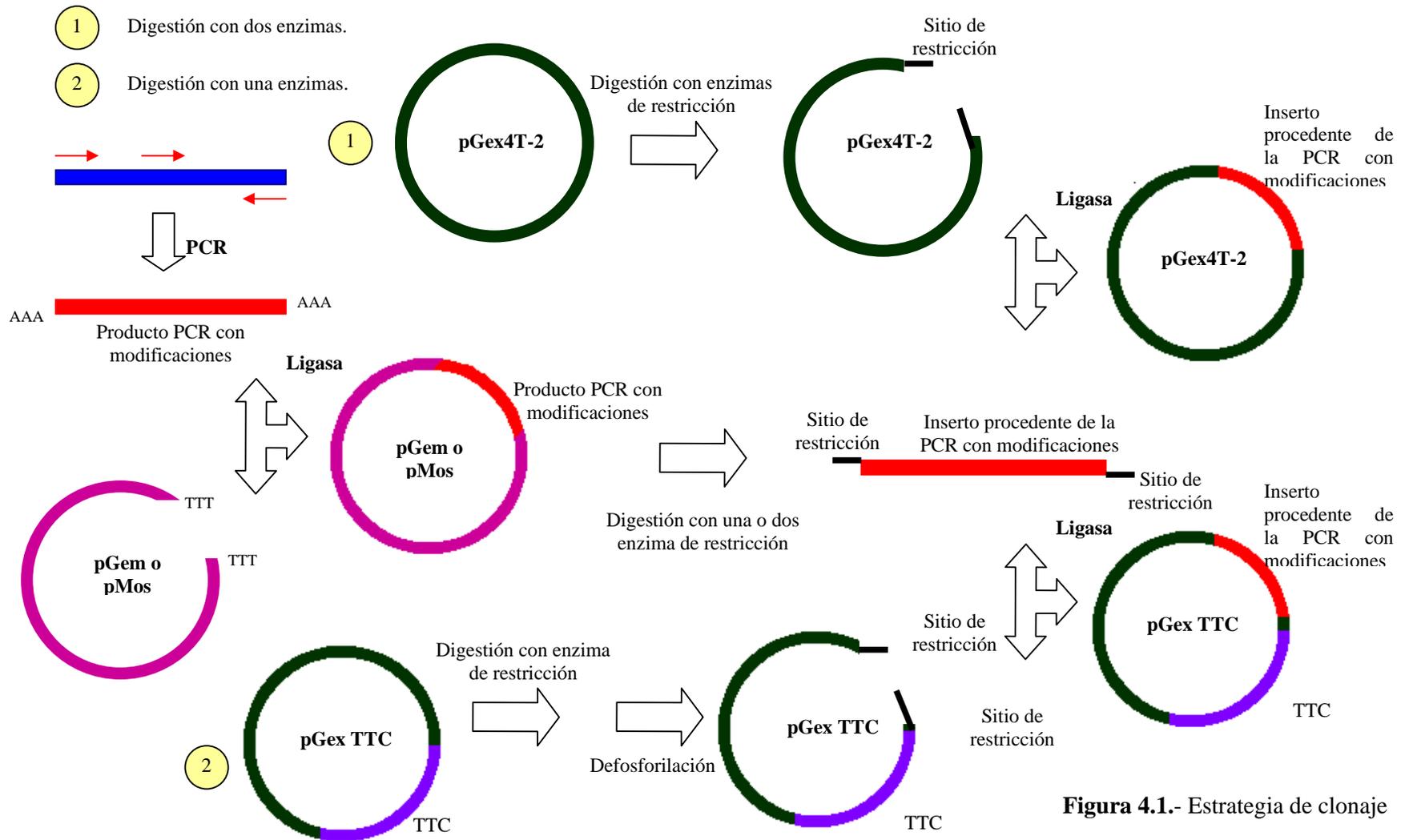


Figura 4.1.- Estrategia de clonaje

de GDNF proproteína en el vector pGex 4T-2. El plásmido final puede observarse en la **Figura 4.2.**

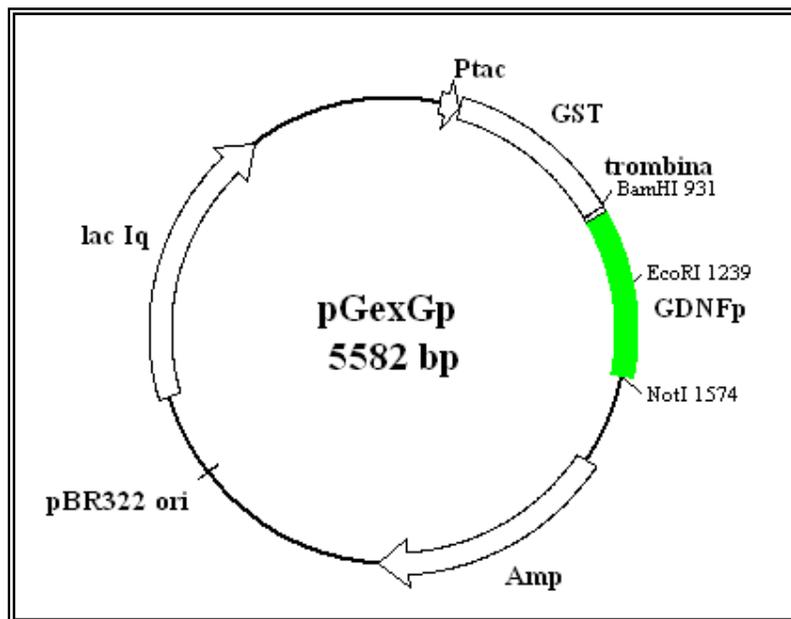


Figura 4.2.- Mapa de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de GDNF en forma de proproteína, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

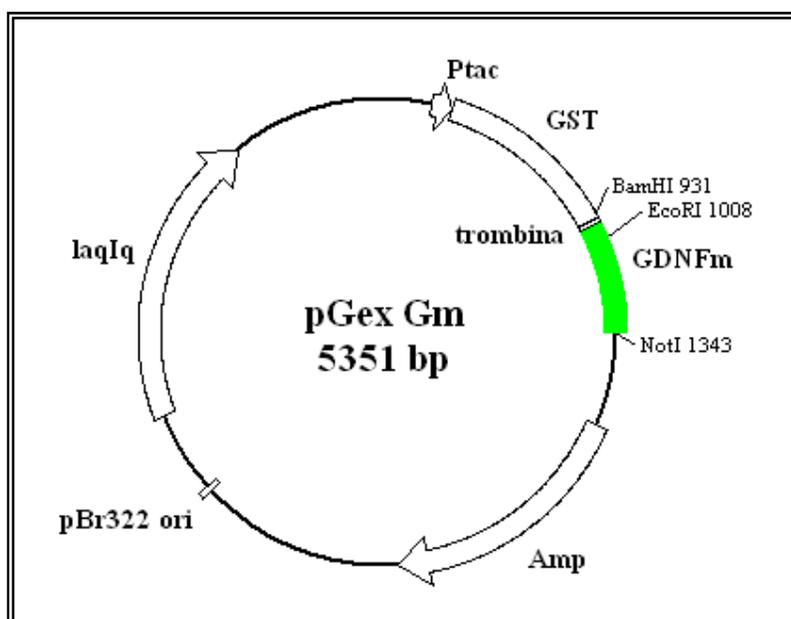


Figura 4.3.- Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de GDNF en forma madura, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

Similares resultados fueron obtenidos cuando se intentó clonar GDNF madura con GDNF 3 y GDNF4. Como en el caso anterior, GDNF4 fue sustituido por GDNFpas2. El plásmido final puede observarse en la **figura 4.3**.

4.1.2.2. FACTOR BDNF EN SUS FORMAS DE PROPROTEINA Y MADURA.

El clonaje de estas proteínas se realizó mediante la utilización de las enzimas restricción *BamHI* y *NotI*, tanto en pGem-T Easy como en pGex 4T-2. Los mapas genéticos de los plásmidos conteniendo BDNF proproteína y BDNF madura se observan en las **Figuras 4.4** y **4.5**, respectivamente.

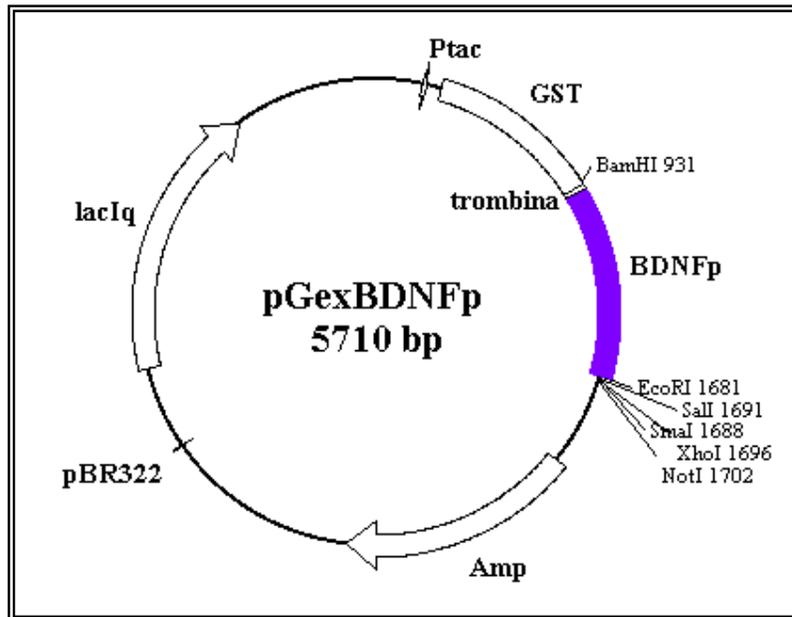


Figura 4.4.- Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de BDNF en forma de proproteína, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

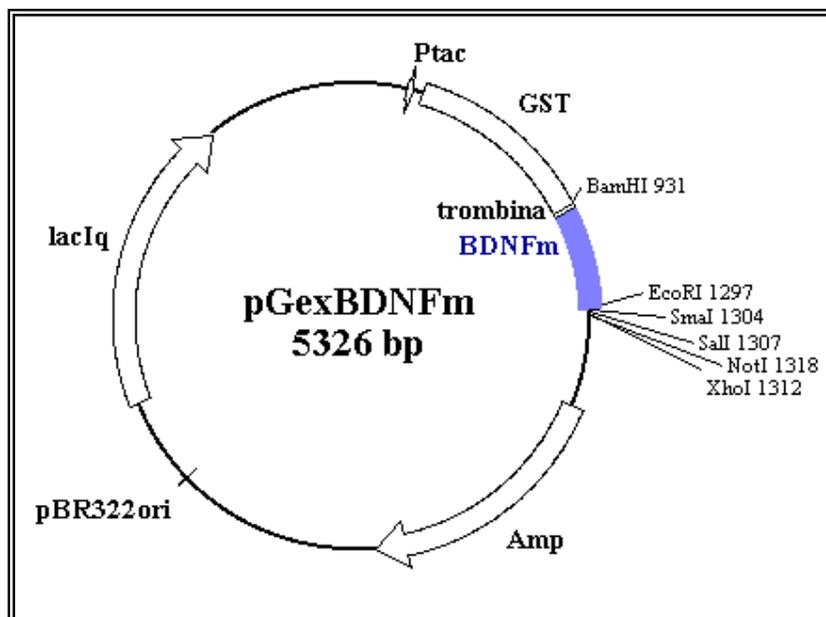


Figura 4.5.-Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de BDNF en forma madura, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

4.1.2.3. FACTOR GDNF EN SUS FORMAS DE PROPROTEÍNA Y MADURA FUSIONADO A TTC.

Tras la amplificación los fragmentos obtenidos de GDNF proproteína (GDNF 5 y GDNF R2) y GDNF madura (GDNF 3 y GDNF R2) para fusionar a TTC, se clonaron en el vector pGem y posteriormente en el vector pGex-TTC. Como en el caso anterior, la correcta dirección del inserto fue comprobada mediante boiling PCR. A pesar de utilizar solamente una enzima (*BamHI*), fue posible la obtención clones positivos, en una proporción de 1 colonia de cada 8 con el inserto en el adecuado marco de lectura, frente a 1 colonia de cada 12 con el inserto introducido en orientación inversa. No podemos explicar porque esta diferencia entre la utilización de pGex 4T-2 o pGex-TTC. Es posible que existan interacciones estéricas en el primer caso que eviten el clonaje en el correcto marco de lectura con un solo sitio de restricción, las cuales desaparezcan al estar presente la secuencia de TTC. Dicha secuencia podría aportar mayor longitud al vector donde se va a realizar la inserción, de forma que aporte a su vez mayor flexibilidad al mismo. Una vez seleccionados los clones positivos, se testaron los

plásmidos mediante digestión y fue comprobada la secuencia. Los mapas de los plásmidos pueden observarse en las Figuras 4.6. y 4.7.

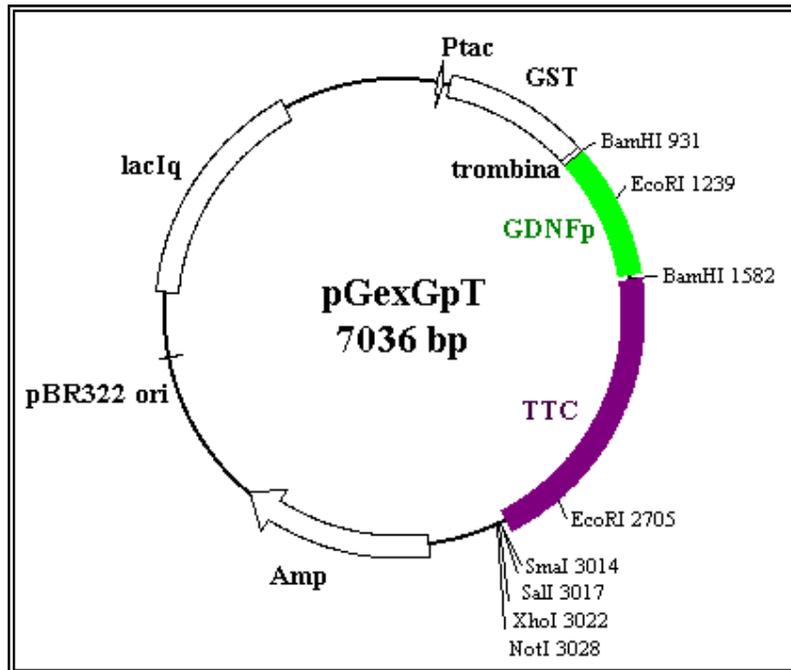


Figura 4.6.- Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de GDNF en forma de proproteína fusionado a TTC, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

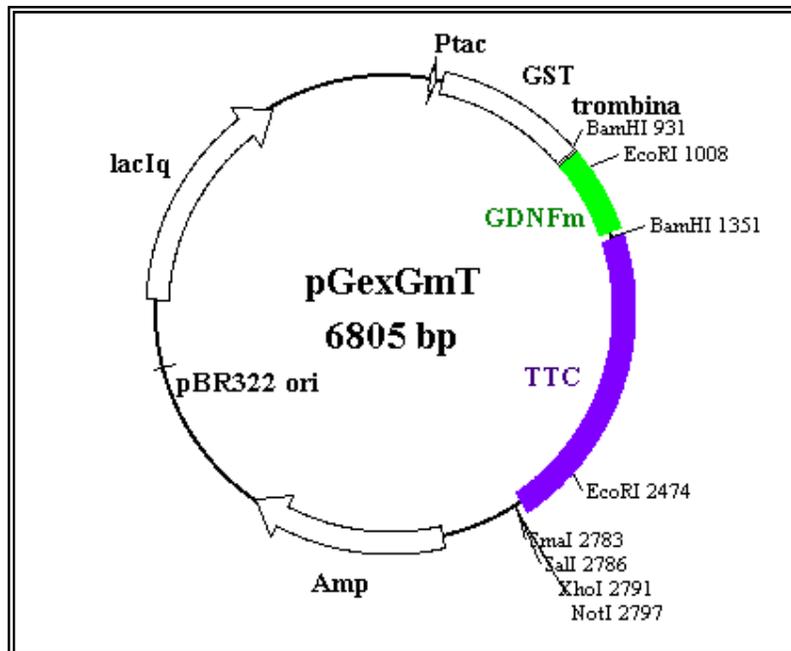


Figura 4.7.- Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de GDNF en forma madura fusionado a TTC, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

4.1.2.4. FACTOR BDNF EN SUS FORMAS DE PROPROTEINA Y MADURA FUSIONADO A TTC.

En este caso la estrategia realizada fue similar a la descrita en el apartado 4.1.3.3. Como en el caso del factor neurotrófico GDNF, en sus formas de proproteína y madura, la existencia de un solo sitio de restricción permitió un clonaje adecuado. De este modo se obtuvieron los mapas definitivos de estas construcciones que se pueden observar en las **figuras 4.8.** y **4.9.**

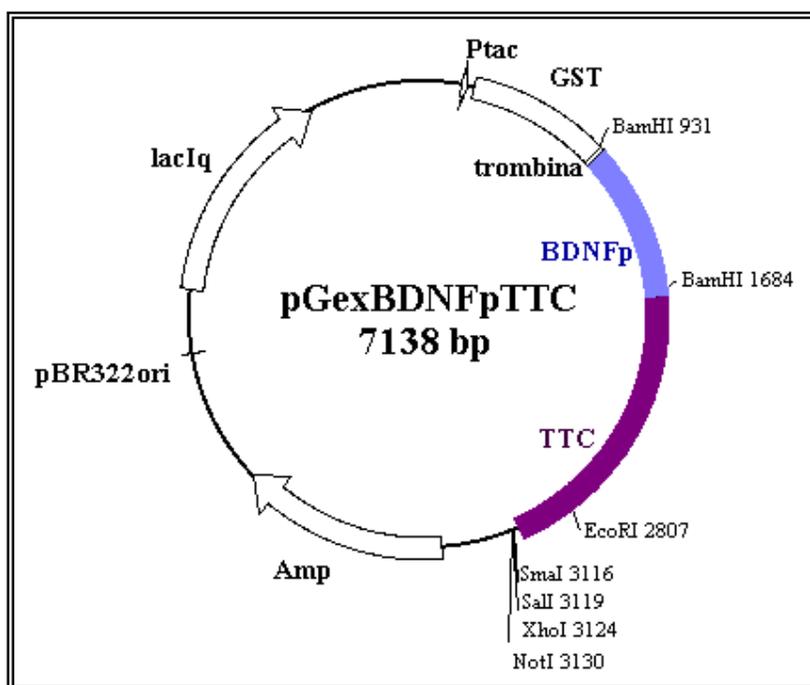


Figura 4.8.- Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de BDNF en forma de proproteína fusionado a TTC, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

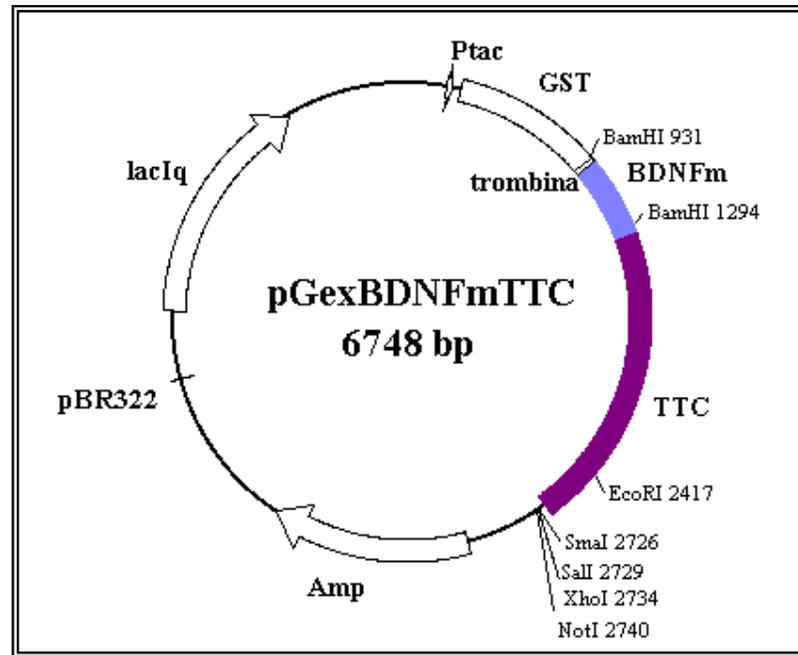


Figura 4.9.- Carta de restricción de la construcción genética conteniendo el cDNA de BDNF en forma madura fusionado a TTC, en el vector de expresión procariota pGex 4T-2.

Por último en la **Figura 4.10.** puede observarse la imagen de las distintas construcciones al digerirse con las enzimas *BamHI* y *NotI*. Estas enzimas de restricción sueltan el inserto de los plásmidos. En el caso de las proteínas de función, ambas partes (neurotróficos y TTC) son separadas.

Finalmente, y como comprobación final, se secuenciaron los clones positivos, comprobando la correcta inserción en el marco de lectura necesario para su posterior traducción, tal y como ha sido descrito en el apartado de material y metodos.

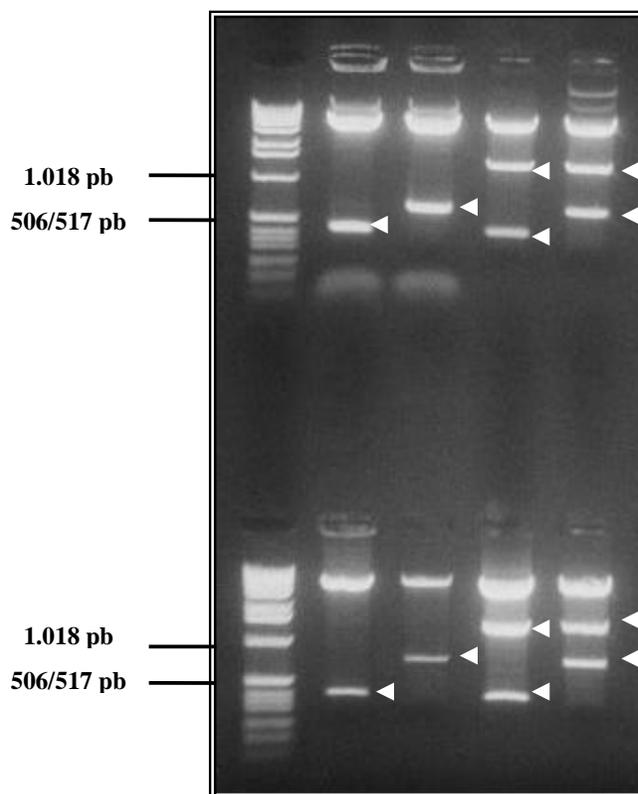


Figura 4.10.- **1** : pGex GDNF (381 pb); **2** : pGex GDNF proproteína (612 pb); **3** : pGex GDNF madura – TTC (381 pb GDNFm y 1472 pb TTC); **4** : pGex GDNF proproteína- TTC (612 pb GDNFp y 1472 pb TTC); **5** : pGex BDNF madura (356 pb); **6** : pGex BDNF proproteína (740 pb); **7** : pGex BDNF madura-TTC (356 pb BDNFm y 1472 pb TTC); **8** : pGex BDNF proproteína-TTC (740 pb BDNFp y 1472 pb TTC), **M** :Marcador de talla 1 Kb.

4.2. PURIFICACION DE PROTEINAS RECOMBINANTES.

Antes de pasar a la exposición particular de cada una de las proteínas obtenidas, realizaremos una descripción general de la puesta a punto de la extracción.

4.2.1. PUESTA A PUNTO DE LA EXTRACCION PROTEICA.

Para la optimización de la extracción de proteínas recombinantes, en nuestro laboratorio, fue utilizada la proteína β -galactosidasa fusionada a TTC (pGex-LacZ-TTC) (Coen y cols. 1997). Dicha proteína preenta la característica de

su fácil detección por una reacción enzimática que es indicativa de su integridad. Característica que permite comprobar de forma sencilla, el efecto sobre la proteína recombinante de los distintos tratamientos realizados. Con el fin de aumentar la cantidad de proteína producida se realizaron distintas pruebas que detallaremos a continuación.

Las condiciones de inducción del cultivo bacteriano fueron las descritas por la casa comercial. Existen trabajos que demuestran para el caso de GDNF en vectores de fusión a Glutathion-S-Transferasa, que al variar dichas condiciones, no existen mejoras en la producción (Liew y cols. 1997).

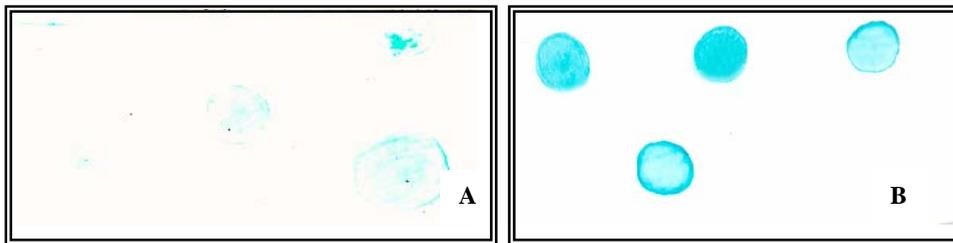


Figura 4.11.- Actividad de la proteína β -galactosidasa (color azul) tras la extracción de LacZ-TTC obtenida con distintos tiempos de sonicación **A**: pulsos de 5 minutos donde se observa poca actividad enzimática; **B**: pulsos de 10 segundos con mayor actividad enzimática.

La ruptura de las bacterias mediante ultrasonidos fue el primero de los parámetros tratados. Como se ha descrito en el apartado material y métodos, dos condiciones fueron utilizadas variando el tiempo de la duración del pulso, desde minutos a segundos. Queríamos comprobar si un mayor tiempo implicaba una mayor ruptura bacteriana y un aumento en la producción de proteína recombinante activa. Sin embargo, tal y como se observa en la **Figura 4.11**, la actividad enzimática de la proteína recombinante LacZ-TTC fue muy superior en el caso de la aplicación de ultrasonidos con menor tiempo. La pérdida de actividad puede ser atribuida a la desnaturalización de la proteína tras el calentamiento de la muestra. Por tanto, se determinó el método de sonicación como tres pulsos de 10 segundos de ultrasonidos, seguido de una incubación en hielo durante 30 segundos para el enfriamiento de la muestra.

Durante el proceso de extracción se observaron diferencias en la eficacia de la extracción dependiendo de la temperatura utilizada en el proceso de digestión con trombina, tras la cromatografía de afinidad. Las condiciones escogidas por su mayor rendimiento fueron una primera digestión a temperatura ambiente durante 5 horas, y tras recoger el sobrenadante, una segunda proteólisis a 4 °C durante toda la noche.

Se realizó también una comparación entre las proteínas obtenidas por ultrasonidos y French-Press, para conocer la eficacia en la ruptura bacteriana de ambos métodos. Así como en el caso de la producción de la proteína LacZ-TTC, la utilización de French-Press incrementaba en gran medida la producción frente a los ultrasonidos, no ocurrió lo mismo en el caso de los factores neurotróficos y sus fusiones a TTC. Una de las posibles causas podrá ser que el tamaño de LacZ-TTC (150 kDa) dificulte su obtención mediante ultrasonidos, frente a un método por presión, no siendo el caso de las proteínas estudiadas en el presente trabajo, donde las mayores tallas esperadas son de 80 kDa.

Una vez puesto a punto el protocolo a utilizar mediante ultrasonidos, se procedió a la producción y purificación de las distintas proteínas de interés: GDNF madura, GDNF madura-TTC, GDNF proproteína, GDNF proproteína-TTC, BDNF madura, BDNF madura-TTC, BDNF proproteína y BDNF proproteína-TTC.

4.2.1.1. CONCENTRACION DE LA PROTEINA

El incremento de la concentración de la proteína fue realizado mediante filtración. Los factores estudiados fueron: los distintos tamaños de poro de las membranas de filtración, el tiempo y velocidad de centrifugación.

Debido al tamaño de las proteínas, el estudio fue realizado en dos grupos, proteínas conteniendo los factores neurotróficos exclusivamente (15-30 kDa), y proteínas conteniendo los factores neurotróficos fusionados al fragmento C de la toxina tetánica (70-80 kDa).

Para el primer bloque (tallas entre 15 y 30 kDa) se utilizaron en un primer momento centricones de tamaño de poro de 10 y 3 kDa. Es decir, todas las proteínas mayores de esta talla quedarían en la solución recogida. A pesar de la variación de tiempo de centrifugación (60 a 30 minutos) y de velocidad (8.000 r.p.m. hasta 5.000 r.p.m.), no se observó una concentración adecuada. Una explicación de este hecho, es que las proteínas queden adheridas en la membrana del centricon. Otro problema era que la presencia de proteínas bacterianas por el tamaño de poro pequeño dificultase la recogida de proteína recombinante.

Ante estos resultados y en el caso de proteínas de tamaño de 30 kDa, se planteó la utilización de un tamaño de poro mayor (50 kDa). A pesar de que parte de la proteína se perdería, se pretendió impedir la concentración de las impurezas. Desgraciadamente, a pesar de que las impurezas desaparecían, no se obtuvo una mayor concentración de la proteína de interés lo que nos hacía sospechar de nuevo que la proteína quedase adherida a la membrana.

Similares resultados fueron obtenidos con las proteínas fusionadas a TTC (70 kDa). Como en el caso anterior, cuando utilizábamos un tamaño de poro de 50 kDa, existía gran cantidad de impurezas, además de una falta de concentración de la proteína de interés (**Figura 4.12.**). En el caso de la utilización del Centricon-100, tampoco se observaba un incremento en la concentración.

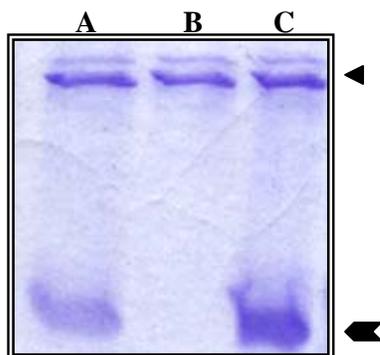


Figura 4.12.- Concentración de GmT con centricon 50. **A:** proteínas purificadas previa a concentración. **B:** proteínas eliminadas tras la concentración con Centricon 50. **C:** proteínas concentradas. ◀ Proteína recombinante GmT, ◀ Impurezas de proteínas bacterianas

Nuestros resultados coinciden con otros estudios donde se ha descrito que los sistemas de concentración mediante filtración, muestran una curva de adsorción por parte de la membrana correspondiente (Menguy y cols. 1998). Por otra parte, se ha observado que tamaños superiores al tamaño molecular de la proteína hacen que no sea retenida, mientras que tamaños inferiores promueven la concentración de otras proteínas bacterianas acompañantes, que no son de interés.

Para solucionar el problema de adhesión a la membrana, se decidió aplicar un tratamiento a los distintos centricones con Tween 20 al 5%. Dicho tratamiento resultó efectivo como podemos comprobar en la **Figura 4.13.** concentrando la proteína recombinante, y sin acumular las impurezas.

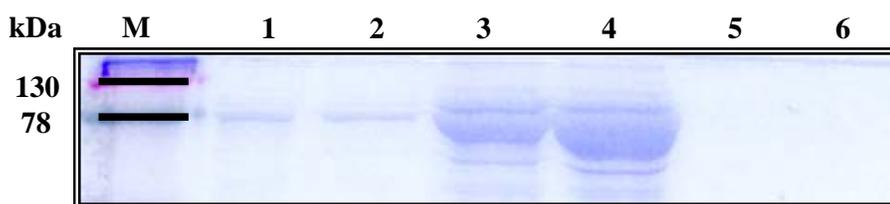


Figura 4.13.- Proteínas recombinantes concentradas con centricon 50 tras tratamiento con Tween 20. **1:** GmT obtenido; **2:** BmT obtenido; **3:** GmT concentrado; **4:** BmT concentrado; **5:** eliminado de filtrado GmT; **6:** eliminado de filtrado BmT; **M:** Marcador de talla.

4.2.1.2. CUANTIFICACION DE LA PROTEINA

Como ha sido descrito, para la cuantificación de las proteínas recombinantes extraídas se utilizaron el método Bradford y el método BSA. Sin embargo, debido al riesgo de que en las extracciones proteicas obtenidas se observase la presencia de impurezas bacterianas, se consideró la posibilidad de utilizar otro método que permitiese la visualización de la banda de interés. Así se realizó la estimación por comparación visual de las bandas obtenidas de las proteínas recombinantes con una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en geles teñidos con Coomassie. Un ejemplo de una recta patrón de BSA en geles de Coomassie puede observarse en la **Figura 4.14.**

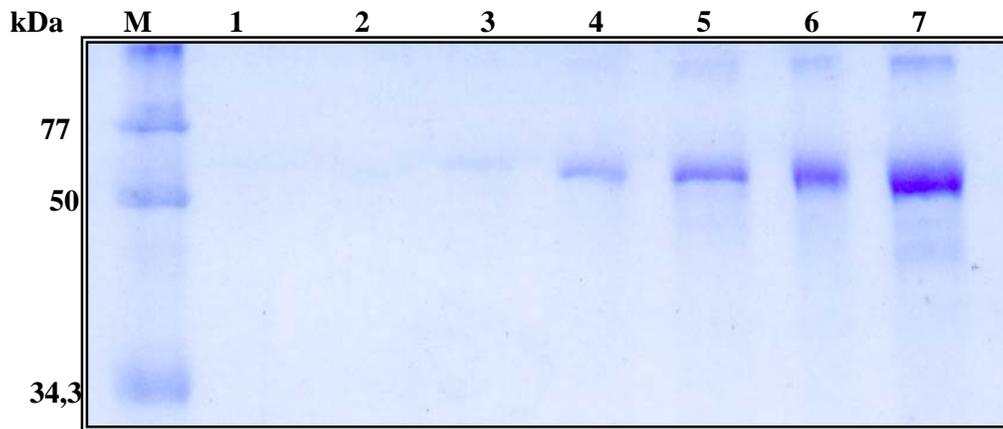


Figura 4.14.- Gel teñido con azul de Coomassie. **1:** 1ng/μl de BSA; **2 :** 5ng/μl de BSA; **3 :** 10 ng/μl de BSA; **4 :** 50 ng/μl de BSA; **5 :** 100 ng/μl de BSA; **6 :** 500 ng/μl de BSA; **7 :** 1 μg/μl de BSA; **M:** marcador de talla.

4.2.1.3. PRODUCCION DEL ANTICUERPO CONTRA TTC

Debido a que el único anticuerpo para el fragmento C de la toxina tetánica disponible en casas comerciales era de muy mala calidad, se planteó la producción de uno nuevo. Para ello, se estudió en colaboración con la compañía Eurogentec la secuencia aminoacídica del fragmento C de la toxina teánica, observando los posibles epítomos que presenta. La proteína presentaba cuatro epítomos interesantes:

aa_x 449-453: CDWYFVPTDEGWTND-COOH

aa_x 241-256: CKALNPKEIEKLYTSY-CONH₂

aa_x 218-232: ITLKLDRCNNNNQYV+ C

aa_x 397-411: KTYSVQLKLYDDKNA+ C

El protocolo propuesto consistía en una doble inmunización. Los dos epítomos que se decidieron utilizar fueron:

aa_x 449-453: CDWYFVPTDEGWTND-COOH

(correspondía a la parte C-terminal del fragmento C)

aa_x 218-232: ITLKLDRCNNNNQYV+ C

(correspondía a la parte N-terminal del fragmento C)

Se sintetizaron dichos péptidos y se comprobaron mediante cromatografía líquida (HPLC). Posteriormente, se inmunizaron dos conejos con estos péptidos, recogiendo los sueros a tiempos de una semana, un mes y tres meses. Los anticuerpos obtenidos se denominaron SP48 y SP49.

4.2.2 .PROTEINAS RECOMBINANTES OBTENIDAS.

En este capítulo, mostraremos las proteínas recombinantes obtenidas, describiéndose al mismo tiempo cada neurotrófico y su fusión.

4.2.2.1. GDNF MADURA Y GDNF MADURA – TTC

Los pesos moleculares indicaron de las proteínas obtenidas fueron los esperados, para GDNF madura, el peso molecular de 15 kDa descrito en la literatura (Lin y cols. 1994), y para TTC, un peso molecular de 50 kDa (Schiavo y cols. 1990). La fusión de GDNF madura a TTC, tal y como se esperaba presentó una talla de 70 kDa (**Figura 4.15.**)

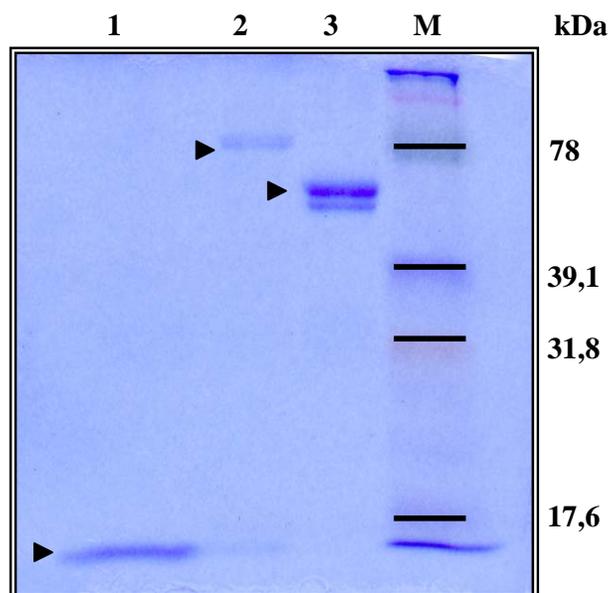


Figura 4.15.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante tinción con azul de Coomassie en gel de acrilamida. **1:** Gm; **2:** GmT; **3:** TTC; **M:** marcador de talla.

La proteína GDNF fue identificada mediante anticuerpos: uno realizado en conejo y otro en pollo. Se observó, que si bien el anticuerpo producido en pollo era menos sensible en la detección, resultaba más específico que el de conejo.

Como puede observarse en la **figura 4.16.** tanto el factor neurotrófico, como su fusión, reaccionan específicamente con el anticuerpo. Como era de esperar, los controles negativos, TTC y la albúmina sérica bovina, no dieron ninguna señal. El control, GDNF recombinante comercial, dio la señal esperada. En GDNF maduro obtenida con pGex4T-2, podemos observar una señal a una talla de 30 kDa, la cual también es encontrada por otros autores, y que se ha propuesto podría corresponder al dímero de la molécula (Lin y cols. 1993; Lin y cols. 1994).

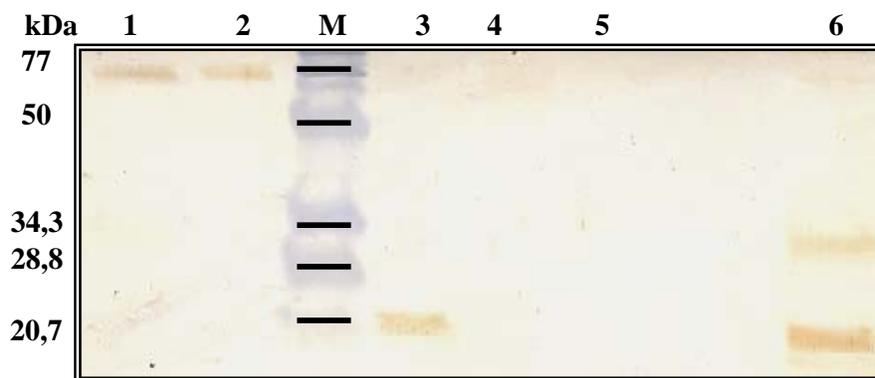


Figura 4.16.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra GDNF, revelado con ABC-peroxidasa. **1** y **2:** GmT; **3:** GDNF madura comercial; **4:** TTC; **5:** BSA; **6:** Gm; **M:** marcador de talla

También se realizó la identificación mediante anticuerpos del fragmento C de la toxina tetánica (**Figura 4.17.**). Los dos anticuerpos fueron utilizados (SP48 y SP49) observando para ambos resultados similares. Como puede observarse en la **Figura 4.17.**, en el caso del fragmento C la proteína presenta la talla esperada (50 kDa). Cuando se realizaba la detección de la proteína de fusión GDNF madura-TTC, además de la proteína de la talla esperada de 70 kDa, aparecen otras bandas de menor talla. Se considera que una falta de especificidad del anticuerpo podría explicar la banda de 34,3 kDa, ya que también aparece en TTC. Sin embargo, la banda de 50 kDa podría corresponder con la talla del fragmento C, la cual podría

ser obtenida por un proceso de degradación en el punto de unión de las dos moléculas, tal y como ha sido descrito para LacZ-TTC (Coen y cols. 1997).

La doble banda observada en la talla de 50 kDa en el caso de TTC, repetida para la proteína de fusión, ha sido descrita por otros autores para este fragmento, y parece ser causada por la presencia de puentes disulfuro (Helting y Zwisler 1977).

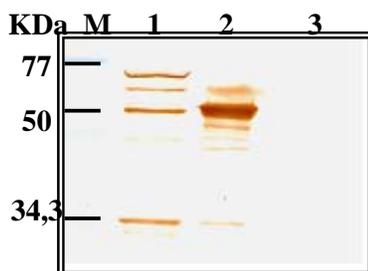


Figura 4.17.-Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra TTC (SP48), revelado con ABC-peroxidasa. **1:** GmT; **2:** TTC; **3:** Gm; **M:** marcador de talla.

Respecto a la cantidad de proteína obtenida, se obtuvieron 500 μ l. de solución, conteniendo las proteínas a una concentración de 30 μ g /ml para GDNF madura y de 10 μ g / ml. para GDNF madura-TTC. Como puede observarse, la eficacia del método no es alta. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros autores que observan producciones similares. La explicación de la baja eficacia (independientemente del plásmido y estrategias utilizadas) es la formación de cuerpos de inclusión (Liew y cols. 1997). Estos cuerpos se ven disminuidos cuando la proteína producida es de naturaleza bacteriana, como es el caso de la purificación del fragmento C de la toxina tetánica.

Este hecho se agrava cuando GDNF se encuentra fusionado a TTC. Una posible explicación de esta disminución, puede ser el aumento de tamaño de la proteína, tal y como ha sido descrito para LacZ-TTC (Coen y cols. 1997).

4.2.2.2. BDNF MADURA Y BDNF MADURA – TTC

Los pesos moleculares, de las proteínas obtenidas, fueron los descritos en la literatura, tanto en el caso de la proteína recombinante BDNF (Leibrock y cols. 1989) como de la proteína TTC (Schiavo y cols. 1990). En el caso de la fusión de la proteína BDNF madura con el TTC, se obtuvo la talla esperada de unos 70 kDa (**Figura 4.18.**).

Se realizaron Western Blotting para la identificación de las proteínas obtenidas donde se utilizaron anticuerpos producidos en pollo y en conejo contra las proteínas con BDNF, así como los anticuerpos contra TTC anteriormente mencionados.

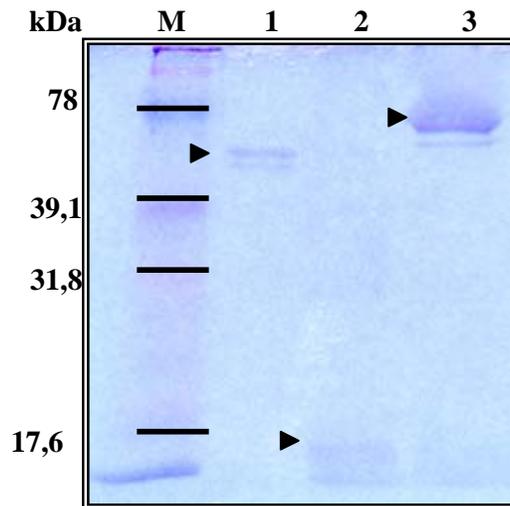


Figura 4.18.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante tinción con azul de Coomassie en gel de acrilamida. **1:** TTC; **2:** Bm; **3:** BmT; **M:** marcador de talla.

Para la identificación de la proteína BDNF, el anticuerpo producido en conejo mostró mejores condiciones tanto de sensibilidad, como de especificidad frente al de pollo.

Se puede observar como la proteína recombinante BDNF madura, muestra la talla adecuada y es identificada por el anticuerpo para la misma (**Figura 4.19.**). No se observó marcaje en el caso de la proteína TTC, ya que no presenta epítomos

para el anticuerpo. En el caso de la proteína de fusión entre BDNF madura y TTC es reconocida por el anticuerpo a la talla esperada (alrededor de 70 kDa).

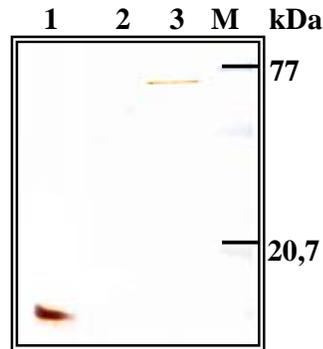


Figura 4.19.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra BDNF, revelado con ABC-peroxidasa. **1:** Bm; **2:** TTC; **3:** BmT; **M:** marcador de talla.

Del mismo modo que en el apartado anterior, se realizó la identificación del fragmento C de la toxina tetánica (**Figura 4.20.**). De nuevo, se utilizaron los dos anticuerpos (SP48 y SP49) observando también resultados similares para ambos. En el caso del fragmento C en solitario, se observa la proteína de la talla esperada (50 kDa). Cuando realizamos la detección de la proteína de fusión BDNF madura-TTC, observamos diferentes bandas. Además de la banda esperada de 70 kDa, se repite como en el caso de GDNF madura-TTC las bandas a 34,3 kDa y 50 kDa. Dichas bandas, como se ha comentado, podrían ser debidas a procesos de degradación o a la inespecificidad del anticuerpo. Como era de esperar, en el caso de la proteína BDNF madura en solitario no se observa la presencia de ninguna banda.

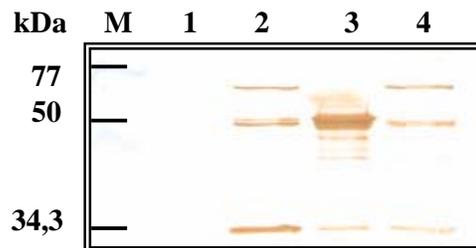


Figura 4.20.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra TTC (SP48), revelado con ABC-peroxidasa. **1:** Bm; **2:** BmT; **3:** TTC; **4:** BmT; **M:** marcador de talla.

Las cantidades de proteína obtenida fueron similares al caso anterior, 500 μ l. de solución, conteniendo las proteínas a una concentración de 30 μ g /ml para BDNF madura y de 10 μ g / ml. para BDNF madura-TTC.

4.2.2.3. GDNF PROPROTEINA Y GDNF PROPROTEINA – TTC

Del mismo modo que se produjeron las proteínas recombinantes conteniendo los factores neurotróficos en su forma madura, se procedió a la extracción de los factores neurotróficos en su forma de proproteína.

En la purificación de las formas de proproteínas se encontraron mayores dificultades que la de las formas maduras. Como puede observarse en la **Figura 4.21.**, la proteína esperada a la talla adecuada (30 kDa) mostró muy baja concentración (no observable en el gel teñido con Coomassie ni con plata). Para su observación fue necesaria la realización de western blotting (**Figura 4.22.**).

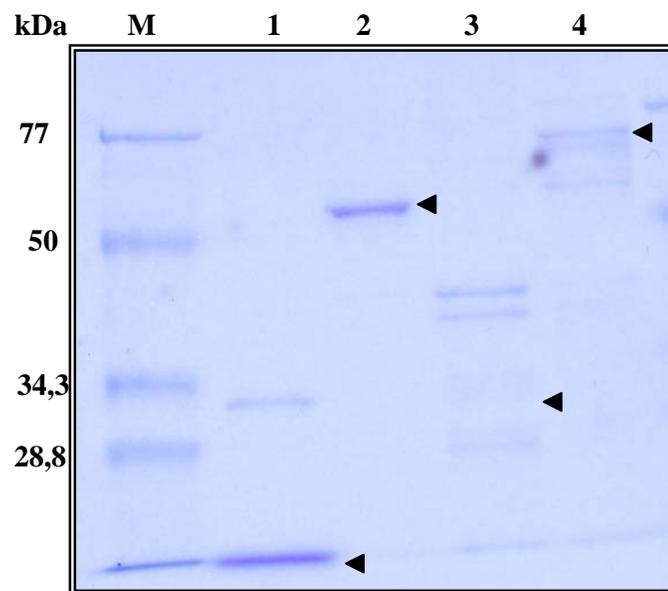


Figura 4.21.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante tinción con azul de Coomassie en gel de acrilamida. **1:** Gm; **2:** TTC; **3:** Gp; **4:** GmT; **M:** marcador de talla.

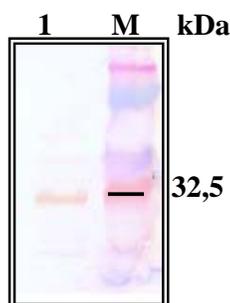


Figura 4.22.-Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra GDNF, revelado con ABC-peroxidasa. **1:** Gp; **M:** marcador de talla.

Como en el caso de las proteínas maduras, la baja expresión de la proteína proGDNF, puede deberse a la formación de cuerpos de inclusión, quizás aumentada por la presencia del propéptido. Por una parte, la proteína presentará mayor tamaño. Por otra, los nuevos aminoácidos presentes, pueden generar nuevos sitios de interacción que induzcan a la formación de estos cuerpos.

Ambos efectos se verían incrementados al fusionar la proproteína a TTC. Efectivamente, no fue posible el aislamiento de la proGDNF-TTC en el sistema pGex4T-2.

4.2.2.4. BDNF PROPROTEINA Y BDNF PROPROTEINA – TTC

Los resultados obtenidos, respecto a la cantidad de proteína obtenida, fueron similares a los obtenidos con las formas correspondientes en GDNF. En las purificaciones observadas en geles teñidos con azul de Coomassie, no se observa una banda prioritaria de la proteína BDNF proproteína obtenida (**Figura 4.23.**).

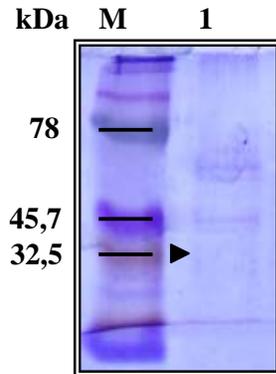


Figura 4.23.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante tinción con azul de Coomassie en gel de acrilamida. **1:** Gp; **M:** marcador de talla.

Tras la identificación de la proteína mediante western blotting (**Figura 4.24.**), sorprendentemente, la banda que reaccionó en este caso no fue la correspondiente a los 30 kDa esperados, sino una talla superior (60 kDa). Esto podría explicarse por la interacción de la proteína esperada con algún resto bacteriano, que la hace presentar un tamaño mayor, o por la formación de dímeros de la molécula.

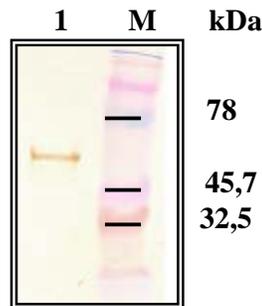


Figura 4.24.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra BDNF, revelado con ABC-peroxidasa. **1:** Bp; **M:** marcador de talla.

Como en el caso anterior, la proteína de fusión entre BDNF proproteína fusionada a TTC no pudo ser obtenida.

Además de estas dificultades en la extracción de las formas de proproteínas y sus fusiones, en el momento de la purificación, fue publicada la revisión por Moses V. Chao donde describía una nueva propiedad de las formas

proteínas de los factores neurotróficos (Chao y Bothwell 2002). En dicha revisión, se señala la capacidad de estas formas de los factores neurotróficos, hasta entonces desconocida, de activar el receptor p75NTR, y por tanto de inducir a apoptosis celular (Lee y cols. 2001). Debido a que el objetivo del presente trabajo es la búsqueda de moléculas con características antiapoptóticas, se decidió la paralización de la producción de estas formas de las proproteínas. No obstante dichas moléculas podrán ser estudiadas en un futuro para nuevas aplicaciones.

Además, como se ha explicado al principio del capítulo 4.1., el mayor interés de las formas de proproteínas de los factores neurotróficos, era su utilización en un futuro en vectores de DNA desnudo. Tal y como hemos expuesto, las proteínas de fusión a TTC están ya secuenciadas en el correcto marco de lectura y posteriores estudios serán realizados.

4.3. ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS DE FUSION (BDNF-TTC Y GDNF-TTC).

Para comprobar el mantenimiento de la funcionalidad de los factores neurotróficos fusionados al fragmento C de la toxina tetánica, se realizaron distintas pruebas que se describen a continuación. Por otra parte, la funcionalidad del fragmento C de la toxina tetánica, es decir el estudio de su transporte retrógrado a las motoneuronas, también fue abordada.

4.3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CASPASA 3

En el apartado de revisión bibliográfica se ha demostrado el importante papel que las caspasas 1 y 3 juegan en la enfermedad de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Se ha sugerido que la inhibición de su actividad podría ser una de las vías en el posible tratamiento de esta enfermedad (Li y cols. 2000). Por otra parte, la inhibición de estas caspasas por adición de los factores neurotróficos (BDNF, GDNF, CNTF, etc.) ha sido descrita. Parece demostrado que su inhibición por los factores neurotróficos se lleva a cabo por la activación de la ruta de los miembros

de la familia IAP/ITA, inhibidores a su vez de la activación de la caspasa 9 y por tanto de las caspasas 3, 6 y 7 (Sendtner y cols. 2000). Debido a estos hechos, se propuso demostrar que las proteínas de fusión inhibían la actividad de la caspasa-3 en cultivos neuronales.

Ante estos antecedentes, se planteó el observar el efecto de las proteínas de fusión en la actividad caspasa-3 sobre cultivos celulares. En un primer momento, cultivos primarios de médula espinal de ratones fetales fueron utilizados.

Por otra parte, había sido demostrado que, en cultivos similares en pollo, la adición de trombina provocaba muerte celular programada y activación de caspasa-3 (Turgeon y Houenou 1999). Se realizaron experiencias que validaran un modelo de apoptosis neuronal en cultivos primarios.

Sobre cultivos sin adicionar trombina no se observó disminución en la actividad caspasa-3 cuando fueron incubados con BmT o GmT durante 48 horas. Tampoco se observaron diferencias al inducir apoptosis mediante la utilización de trombina.

Para explicar este resultado se procedió a la caracterización de dichos cultivos primarios. Se realizaron inmunocitoquímicas de los cultivos con una batería de diversos anticuerpos característicos de distintas poblaciones neuronales. Se observó que los cultivos se encontraban enriquecidos en astrocitos, frente a una pobre población de motoneuronas y neuronas colinérgicas como puede verse en la **Figura 4.25**. Las experiencias realizadas en pollo eran cultivos enriquecidos en motoneuronas (Turgeon y Houenou 1999).

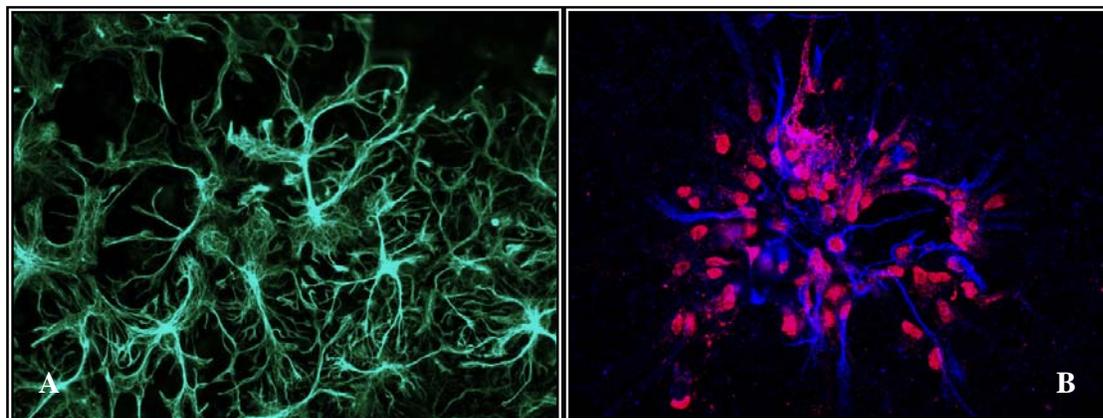


Figura 4.25. Inmunicitoquímica sobre cultivos primarios de médula espinal de ratones fetales. **A:** anticuerpo GFAP, identificación de astrocitos (color verde); **B:** anticuerpos Chat, identificación de neuronas colinérgicas (color azul) y neun, marcador específico de nucleos (color rojo).

Como puede apreciarse en la **Figura 4.25.** los cultivos obtenidos se encontraban muy enriquecidos en astrocitos. Una posible explicación, para la falta de efecto tanto de las proteínas de fusión como de la trombina, sería que estas células secreten alguna, o varias proteínas que inhiban la acción de los mismos.

Ante esta posibilidad se busco un nuevo modelo *in vitro*, la línea celular Neuro 2A, derivada de un neuroblastoma de ratón. La actuación de la trombina sobre ésta línea celular había sido ya demostrada (Sarker y cols. 1999). Por otra parte, estas células muestran receptores para algunos factores neurotróficos (NGF, BDNF y NT-3) induciendo la supervivencia, diferenciación morfológica y estimulación de la misma (Blanco y cols. 2001).

Se procedió a la inducción de procesos apoptóticos en dicha línea celular mediante la adición de 150 unidades de trombina por mililitro de cultivo. Ha sido descrito que dicha dosis disminuye la viabilidad celular de la línea (Sarker y cols. 1999). Sin embargo, tras adicionar esa dosis, la actividad caspasa-3 en los extractos proteicos de los cultivos fue nula. Tras la visualización de los pocillos mediante un microscopio invertido, se apreció como todas las células se encontraban sueltas en el medio de cultivo, lo que indicaba la muerte de las mismas. Por tanto, estaba justificada la ausencia de actividad caspásica en los extractos celulares observados.

Se había comprobado que al adicionar la trombina se producía el efecto sobre la viabilidad celular descrito por Sarker y cols, en 1999. Sin embargo, dicho efecto conlleva una gran muerte celular, la cual no permite diferenciar los estadios apoptóticos, objeto de estudio (activación de caspasa-3). Se consideró que una disminución en dicha dosis, afectaría a la viabilidad, sin producir la muerte masiva de las mismas. La dosis elegida, correspondía a la utilizada en la línea NSC19 y que producía un aumento en la actividad caspasa-3 (Smirnova y cols. 1998). Dicha dosis fue de 6 unidades/ml de cultivo.

La medida de la actividad fue realizada durante las dos primeras horas de incubación a 37 °C en presencia del reactivo. A partir de este tiempo se establece una meseta donde no es posible observar diferencias entre ninguna de las muestras. Una vez obtenidas las medidas de fluorescencia, antes de analizar los datos, éstos fueron corregidos para la fluorescencia endógena del buffer y la cantidad total de proteína en cada pocillo.

Se observaron diferencias en la actividad de la caspasa 3 en todos los tiempos estudiados. Las tendencias fueron similares, llegando a ser significativas en la adquisición tomada a los 60 minutos. En la **Tabla 4.1.** podemos observar las medias de los datos obtenidos de la adquisición de la fluorescencia, junto a sus desviaciones estándar. Estos datos se representan gráficamente en la **Figura 4.26.**

Tiempo (minutos)	Neuro 2A (n=3)	Neuro 2A + trombin (n=3)
30	0,08 ± 0,04	0,13 ± 0,05
60	0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,04
90	0,19 ± 0,09	0,24 ± 0,02
120	0,22 ± 0,08	0,23 ± 0,03

Tabla 4.1.- Media y desviación típica de la medida de la actividad caspasa 3 a distintos tiempos de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2A. La medida fue realizada en cultivos sin degenerar o sometidos a degeneración mediante la adición de 100 nM de trombina durante 48 horas.

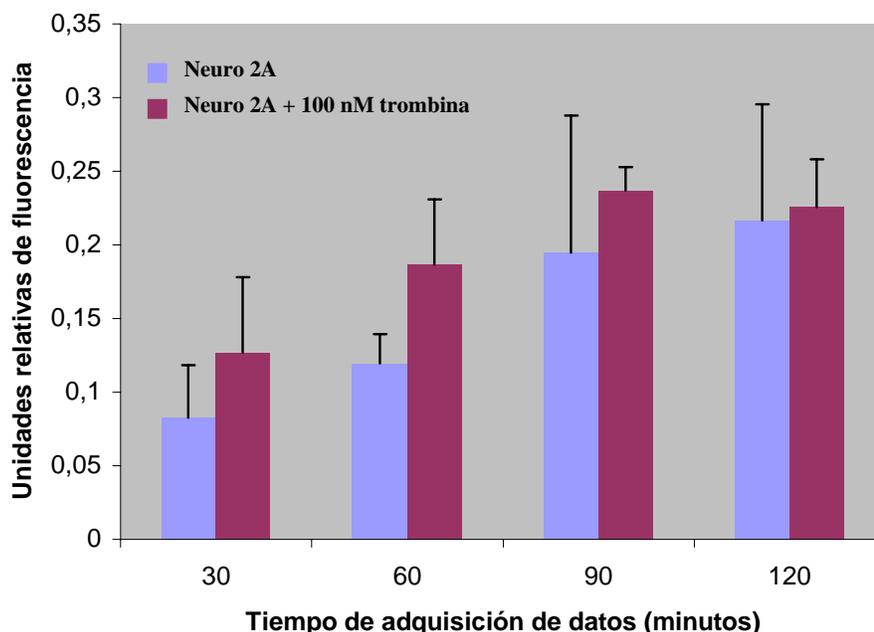


Figura 4.26.- Representación gráfica de la medida de la actividad caspasa 3 a distintos tiempos de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2A(n=3). La medida fue realizada en cultivos sin degenerar o sometidos a degeneración mediante la adición de 100 nM de trombina durante 48 horas.

Una vez validado nuestro modelo *in vitro*, se realizó la adición de las proteínas de fusión sobre los cultivos de Neuro2A, con y sin trombina. La medida de la actividad caspasa-3 fue realizada a las 48 horas.

Tras adicionar las proteínas problema, los resultados obtenidos en el caso de los cultivos celulares sin trombina son los mostrados en la **Tabla 4.2**. Su representación gráfica se puede observar en la **Figura 4.27**.

Tiempo (minutos)	Neuro2A (n=3)	Neuro2A+ BmT (n=3)	Neuro2A+ GmT (n=3)
30	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,06	0,05 ± 0,02
60	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,09 ± 0,04
90	0,19 ± 0,09	0,18 ± 0,04	0,13 ± 0,05
120	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,14 ± 0,04

Tabla 4.2.- Media y desviación típica de la medida de la actividad caspasa 3 a distintos tiempos de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2A. La medida fue realizada en cultivos sin degenerar, incubados con 3 ng/ml cultivo de BmT o GmT durante 48 horas.

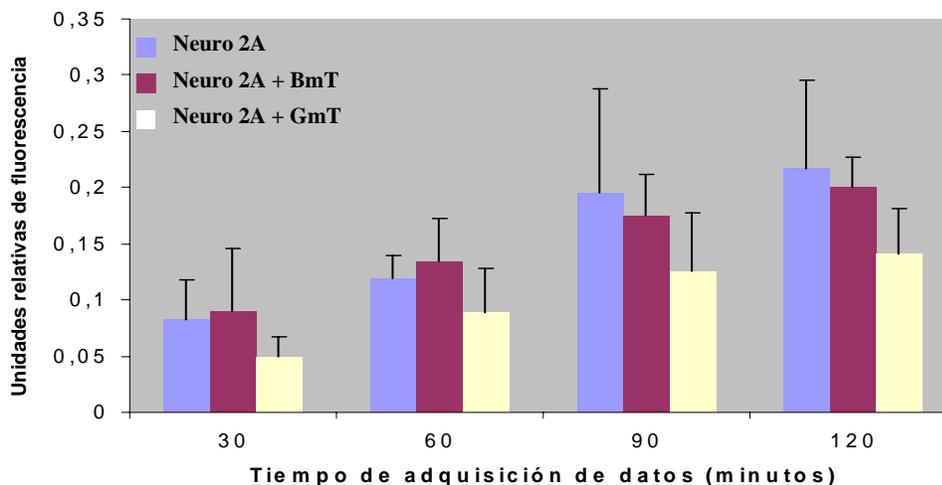


Figura 4.27.- Representación gráfica de la medida de la actividad caspasa 3 a distintos tiempos de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2 (n=3) A. La medida fue realizada en cultivos sin degenerar, incubados con 3 ng/ml cultivo de BmT o GmT durante 48 horas.

La tendencia mostrada es que BmT no presenta ningún efecto sobre la actividad caspasa-3. Sin embargo, a pesar de no existen diferencias estadísticamente, GmT presenta la tendencia de disminuirla en los cultivos de la línea celular Neuro 2A.

Los resultados obtenidos en los cultivos sobre los que se adicionó la droga, junto a las moléculas quimeras, se observan en la **Tabla 4.3**. Su representación gráfica puede observarse en la **Figura 4.28**.

Tiempo (minutos)	Neuro2A + trombina (n=3)	Neuro2A+ BmT + trombina (n=3)	Neuro2A+ GmT + trombina (n=3)
30	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,06	0,06 ± 0,02
60	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,08 ± 0,04
90	0,24 ± 0,09	0,21 ± 0,04	0,11 ± 0,05
120	0,23 ± 0,08	0,22 ± 0,03	0,10 ± 0,04

Tabla 4.3.- Media y desviación típica de la medida de la actividad caspasa 3 a distintos tiempos de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2A. La medida fue realizada en cultivos sometidos a degeneración mediante la adición de 100 nM de trombina e incubados con 3 ng/ml cultivo de BmT o GmT, durante 48 horas.

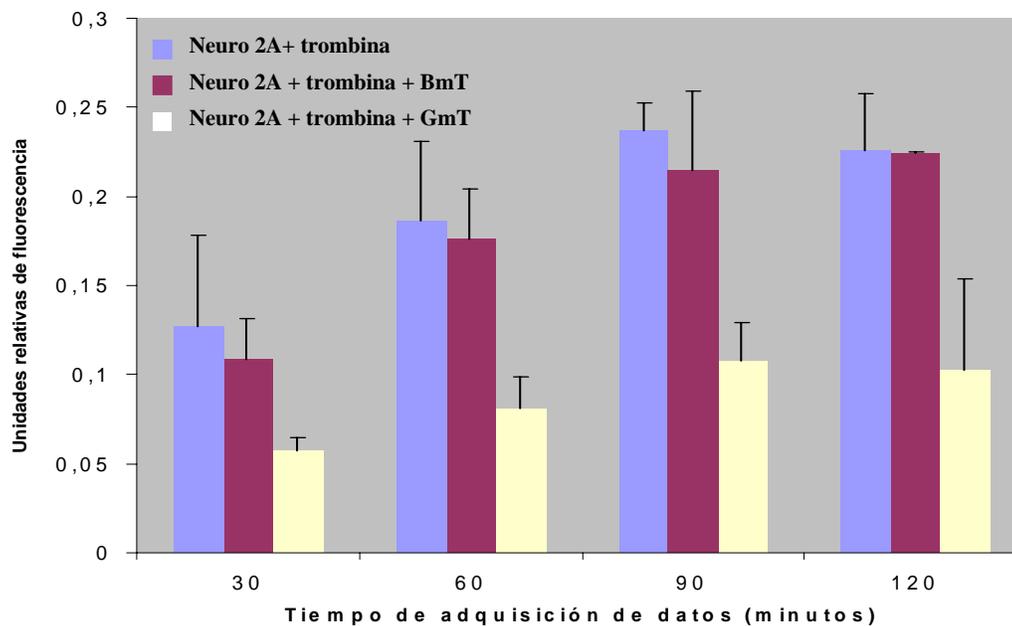


Figura 4.28.- Representación gráfica de la medida de la actividad caspasa 3 a distintos tiempos de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2A (n=3). La medida fue realizada en cultivos sometidos a degeneración mediante la adición de 100 nM de trombina y que se incubaron con 3 ng/ml cultivo de BmT o GmT durante 48 horas.

Para la proteína BmT los resultados fueron similares a los observados en los cultivos no degenerados. Sin embargo, en el caso de GmT se observó una disminución de la actividad caspasa-3, ésta vez estadísticamente significativa.

En la **figura 4.29.**, se observa que GmT disminuye la actividad caspasa-3 a niveles inferiores que la observada en cultivos sin adicionar trombina. Hasta ahora, no se había descrito que GDNF inhibiera la actividad caspasa-3 en esta línea celular. Sin embargo, sí se había observado que al adicionar GDNF se activaba su receptor RET (vía dependiente de RET) y la cascada de señales intracelulares (Jing y cols. 1996). Del mismo modo en ausencia del receptor RET (vía independiente a RET), también son activadas las cascadas intracelulares al adicionar el factor neurotrófico (Pezeshki y cols. 2001).

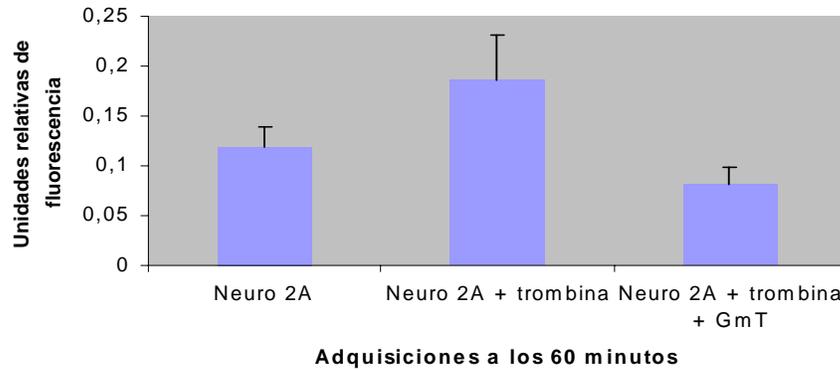


Figura 4.29.- Representación gráfica de la medida de la actividad caspasa 3 a 60 minutos de tiempo de adquisición, en cultivos celulares de Neuro 2A. La medida fue realizada en cultivos sin degenerar (Neuro 2A), sometidos a degeneración mediante la adición de 100 nM de trombina (Neuro 2A+trombina) o sometidos a dicha degeneración e incubados con 3 ng/ml cultivo de GmT (neuro 2A+trombina+GmT) durante 48 horas.

Este resultado demuestra que GDNF-TTC presenta una disminución de la actividad caspasa-3 en la línea celular Neuro2A. Lo que indicaría que la proteína presenta un efecto antiapoptótico incrementando cuando las células se encuentran en proceso de degeneración.

Contrariamente a lo esperado, ya que BDNF había sido descrito como promotor de la supervivencia celular (Blanco y cols. 2001), BDNF-TTC no mostró ningún efecto. Varias causas podrían explicar este fenómeno. La primera es la pérdida de funcionalidad de la molécula al estar fusionada a TTC. La segunda podría estar relacionada con la dosis administrada. También y de forma más improbable, podría ocurrir que la supervivencia promovida por el neurotrófico en dicha línea celular no quedaría reflejada en la vía de disminución de caspasa-3. De hecho, en las experiencias realizadas sobre esta línea celular, se ha estudiado el efecto de los neurotróficos sobre la viabilidad celular directamente (Blanco y cols. 2001). Por último, la trombina ha sido descrita como modificadora de algunos receptores neuronales (Turgeon y cols. 1999). Es posible que dicha proteína tuviese algún efecto sobre los receptores de la molécula de fusión BmT.

Para responder estas cuestiones, nuevas experiencias fueron realizadas, buscando nuevos modelos de inducción y de medida temprana de apoptosis, a diferentes dosis de proteína adicionada.

4.3.2. DETERMINACION DE CELULAS APOPTOTICAS POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Con el fin de observar la funcionalidad de nuestras moléculas, otras experiencias sobre la línea Neuro 2A fueron realizadas. La citometría de flujo con el marcador anexina V, tal y como se ha explicado en el apartado 3.4.1.2. del material y métodos, resulta un buen indicador de procesos apoptóticos en líneas neuronales (Boccellino y cols. 2003). Con el fin de evitar la adición de trombina, la apoptosis fue inducida en la línea celular por privación de suero, tal y como ha sido descrito por Kim y cols, 2001 (Kim y cols. 2001). A las 48 horas de privarles el suero, y tras el marcaje, las muestras fueron introducidas en el citómetro de flujo. Los resultados obtenidos pueden observarse en la **Figura 4.30**.

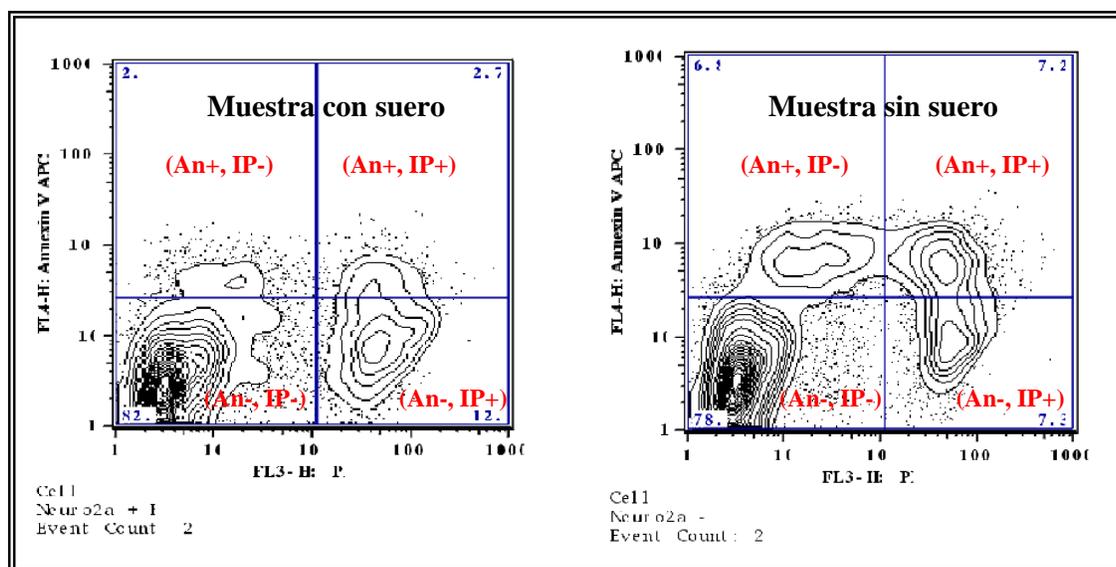


Figura 4.30.- Gráficas obtenidas en el citómetro de flujo donde se representan las células, privadas de suero y sin privar a las 48 horas, marcadas con: en el cuadro superior izquierdo An+,IP-; cuadro superior derecho An+,IP+, cuadro inferior izquierdo An-,IP-; cuadro inferior derecho An-,IP+).

En el cuadro superior izquierdo de cada diagrama, se encuentran las células marcadas con anexina, pero no con yoduro de propidio (An+, IP-), es decir las células apoptóticas (apoptosis temprana). Como podemos apreciar en el caso de las células deprivadas de suero, la población apoptótica es superior que en el caso de las que contenían suero, siendo esta diferencia significativa. La población del cuadro inferior izquierdo correspondería a las células no marcadas con anexina ni con yoduro de propidio (An-, IP-), es decir las células vivas. Las células correspondientes a la zona de la derecha corresponden a las células marcadas con yoduro de propidio únicamente (IP+), es decir las células ya muertas por procesos apoptóticos o necróticos, siendo imposible su diferenciación.

Los datos obtenidos son los mostrados en la **Tabla 4.4**. En la **Figura 4.31**, podemos observar la representación de la población de células apoptóticas.

Población neuronal	Control	48 horas sin suero
Células apoptóticas (células An+,IP-)	2,41%	6,58 %
Células muertas (células IP +)	14,5%	14,3%
Resto de células	83,09%	79,12 %

Tabla 4.4.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 horas, deprivadas de suero y sin deprivar.

Tal y como se esperaba, la población de células en apoptosis en los cultivos sometidos a deprivación de suero es superior al control (6,58% frente a 2,41%). Las células muertas permanecen constantes en ambos casos, observándose menor porcentaje de células vivas en los cultivos sin suero (83,09% frente a 79,12%).

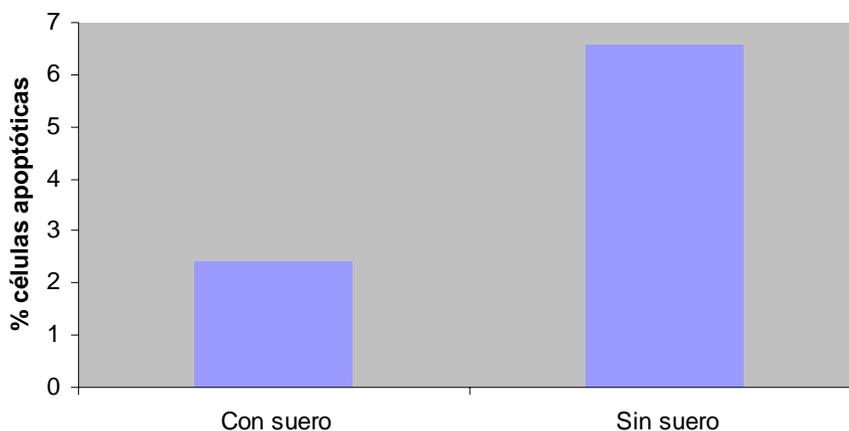


Figura 4.31.- Representación del porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 horas, deprivadas de suero y sin deprivar.

Debido a que el inicio de la apoptosis no fue observado hasta las 48 horas, se adicionaron los distintos factores neurotróficos fusionados a TTC, tanto a las 48 como 72 horas. Por otra parte, se había sido sugerido que podría existir una posible activación de la ruta de supervivencia neuronal con el fragmento C en solitario, se planteó también la adición de dicha molécula en los cultivos (Gil y cols. 2003). Para observar si el efecto de las proteínas de fusión era debido al factor neurotrófico y no a TTC, dicho fragmento también fue estudiado. Las dosis adicionadas fueron de 10, 50 y 250 ng proteína/ ml cultivo.

Los resultados obtenidos con la proteína BmT a las 48 y 72 horas pueden observarse en la **Figura 4.32.** y la **Tabla 4.5.** A las 48 horas, el número de células apoptóticas desciende a medida que incrementamos la dosis (11,9 % en el control frente a 2,84% a la máxima dosis), descendiendo también el número de células muertas (9,28 % frente al 2,6%). A las 72 horas, se observa un aumento en las células apoptóticas en todos los casos, independientemente de la dosis administrada. Sin embargo sigue existiendo una disminución en las células muertas observadas frente al control. Podría ocurrir que la proteína BmT retardase los procesos de muerte celular.

4. Resultados y discusión

Población neuronal	Control		10 ng/ml		50 ng/ml		250 ng/ml	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
Células An+,IP- (células apoptóticas)	11,9	22,2	9,19	31,5	3,79	31,4	2,84	38,2
Células IP + (células muertas)	9,28	11,1	11,6	7,07	4,05	5,91	2,6	7,09
Resto de células	78,89	66,7	79,21	62,43	92,16	62,69	94,56	54,57

Tabla 4.5.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 y 72 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) de BmT.

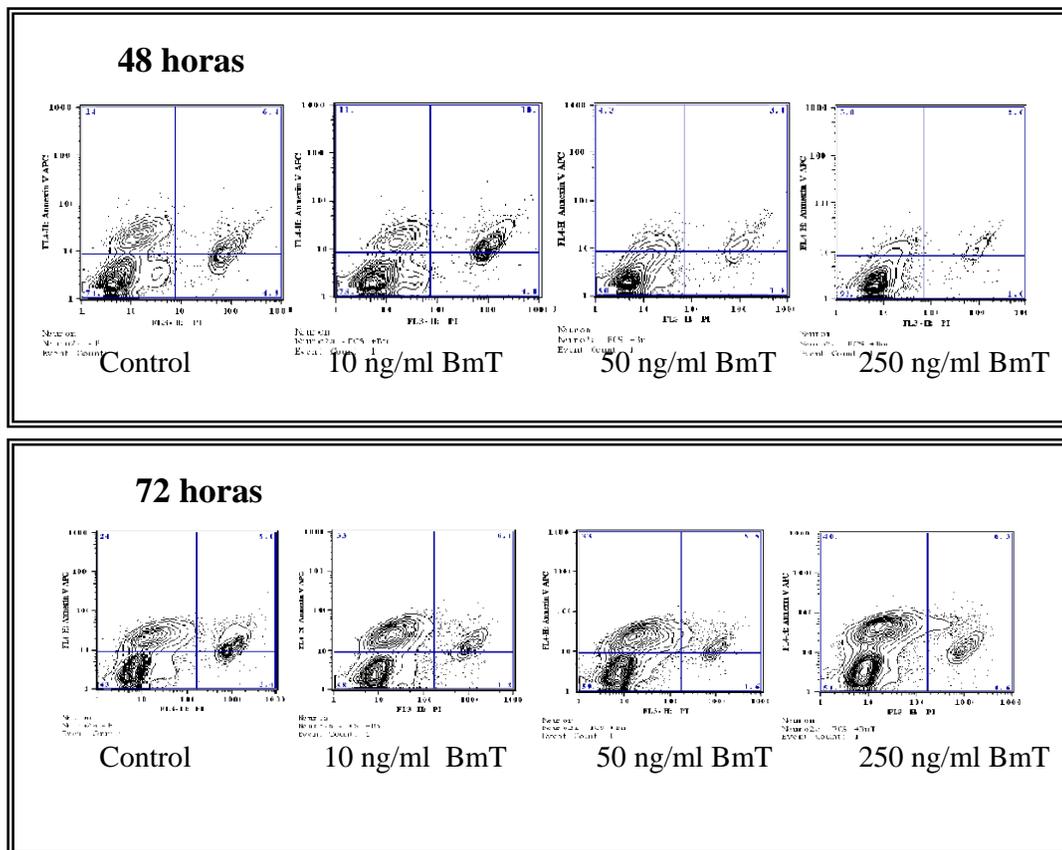


Figura 4.32.- Gráficas obtenidas en el citómetro de flujo donde se representan las células, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis de BmT (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) a las 48 y 72 horas, marcadas con: en el cuadro superior izquierdo An+,IP-; cuadro superior derecho An+,IP+, cuadro inferior izquierdo An-,IP-; cuadro inferior derecho An-,IP+).

De especial interés, resulta el efecto dosis dependiente de la molécula a las 48 horas. En la **Figura 4.33.** quedan representados gráficamente los datos obtenidos en ese tiempo. Como puede observarse, estos resultados parecían adaptarse a una función exponencial.

Tras sustraer al tanto por ciento de células apoptóticas de cada dosis, las obtenidas en la mayor dosis (250 ng/ml) se realizó la interpolación de los mismos para obtener una ecuación. La ecuación obtenida ($y=9,4821e^{-0,0458x}$) presenta un valor R^2 de 0,9981 como puede observarse en la **Figura 4.34.** Este hecho nos permite afirmar que la molécula BmT es funcional y explicar su falta de disminución de actividad caspasa-3 en la experiencia anteriormente expuesta. Si la dosis aplicada (3ng/ml) es introducida en la ecuación, el porcentaje de células apoptóticas esperadas sería 11,10% no mostrando apenas diferencia con el control. Por tanto, la falta de funcionalidad observada para BmT en el ensayo de caspasa-3 es debida a la baja dosis utilizada.

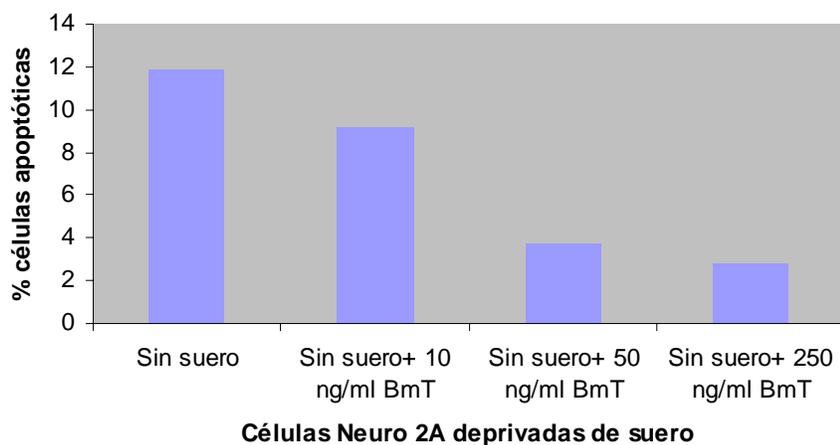


Figura 4.33.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) de BmT.

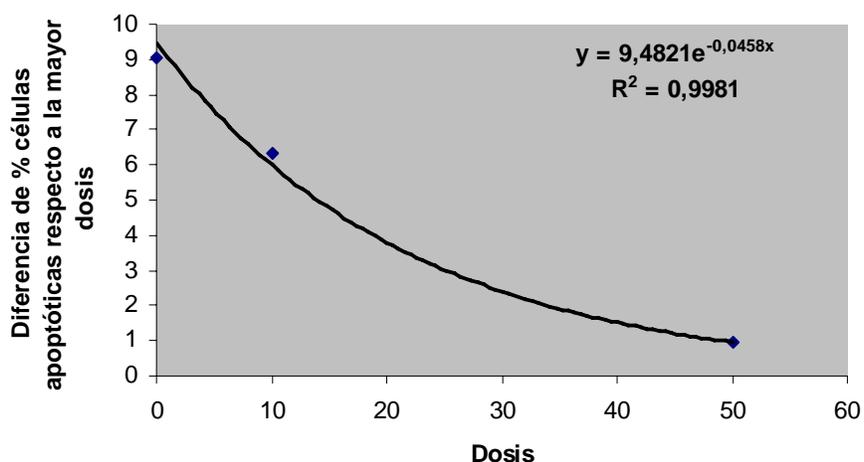


Figura 4.34.- Función seguida por el porcentaje de células apoptóticas respecto a las observadas en la máxima dosis de la proteína BDNF-TTC

Los resultados tras la adición de la proteína quimera GDNF-TTC y las imágenes obtenidas con el citómetro de flujo se observan en la **Figura 4.35**. Los datos obtenidos en porcentajes a partir de las 30.000 células estudiadas quedan representados en la **Tabla 4.6**.

Población neuronal	Control		10 ng/ml		50 ng/ml		250 ng/ml	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
Células An+,IP- (células apoptóticas)	11,9	22,2	4,97	15,6	--	14,7	4,41	13,2
Células IP+ (células muertas)	9,28	11,1	4,98	4,59	--	4,88	6,07	3,8
Resto de células	78,89	66,7	90,05	79,81	--	80,42	81,83	83

Tabla 4.6.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 y 72 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) de GmT.

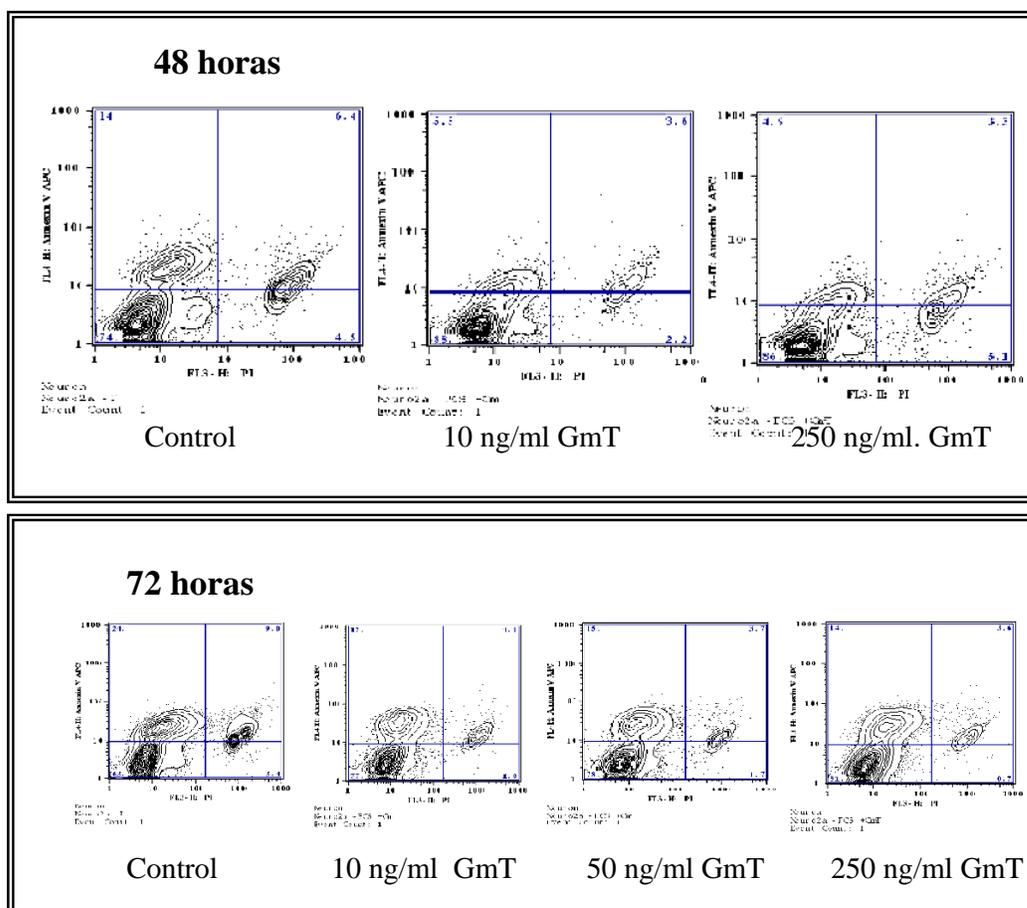


Figura 4.35.- Gráficas obtenidas en el citómetro de flujo donde se representan las células, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis de GmT (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) a las 48 y 72 horas, marcadas con: en el cuadro superior izquierdo An+,IP-; cuadro superior derecho An+,IP+, cuadro inferior izquierdo An-,IP-; cuadro inferior derecho An-,IP+).

Para GDNF-TTC a las 48 horas e independientemente de la dosis administrada, el número de células apoptóticas disminuye. A diferencia que en BDNF-TTC, este efecto se mantiene a las 72 horas. El porcentaje de células apoptóticas a 48 y 72 horas queda gráficamente representado en las **Figuras 3.36.** y **3.37.**

En el caso de GmT, no existe una relación tan clara entre la dosis administrada y el efecto observado. Incluso cuando solamente fueron adicionados 10 ng/ ml. se observó efecto. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de la actividad caspasa-3 en Neuro 2A. A las 72 horas, el efecto sigue

manteniéndose, observándose en este caso una menor cantidad de células apoptóticas y células muertas en las dosis más altas.

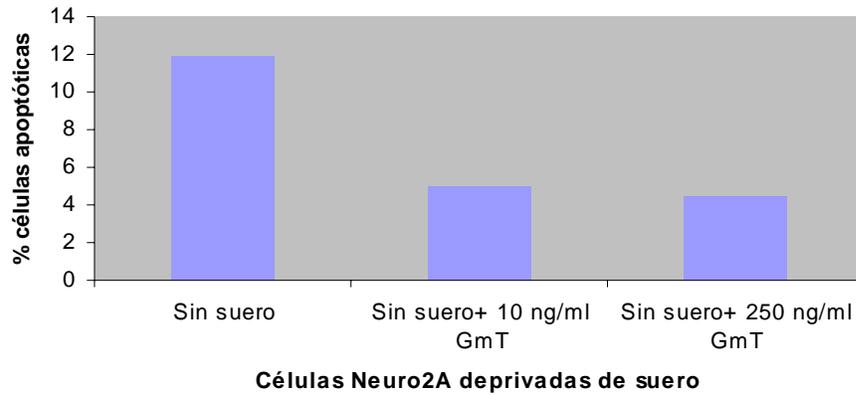


Figura 4.36.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10 y 250 ng/ml cultivo) de GmT.

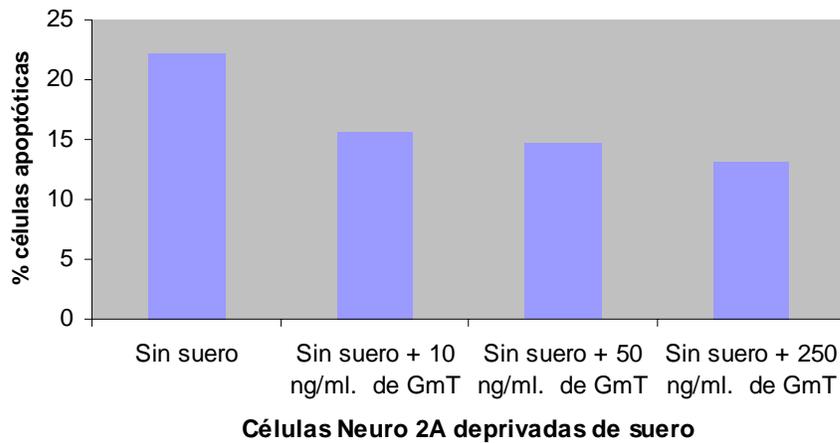


Figura 4.37.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 72 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) de GmT.

En el caso del fragmento C de la toxina tetánica, se obtuvieron los diagramas mostrados en la **Figura 4.38.**, cuyos datos se representan en la **Tabla 4.7.**

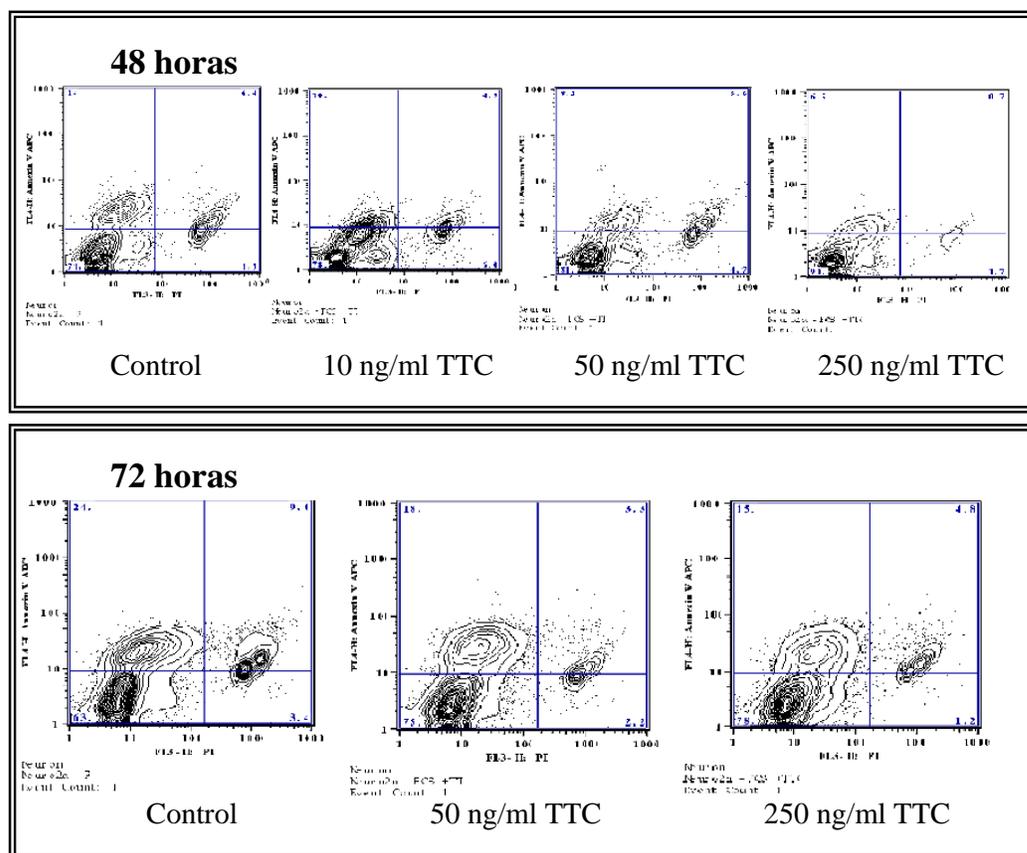


Figura 4.38.- Gráficas obtenidas en el citómetro de flujo donde se representan las células, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis de TTC (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) a las 48 y 72 horas, marcadas con: en el cuadro superior izquierdo An+,IP-; cuadro superior derecho An+,IP+, cuadro inferior izquierdo An-,IP-; cuadro inferior derecho An-,IP+).

Población neuronal	Control		10 ng/ml		50 ng/ml		250 ng/ml	
	48h	72h	48h	72h	48h	72h	48h	72h
Células An+,IP- (células apoptóticas)	11,9	22,2	8,14	--	7,19	17,2	5,53	13,8
Células IP+ (células muertas)	9,28	11,1	7,72	--	8,54	4,91	1,8	5,37
Resto de células	78,89	66,7	84,14	--	84,24	77,89	92,67	80,83

Tabla 4.7.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 48 y 72 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) de TTC.

A las 48 horas, se observó como el fragmento C de la toxina tetánica disminuye la población de células apoptóticas lo cual podemos ver más gráficamente en la **Figura 4.39**.

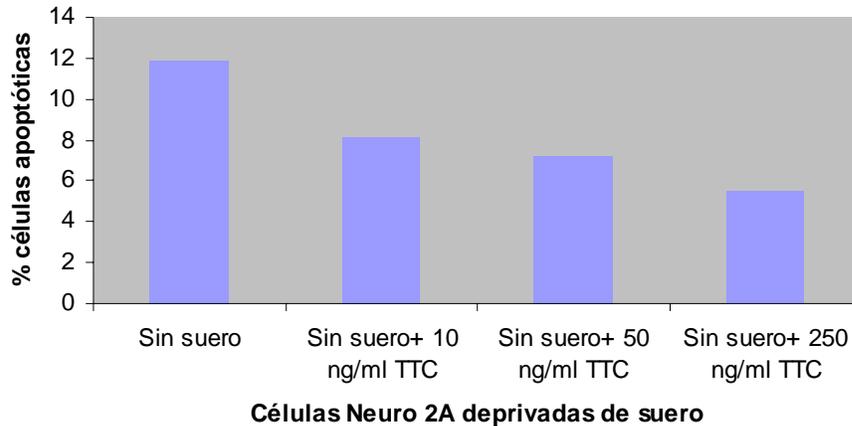


Figura 4.39.- Porcentaje de células determinadas por el citómetro de flujo a las 72 horas, deprivadas de suero e incubadas a distintas dosis (10, 50 y 250 ng/ml cultivo) de TTC.

Por lo tanto podemos decir que también el fragmento C de la toxina tetánica tiene un efecto antiapoptótico sobre la línea celular Neuro 2A a las 48 horas de su degeneración por deprivación de suero. Como en el caso anterior (GmT) no se observó un efecto dosis dependiente. A las 72 horas la molécula TTC mantiene su efecto a lo largo del tiempo disminuyendo la población de células en apoptosis y de células muertas respecto al control.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que las proteínas GmT y BmT inhiben la apoptosis neuronal inducida por deprivación de suero en la línea celular Neuro2A. Este hecho indicaría el mantenimiento de la funcionalidad de los factores neurotróficos fusionados a TTC.

No obstante el modo de actuación de cada una de ellas es diferente. BmT presenta un efecto dosis dependiente y a corto plazo (48 horas). LA dosis no presenta una gran influencia en el caso de GmT. Además el efecto de esta molécula, a pesar de disminuir levemente, se mantiene durante un mayor tiempo (72 horas).

Por otra parte, hemos demostrado que el fragmento C de la toxina tetánica es capaz de disminuir la apoptosis en la línea celular Neuro 2A. Su modo de actuación es similar a GmT. Este resultado estaría de acuerdo con lo demostrado por Gil y cols, 2003. Estos autores demuestran la activación de la vía Akt, relacionada con la supervivencia celular, por parte el fragmento C de la toxina tetánica.

Ha quedado demostrada la funcionalidad de las moléculas de fusión en la inhibición de la apoptosis inducida por privación de suero. Con la finalidad de estudiar el efecto en modelos más cercanos a lo que ocurre en la E.L.A., otra estrategia fue abordada. En cultivos organotípicos, Rothstein en 1995 demostró que la adición de la THA (inhibidora de los canales glutamatérgicos relacionados con la patogenia de la enfermedad), resultaba un buen modelo para la enfermedad. Por otra parte, se ha descrito que las células Neuro2A también presentan estos canales (Van der Valk y Vijverberg 1990). Se realizó una nueva experiencia para conocer si la adición de THA en esta línea celular inducía apoptosis. Tras la adición de THA a distintas concentraciones (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M y 12,5 μ M), el número de células apoptóticas fue estudiado a las 24 y 48 horas. En ninguna de las dosis, ni tiempos estudiados, se observó una disminución de las células apoptóticas con respecto al control, invalidándolo como modelo.

4.3.3. DETERMINACION SUBCELULAR DE LA QUINASA Akt.

La proteína quinasa Akt debe su nombre a la homología presentada con la oncoproteína v-Akt. Se le conoce también como PKB y presenta tres isoformas denominadas α , β y γ , siendo la isoforma α la más activa. Es una serina-treonina quinasa de 57 kDa que se une preferentemente a lípidos del tipo fosfoinositol (Coffer y cols. 1998).

La proteína Akt ha sido relacionada con la enfermedad de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Se ha observado en estadios tempranos de esta enfermedad de ratones transgénicos modelos, sus niveles en médula espinal disminuidos. Se

ha postulado que una disminución de esta proteína activadora de factores de supervivencia celular aumentaría los efectos apoptóticos en la enfermedad (Warita y cols. 2001). La sobreexpresión de Akt muestra un efecto antiapoptótico en muchos tipos celulares resultando en una disminución de la muerte celular (Franke y cols. 1997; Downward 1998; Sabbatini y McCormick 1999). Se le ha relacionado por activar la proteína antiapoptótica BAD e inhibir proteínas apoptóticas como la caspasa 9 (Vanhaesebroeck y Alessi 2000). Por otro lado, son numerosas las observaciones que indican que los factores neurotróficos activan Akt. En cultivos corticales BDNF activa Akt vía calmodulina, induciendo la supervivencia neuronal (Cheng y cols. 2003). En el caso de GDNF, también se han realizado ensayos *in vivo* donde se observa la activación de esta quinasa en el cerebro (Jin y cols. 2002). Cabe destacar por otra parte, que ha sido descrito recientemente que el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) es capaz de activar la quinasa Akt en cultivos corticales primarios (Gil y cols. 2003). Por todo ello, se creyó adecuado la observación de la activación de Akt por parte de las proteínas quimeras objeto de estudio de este trabajo, conteniendo los factores neurotróficos GDNF y BDNF fusionados a TTC, todos ellos activadores de la Akt.

El mecanismo de acción de esta quinasa no está bien estudiado. Akt es una proteína citosólica en células no estimuladas, de modo que parte de ella es translocada a la membrana plasmática por la activación de PI3K, donde se activa por fosforilación. Se conoce que la forma activa de Akt se desprende de la membrana plasmática y atraviesa el citosol, para finalmente translocarse parte de ella al núcleo, aunque este mecanismo no está claro. No toda la proteína entra al núcleo, parte se queda en el citosol activando otras proteínas mediante fosforilación. La presencia de la proteína Akt en el núcleo parece estar relacionada con la activación de factores de transcripción responsables de la supervivencia neuronal. Este proceso de translocación nuclear comienza tras 30 minutos de la estimulación de los cultivos. Dicho proceso se incrementa cuando las células son estimuladas por factores tróficos (Andjelkovic y cols. 1997; Meier y cols. 1997).

Se procedió al estudio de la activación y localización subcelular de la quinasa Akt por parte de las proteínas quimera para observar la funcionalidad de

las mismas. Para el experimento, se utilizaron cultivos corticales primarios, modelo sobre el cual han sido descritos los estudios de activación y localización. La acción de las proteínas fue de una hora para asegurar la total activación de la quinasa en los cultivos. La inmunohistoquímica frente a la quinasa activada se observó en microscopía confocal, que permitió la cuantificación de la intensidad de marcaje. Mediante las diferencias en intensidad entre los controles y los cultivos inducidos por las proteínas de fusión podríamos determinar su funcionalidad.

Para la puesta a punto de esta técnica se utilizó el factor neurotrófico BDNF. En primer lugar se realizó un estudio comparativo entre el control positivo al que se le había adicionado BDNF y el negativo. Se utilizó la concentración de BDNF que había mostrado efecto sobre la apoptosis celular en Neuro2A (10 ng/ml). Se realizó la inmunohistoquímica con un anticuerpo secundario conteniendo un fluoróforo que emitía en una longitud de onda correspondiente al color rojo. En este caso no se observaron diferencias que fueran significativas entre ambos controles.

Expertos en microscopía del Servicio de Imagen del Instituto Pasteur nos indicaron que el posible fallo en la cuantificación de la fluorescencia se podía encontrar en la utilización del anticuerpo secundario con un fluoróforo rojo. Nos recomendaron utilizar un anticuerpo secundario con un fluoróforo que emitiera en la longitud de onda verde para realizar la cuantificación. En este caso observamos diferencias significativas entre ambas muestras y procedimos a la realización del ensayo de las proteínas de fusión y el fragmento C de la toxina tetánica. Las imágenes adquiridas en cada muestra puede apreciarse en la **Figura 4.40**.

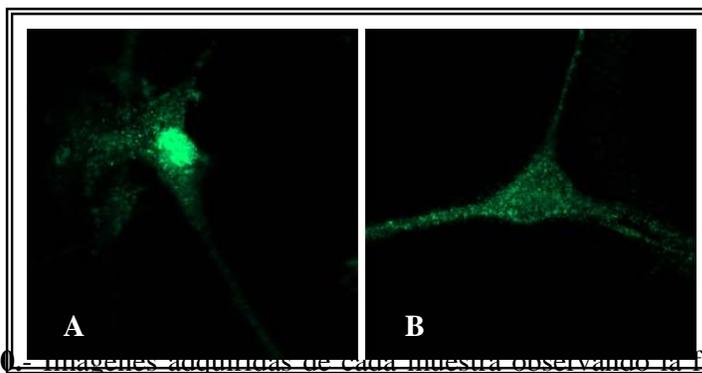
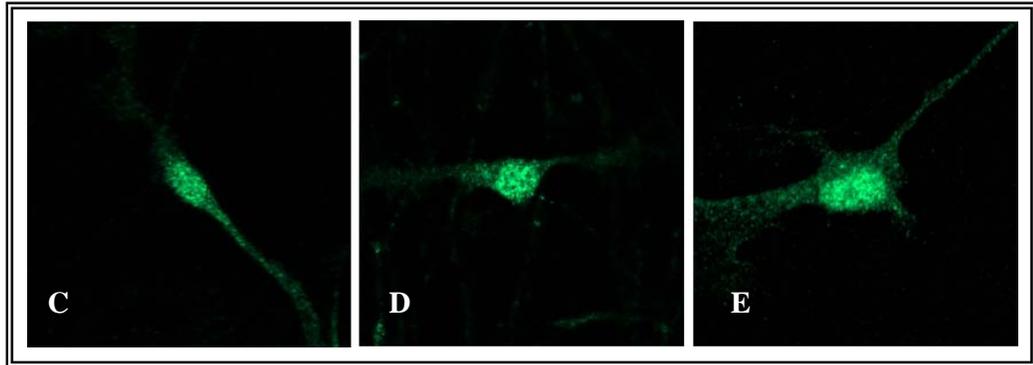


Figura 4.40 Imágenes adquiridas de cada muestra observando la fluorescencia en verde a partir del anticuerpo contra la quinasa Akt activada. **A)** BDNF (control positivo) **B)** control negativo **C)** Muestra activada con TTC **D)** Muestra activada con BmT **E)** Muestra activada con GmT



Adquirimos las imágenes de cada una de las muestras, midiendo las intensidades de fluorescencia de cada una de las células, y posteriormente se realizó la media de todas las adquisiciones. Todos los valores de intensidad obtenidos son relativos al área de cada una de las células adquiridas. Las medias de las intensidades obtenidas en cada una de las muestras y sus desviaciones pueden observarse en la **Tabla 4.9**. Estos datos quedan representados en la **Figura 4.41**.

Control	TTC	Bm	BmT	GmT
72,45± 22,35	83,10 ± 38,98	121,00± 40,46	104,88 ± 44,55	95,34 ± 27,44

Tabla 4.9.- Valores medidos de intensidad de fluorescencia de cada muestra en todo el área de las células de cultivos corticales de ratón.

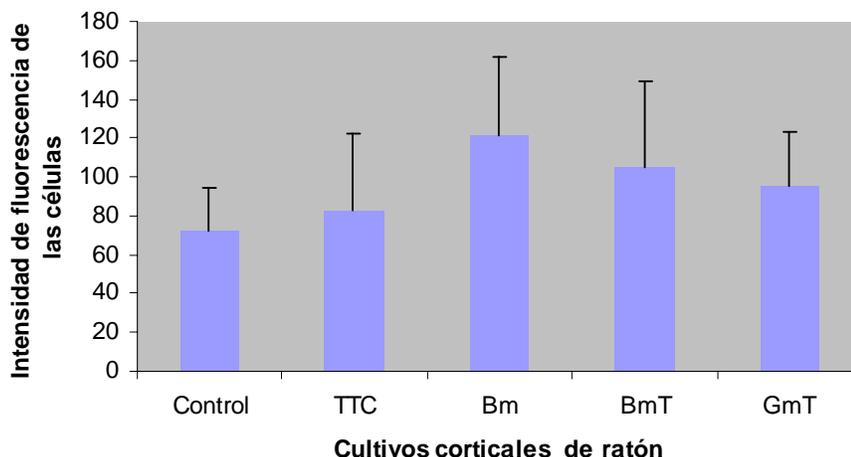


Figura 4.41.- Representación gráfica de los valores medidos de intensidad de fluorescencia de cada muestra en todo el área de las células de cultivos corticales de ratón.

Como puede observarse, las proteínas quimeras activan la quinasa relacionada con la supervivencia neuronal, Akt, igual que el factor BDNF en solitario. Mediante t-Student se compararon los resultados dos a dos, observándose diferencias significativas entre el control negativo y las proteínas estudiadas a excepción del fragmento C de la toxina tetánica. Por otra parte, no se observaron diferencias tras la adición de BDNF o BmT, aunque sí que la intensidad media observada al adicionar GmT fue menor. Esto puede ser debido a que dicho factor es diferente y puede por tanto activar Akt en menor medida. En cualquier caso, se demostró que nuestras proteínas de fusión eran capaces de activar Akt con respecto al control.

Para la proteína TTC, a pesar de no mostrar un efecto significativo frente al control negativo, tampoco mostró diferencias cuando se comparó con la proteína GDNF-TTC.

Como hemos indicado antes, parte de la proteína Akt se transloca al núcleo y parte se queda en el citoplasma. Es posible que esta localización celular pueda estar relacionada con la función de la misma ya que la parte translocada al núcleo parece estar relacionada con la supervivencia neuronal. De hecho, existe una familia de factores de transcripción denominada Forkhead, los cuales han sido relacionados con la quinasa Akt. Dichos factores, en ausencia de factores tróficos,

inducen la transcripción de genes apoptóticos como *FasL* (Brunet y cols. 1999) o *Bim* (Dijkers y cols. 2000) activando así la cascada de señales que conlleva finalmente a la apoptosis celular. La quinasa Akt tras su activación y posterior translocación al núcleo, fosforila esta familia de factores de transcripción, expulsándolos del núcleo celular, y por tanto impidiendo su actuación e inhibiendo la inducción de los procesos de apoptosis celular. Es una forma de regulación negativa de dichos factores por parte de la quinasa (Brownawell y cols. 2001). Un modelo propuesto para esta regulación podemos observarlo en la **Figura 4.42**. En base a este modelo, la activación de Akt y su presencia en el núcleo, debido a la adición de nuestras proteínas quimeras, reforzarían la funcionalidad de los factores neurotróficos en las mismas y justificarían su capacidad de inhibición de la apoptosis observada en los ensayos anteriores a través de la vía quinasa Akt.

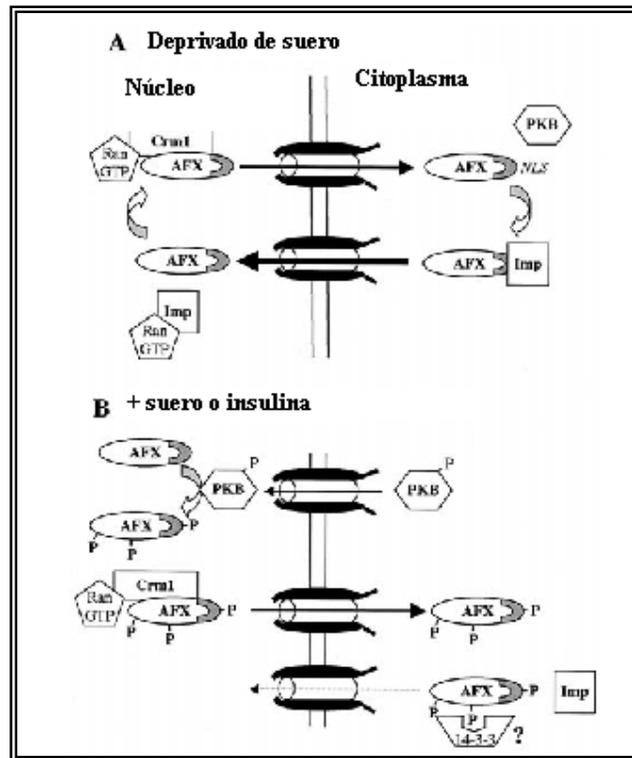


Figura 4.42.- A) En ausencia de factores tróficos AFX (factor de la familia Forkhead) entra al núcleo gracias a la importina (Imp) mientras PKB (quinasa Akt) está inactivo. B) En presencia de factores tróficos, PKB es fosforilado y translocado al núcleo donde fosforila el factor de transcripción provocando su expulsión por la unión de otras proteínas (Crm1 y Ran GTP).

Por tanto y gracias a las posibilidades que el programa “LSM 5 Image” ofrece, pudimos determinar la intensidad de la fluorescencia observada a nivel nuclear y a nivel de citoplasma. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.10.** y se representan gráficamente en la **Figura 4.43.**

Control	TTC	Bm	BmT	GmT
121,78 ± 38,30	134,04 ± 37,40	207,43 ± 36,97	171,93 ± 44,66	167,02 ± 32,241

Tabla 4.10.- Valores medidos de intensidad de fluorescencia de cada muestra en el núcleo de las células de cultivos corticales de ratón.

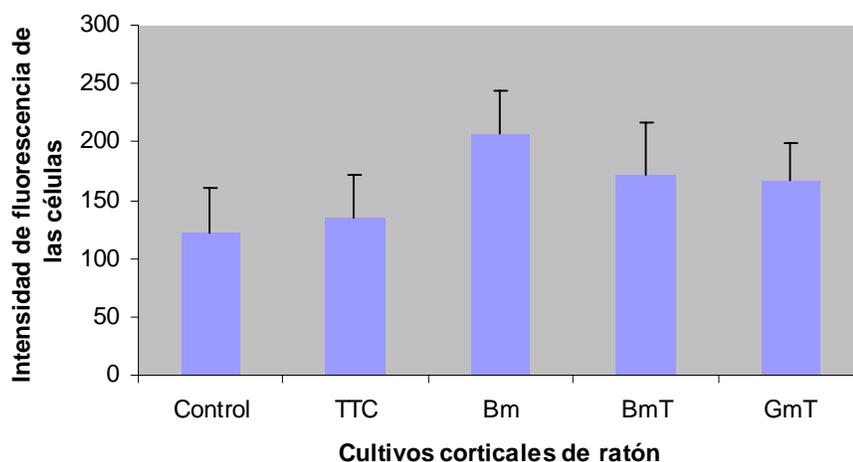


Figura 4.43.- Representación gráfica de los valores medidos de intensidad de fluorescencia de cada muestra en todo el núcleo de las células de cultivos corticales de ratón.

Los resultados de la fluorescencia de Akt en el núcleo son similares a los obtenidos en la fluorescencia de la célula total, comprobando como ésta es superior y de forma significativa entre las proteínas quimera y el control negativo. En este caso se observa que la fluorescencia en el control positivo es superior a las proteínas de fusión y de forma significativa ($p < 0,01$).

Además las diferencias entre las proteínas quimera y el TTC, es significativo ($p < 0,01$) para ambas proteínas.

Tras la cuantificación de la fluorescencia del citoplasma calculada por sustracción de la fluorescencia total de la célula y la fluorescencia del núcleo, se observaron diferencias. Los datos obtenidos fueron los descritos en la **Tabla 4.11.** que representamos en la **Figura 4.44.**

Control	TTC	Bm	BmT	GmT
55,64 ± 20,05	58,50 ± 40,70	82,49 ± 36,65	62,09 ± 30,47	64,64 ± 16,71

Tabla 4.11.- Valores medidos de intensidad de fluorescencia de cada muestra en el citosol de las células de cultivos corticales de ratón.

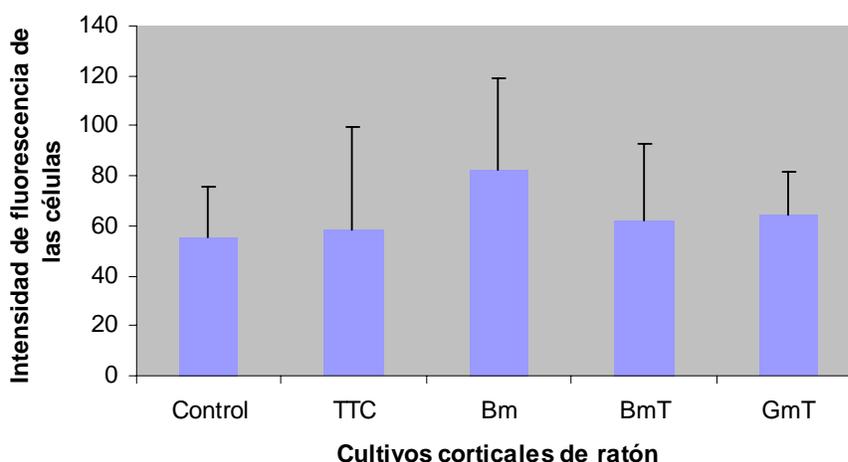


Figura 4.44.- Representación gráfica de los valores medidos de intensidad de fluorescencia de cada muestra en el citosol de las células de cultivos corticales de ratón.

Los resultados obtenidos al medir la fluorescencia en el citosol nos indican que todas las muestras respecto al control negativo, son significativos ($p < 0,01$), incluido el TTC. Esto nos indicaría que todos los tratamientos inducen a que la quinasa sea activada y se transloque al núcleo. La forma citosólica es inferior a la que se observa en el control negativo, es decir, que en mayor o menor todas nuestras proteínas problema inducen a la translocación de Akt al núcleo. Este fenómeno podría estar relacionado con la inhibición de la apoptosis celular a través de los factores de transcripción Forkhead que hemos descrito anteriormente.

Como primera conclusión podemos afirmar que las proteínas de fusión activan la cascada de señalización celular Akt. Esta activación va acompañada de la translocación de la misma al núcleo, lo que sería un indicativo de su capacidad antiapoptótica. No obstante, cualquiera de las dos proteínas problema (GmT principalmente) muestran una menor activación que cuando BDNF es añadido en solitario. En el caso de la proteína de fusión BmT es posible que la fusión ocasione una disminución en la funcionalidad del mismo. En el caso de GmT al tratarse de otro factor neurotrófico, no podemos concluir que sea debido a su pérdida de funcionalidad.

Por último, el fragmento C de la toxina tetánica, no parece tener un efecto significativo sobre la activación de Akt en general. Sin embargo, al observarse una menor activación en el citoplasma, este hecho podría indicar que el Akt activado es translocado al núcleo en mayor medida a como ocurre en los cultivos donde no se adiciona nada aunque al observar estos datos en el núcleo no se observa diferencias significativas.

En resumen, estos resultados, nos permiten postular que al igual que BDNF, el mecanismo de inhibición de la apoptosis por parte de las proteínas quimera, podría realizarse a través de la activación de Akt, translocación al núcleo y actuación de la misma inactivando los factores de transcripción de la familia Forkhead, por expulsión del núcleo de los mismos mediante fosforilación. Posiblemente la inactivación citosólica de BAD y la caspasa 9 no sea la única ruta por la que se producen los procesos de inhibición de apoptosis por parte de los factores tróficos (Vanhaesebroeck y Alessi 2000). Así estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de que Akt interviene promoviendo la supervivencia celular al actuar sobre procesos tempranos de apoptosis (Kennedy y cols. 1999) reforzando los datos obtenidos en los experimentos realizados mediante citometría de flujo.

4.3.4. ESTUDIO DEL TRANSPORTE RETRÓGRADO

Una vez comprobada la funcionalidad de los factores neurotróficos fusionados a TTC, quedaba por comprobar que el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) seguía siendo funcional cuando se encontraba fusionado a los mismos. Así se realizaron estudios mediante inmunohistoquímica tras la inyección intramuscular de las proteínas quimera. Lamentablemente los anticuerpos anti TTC (SP 48 y SP 49) no mostraron características adecuadas en los estudios inmunohistoquímicos al presentar reacciones inespecíficas con los núcleos de las neuronas lo que impidió su utilización en dichos estudios para observar la presencia de las proteínas quimeras. Debido a estos hechos y a que los anticuerpos habían presentado buenas características en la técnica Western-blotting, se procedió a la inyección de las proteínas quimera y posterior observación de su presencia en el Sistema Nervioso Central mediante extracción proteica de la zona de interés, e identificación por dicha técnica.

Fueron necesarias modificaciones en la utilización de los anticuerpos ya que debido a que el anticuerpo secundario (anticonejo biotinilado) mostró una alta inespecificidad, fue necesaria la utilización de mayor bloqueo. Así se aplicó el anticuerpo secundario en el mismo tampón que el denominado tampón de bloqueo, conteniendo suero de cabra normalizado y leche desnatada a una concentración del 3%.

Así como puede observarse en la **Figura 4.45. y 4.46.** tras realizar inyecciones en la lengua de la proteína GmT y TTC, esta último como control positivo, realizamos la extracción proteica de la misma a los 15 minutos, pudiendo detectar ambas proteínas en las distintas muestras. Las tallas eran las correctas, 50 kDa para TTC y unos 70 kDa para GmT. Esta última reaccionó tanto para el anticuerpo antiGDNF como el anti TTC sintetizado por nosotros (SP49) Sin embargo cuando realizamos el mismo proceso pero esperando 8 horas, ambas proteínas no eran detectadas. Estos datos nos hicieron suponer que la proteína era transportada al Sistema Nervioso Central. Lamentablemente al realizar las extracciones de la zona alrededor del hipogloso, y posteriormente los western blotting con los anticuerpos correspondientes, no se observó señal en los mismos.

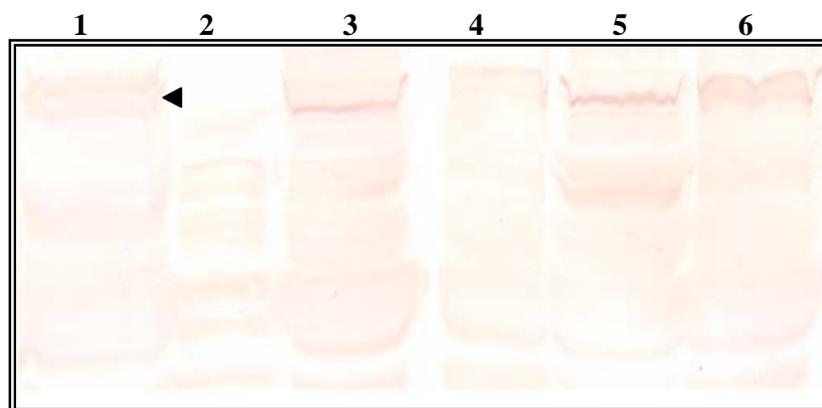


Figura 4.45.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra GDNF, revelado con ABC-peroxidasa a partir de extractos proteicos de lenguas. **1:** lengua inyectada con GmT y extraída a los 15 minutos **2:** lengua inyectada con TTC y extraída a los 15 minutos; **3:** lengua sin inyectar y extraída a los 15 minutos; **4:** lengua inyectada con GmT y extraída a las 8 horas; **5:** lengua inyectada con TTC y extraída a las 8 horas; **6:** lengua sin inyectar y extraída a los 15 minutos.

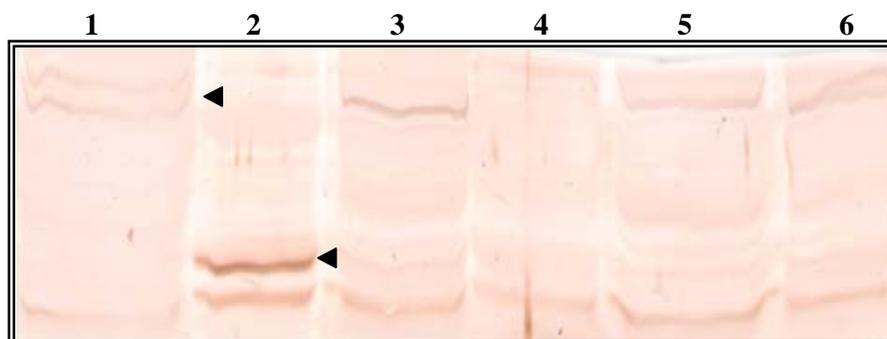


Figura 4.46.- Visualización de las proteínas recombinantes mediante western blotting con el anticuerpo contra TTC, revelado con ABC-peroxidasa a partir de extractos proteicos de lenguas. **1:** lengua inyectada con GmT y extraída a los 15 minutos **2:** lengua inyectada con TTC y extraída a los 15 minutos; **3:** lengua sin inyectar y extraída a los 15 minutos; **4:** lengua inyectada con GmT y extraída a las 8 horas; **5:** lengua inyectada con TTC y extraída a las 8 horas; **6:** lengua sin inyectar y extraída a los 15 minutos.

El estudio ha quedado abierto y nos planteamos si la falta de detección se debe a un problema en la técnica o a una degradación de las proteínas al ser inyectadas. Así en el primero de los supuestos, hemos propuesto como posible solución la realización de nuevos anticuerpo, en este caso monoclonales, mediante la coinyección de nuevos epítomos a los conejos y ADN desnudo codificando los mismos. Estos serían testados de nuevo a nivel de inmunohistoquímicas y western

blotting. Otra de las posibilidades abiertas es la de cambiar el sistema de extracción mediante la utilización de solventes orgánicos que ayudasen a la extracción más selectiva e nuestras proteínas ya que TTC tiene un carácter hidrofóbico. Y como última posibilidad, estamos realizando el estudio de otras proteínas que son activadas por nuestras proteínas, como Akt, cuya sobreactivación frente a un control demostrarían indirectamente el transporte y funcionalidad de las mismas.

Respecto al segundo supuesto, la degradación de las moléculas, nos planteamos un estudio paralelo donde realizaríamos inyecciones de β -galactosidasa y β -galactosidasa fusionada a TTC de forma que observando y comparando las intensidades del color azul de reacción de la enzima tras 8 horas de la inyección, podríamos determinar si se produce una alta degradación de las proteínas fusionadas a TTC en el músculo.



5.-CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES.

De los resultados de las experiencias realizadas en el presente estudio, de su discusión y contrastación con otras aportaciones, pueden deducirse las siguientes conclusiones:

- 1.- El fragmento C de la toxina tetánica fusionado al factor neurotrófico GDNF rescata a la línea celular Neuro2A de la degeneración; hecho demostrado por una menor actividad de la proteína proapoptótica caspasa-3 y una menor proporción de células apoptóticas tempranas o muertas, en los cultivos tratados. Esta capacidad se mantiene incluso a dosis mínimas.
- 2.- La proteína de fusión BDNFmadura-TTC presenta un gran efecto sobre la inhibición de la apoptosis en la línea celular Neuro 2A en degeneración, cuando es aplicada en dosis altas. Dosis bajas de dicha proteína no han mostrado efecto en la inhibición de la misma, ni tampoco en la disminución de la actividad caspasa 3.
- 3.- Las fusiones GDNFmadura-TTC y BDNFmadura-TTC activan la cascada intracelular vía quinasa Akt, relacionada con la supervivencia neuronal. La activación observada es superior en el núcleo si se compara con el citoplasma de las células tratadas.
- 4.- La actividad antiapoptótica de GDNF-TTC se ha observado hasta las 72 horas, tiempo en el que la actividad de BDNF-TTC ha desaparecido, independientemente de la dosis utilizada.
- 5.- Debido a la diferencia en el tiempo de actuación observada entre ambas proteínas, se propone la aplicación de un tratamiento combinado en animales modelo, con altas dosis de BDNF-TTC, que actuarán de forma temprana, y bajas de GDNF-TTC, que inhibirán la apoptosis durante más tiempo.
- 6.- El fragmento C de la toxina tetánica presenta un efecto antiapoptótica sobre la línea Neuro 2A. Son necesaria futuras investigaciones que permitan clarificar su efecto en la supervivencia neuronal.



6.- BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA.

- "A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III)." (1999). *Neurology* 52(7): 1427-33.
- "A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group." (1996). *Neurology* 46(5): 1244-9.
- **Adler, R., K. B. Landa, y cols.**(1979). "Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons." *Science* 204(4400): 1434-6.
- **Aebischer, P., M. Schluep, y cols.**(1996). "Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients." *Nat Med* 2(6): 696-9.
- **Ahnert-Hilger, G., U. Weller, y cols.**(1989). "The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis." *FEBS Lett* 242(2): 245-8.
- **Airaksinen, M. S. and M. Saarma** (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." *Nat Rev Neurosci* 3(5): 383-94.
- **Airaksinen, M. S., A. Titievsky, y cols.**(1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" *Mol Cell Neurosci* 13(5): 313-25.
- **Akerud, P., J. Alberch, y cols.**(1999). "Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons." *J Neurochem* 73(1): 70-8.
- **Akerud, P., J. M. Canals, y cols.**(2001). "Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease." *J Neurosci* 21(20): 8108-18.
- **Alcantara, S., J. Frisen, y cols.**(1997). "TrkB signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death." *J Neurosci* 17(10): 3623-33.
- **Al-Chalabi, A., P. M. Andersen, y cols.**(1999). "Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis." *Hum Mol Genet* 8(2): 157-64.
- **Al-Chalabi, A., P. M. Andersen, y cols.**(1999). "Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis." *Hum Mol Genet* 8(2): 157-64.
- **Altar, C. A. and P. S. DiStefano** (1998). "Neurotrophin trafficking by anterograde transport." *Trends Neurosci* 21(10): 433-7.
- **Andjelkovic, M., D. R. Alessi, y cols.**(1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." *J Biol Chem* 272(50): 31515-24.
- **Apfel, S. C.** (2002). "Is the therapeutic application of neurotrophic factors dead?" *Ann Neurol* 51(1): 8-11.
- **Appel, S. H., R. G. Smith, y cols.**(1995). "Autoimmunity as an etiological factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Adv Neurol* 68: 47-57.
- **Arakawa, Y., M. Sendtner, y cols.**(1990). "Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines." *J Neurosci* 10(11): 3507-15.
- **Arce, V., R. A. Pollock, y cols.**(1998). "Synergistic effects of schwann- and muscle-derived factors on motoneuron survival involve GDNF and cardiotrophin-1 (CT-1)." *J Neurosci* 18(4): 1440-8.

- **Baloh, R. H., H. Enomoto, y cols.**(2000). "The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development." *Curr Opin Neurobiol* 10(1): 103-10.
- **Baloh, R. H., M. G. Tansey, y cols.**(1998). "Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex." *Neuron* 21(6): 1291-302.
- **Bamji, S. X., M. Majdan, y cols.**(1998). "The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death." *J Cell Biol* 140(4): 911-23.
- **Barbin, G., M. Manthorpe, y cols.**(1984). "Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor." *J Neurochem* 43(5): 1468-78.
- **Barde, Y. A., D. Edgar, y cols.**(1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." *Embo J* 1(5): 549-53.
- **Bazan, J. F.** (1991). "Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold." *Neuron* 7(2): 197-208.
- **Beal, M. F.** (2000). "Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases." *Trends Neurosci* 23(7): 298-304.
- **Beal, M. F., R. J. Ferrante, y cols.**(1997). "Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 42(4): 644-54.
- **Beaude, P., A. Delacour, y cols.**(1990). "Retrograde axonal transport of an exogenous enzyme covalently linked to B-IIb fragment of tetanus toxin." *Biochem J* 271(1): 87-91.
- **Beaulieu, J. M. and J. P. Julien** (2003). "Peripherin-mediated death of motor neurons rescued by overexpression of neurofilament NF-H proteins." *J Neurochem* 85(1): 248-56.
- **Beaulieu, J. M., M. D. Nguyen, y cols.**(1999). "Late onset death of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin." *J Cell Biol* 147(3): 531-44.
- **Beaulieu, J. M., J. Robertson, y cols.**(1999). "Interactions between peripherin and neurofilaments in cultured cells: disruption of peripherin assembly by the NF-M and NF-H subunits." *Biochem Cell Biol* 77(1): 41-5.
- **Beckman, J. S., M. Carson, y cols.**(1993). "ALS, SOD and peroxynitrite." *Nature* 364(6438): 584.
- **Benisty, S., F. Boissiere, y cols.**(1998). "trkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study." *Neuroscience* 86(3): 813-26.
- **Bensimon, G., L. Lacomblez, y cols.**(1994). "A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group." *N Engl J Med* 330(9): 585-91.
- **Berger, M. M., N. Kopp, y cols.**(2000). "Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS." *Neurology* 54(1): 20-5.
- **Bergeron, C., K. Beric-Maskarel, y cols.**(1994). "Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons." *J Neuropathol Exp Neurol* 53(3): 221-30.
- **Berkemeier, L. R., T. Ozcelik, y cols.**(1992). "Human chromosome 19 contains the neurotrophin-5 gene locus and three related genes that may encode novel acidic neurotrophins." *Somat Cell Mol Genet* 18(3): 233-45.
- **Bermingham, N., R. Hillermann, y cols.**(1995). "Human glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5." *Hum Genet* 96(6): 671-3.
- **Bhattacharyya, A., F. L. Watson, y cols.**(1997). "Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system." *J Neurosci* 17(18): 7007-16.
- **Bibel, M. and Y. A. Barde** (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." *Genes Dev* 14(23): 2919-37.

- **Bilderback, T. R., V. R. Gazula, y cols.**(1999). "Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways." *J Biol Chem* 274(1): 257-63.
- **Bilderback, T. R., R. J. Grigsby, y cols.**(1997). "Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin- induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae." *J Biol Chem* 272(16): 10922-7.
- **Bittner, M. A., B. R. DasGupta, y cols.**(1989). "Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis. Studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells." *J Biol Chem* 264(18): 10354-60.
- **Bittner, M. A., W. H. Habig, y cols.**(1989). "Isolated light chain of tetanus toxin inhibits exocytosis: studies in digitonin-permeabilized cells." *J Neurochem* 53(3): 966-8.
- **Bizon, J. L., J. C. Lauterborn, y cols.**(1999). "Subpopulations of striatal interneurons can be distinguished on the basis of neurotrophic factor expression." *J Comp Neurol* 408(2): 283-98.
- **Bizzini, B., P. Grob, y cols.**(1981). "Papain-derived fragment IIc of tetanus toxin: its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport." *Brain Res* 210(1-2): 291-9.
- **Bizzini, B., P. Grob, y cols.**(1980). "Use of the B-IIb tetanus toxin derived fragment as a specific neuropharmacological transport agent." *Brain Res* 193(1): 221-7.
- **Bizzini, B., K. Stoeckel, y cols.**(1977). "An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems." *J Neurochem* 28(3): 529-42.
- **Blanco, V., J. Lopez Camelo, y cols.**(2001). "Growth inhibition, morphological differentiation and stimulation of survival in neuronal cell type (Neuro-2a) treated with trophic molecules." *Cell Biol Int* 25(9): 909-17.
- **Blaustein, R. O., W. J. Germann, y cols.**(1987). "The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers." *FEBS Lett* 226(1): 115-20.
- **Boccellino, M., F. Cuccovillo, y cols.**(2003). "Styrene-7,8-oxide activates a complex apoptotic response in neuronal PC12 cell line." *Carcinogenesis* 24(3): 535-40.
- **Bordet, T., L. Castelnau-Ptakhine, y cols.**(2001). "Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment." *Mol Cell Neurosci* 17(5): 842-54.
- **Borthwick, G. M., M. A. Johnson, y cols.**(1999). "Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death." *Ann Neurol* 46(5): 787-90.
- **Bourin, M., D. J. David, y cols.**(2002). "[Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives]." *Therapie* 57(4): 385-96.
- **Bowling, A. C., J. B. Schulz, y cols.**(1993). "Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurochem* 61(6): 2322-5.
- **Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- **Brodski, C., H. Schnurch, y cols.**(2000). "Neurotrophin-3 promotes the cholinergic differentiation of sympathetic neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17): 9683-8.
- **Brownawell, A. M., G. J. Kops, y cols.**(2001). "Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX." *Mol Cell Biol* 21(10): 3534-46.
- **Brunet, A., A. Bonni, y cols.**(1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* 96(6): 857-68.
- **Burnham, P., J. C. Louis, y cols.**(1994). "Effects of ciliary neurotrophic factor on the survival and response to nerve growth factor of cultured rat sympathetic neurons." *Dev Biol* 161(1): 96-106.

- **Butowt, R. and C. S. von Bartheld** (2001). "Sorting of internalized neurotrophins into an endocytic transcytosis pathway via the Golgi system: Ultrastructural analysis in retinal ganglion cells." *J Neurosci* 21(22): 8915-30.
- **Cabot, J. B., J. Carroll, y cols.**(1991). "Localization of cardiac parasympathetic preganglionic neurons in the medulla oblongata of pigeon, *Columba livia*: a study using fragment C of tetanus toxin." *Brain Res* 544(1): 162-8.
- **Canossa, M., O. Griesbeck, y cols.**(1997). "Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity- dependent neuronal plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13279-86.
- **Carpenter, S.** (1968). "Proximal axonal enlargement in motor neuron disease." *Neurology* 18(9): 841-51.
- **Carri, M. T., A. Ferri, y cols.**(1997). "Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells." *FEBS Lett* 414(2): 365-8.
- **Carriedo, S. G., S. L. Sensi, y cols.**(2000). "AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro." *J Neurosci* 20(1): 240-50.
- **Carroll, P., G. R. Lewin, y cols.**(1998). "A role for BDNF in mechanosensation." *Nat Neurosci* 1(1): 42-6.
- **Casaccia-Bonnel, P., B. D. Carter, y cols.**(1996). "Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75." *Nature* 383(6602): 716-9.
- **Casademunt, E., B. D. Carter, y cols.**(1999). "The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death." *Embo J* 18(21): 6050-61.
- **Causing, C. G., A. Gloster, y cols.**(1997). "Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF." *Neuron* 18(2): 257-67.
- **Cellerino, A., P. Carroll, y cols.**(1997). "Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." *Mol Cell Neurosci* 9(5-6): 397-408.
- **Cermelli, C., M. Vinceti, y cols.**(2003). "Risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with seropositivity for herpesviruses and echovirus-7." *Eur J Epidemiol* 18(2): 123-7.
- **Chavan, S., S. Kodoth, y cols.**(2001). "The HIV protease inhibitor Indinavir inhibits cell-cycle progression in vitro in lymphocytes of HIV-infected and uninfected individuals." *Blood* 98(2): 383-9
- **Chance, P. F., B. A. Rabin, y cols.**(1998). "Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34." *Am J Hum Genet* 62(3): 633-40.
- **Chao, M. V. and M. Bothwell** (2002). "Neurotrophins: to cleave or not to cleave." *Neuron* 33(1): 9-12.
- **Chapman, B. S.** (1995). "A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas." *FEBS Lett* 374(2): 216-20.
- **Cheng, A., S. Wang, y cols.**(2003). "Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons." *J Biol Chem* 278(9): 7591-9.
- **Chittka, A. and M. V. Chao** (1999). "Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10705-10.

- **Chou, S. M., H. S. Wang, y cols.**(1998). "Advanced glycation endproducts in neurofilament conglomeration of motoneurons in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Mol Med* 4(5): 324-32.
- **Cleveland, D. W. and J. Liu** (2000). "Oxidation versus aggregation - how do SOD1 mutants cause ALS?" *Nat Med* 6(12): 1320-1.
- **Coen, L., R. Osta, y cols.**(1997). "Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17): 9400-5.
- **Coffer, P. J., J. Jin, y cols.**(1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." *Biochem J* 335 (Pt 1): 1-13.
- **Collard, J. F., F. Cote, y cols.**(1995). "Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* 375(6526): 61-4.
- **Conner, J. M., J. C. Lauterborn, y cols.**(1997). "Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport." *J Neurosci* 17(7): 2295-313.
- **Corbo, M. and A. P. Hays** (1992). "Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease." *J Neuropathol Exp Neurol* 51(5): 531-7.
- **Corson, L. B., J. J. Strain, y cols.**(1998). "Chaperone-facilitated copper binding is a property common to several classes of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6361-6.
- **Cote, F., J. F. Collard, y cols.**(1993). "Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." *Cell* 73(1): 35-46.
- **Couillard-Despres, S., Q. Zhu, y cols.**(1998). "Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9626-30.
- **Coulson, E. J., K. Reid, y cols.**(1999). "p75 neurotrophin receptor-mediated neuronal death is promoted by Bcl-2 and prevented by Bcl-xL." *J Biol Chem* 274(23): 16387-91.
- **Cristina, N., C. Chatellard-Causse, y cols.**(1995). "GDNF: existence of a second transcript in the brain." *Brain Res Mol Brain Res* 32(2): 354-7.
- **Crow, J. P., J. B. Sampson, y cols.**(1997). "Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite." *J Neurochem* 69(5): 1936-44.
- **Crowder, R. J. and R. S. Freeman** (1998). "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons." *J Neurosci* 18(8): 2933-43.
- **Cunningham, M. E. and L. A. Greene** (1998). "A function-structure model for NGF-activated TRK." *Embo J* 17(24): 7282-93.
- **Dale, S. M., R. Z. Kuang, y cols.**(1995). "Corticospinal motor neurons in the adult rat: degeneration after intracortical axotomy and protection by ciliary neurotrophic factor (CNTF)." *Exp Neurol* 135(1): 67-73.
- **Datta, S. R., H. Dudek, y cols.**(1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery." *Cell* 91(2): 231-41.
- **Davey, F. and A. M. Davies** (1998). "TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons." *Curr Biol* 8(16): 915-8.
- **Davis, S., T. H. Aldrich, y cols.**(1991). "The receptor for ciliary neurotrophic factor." *Science* 253(5015): 59-63.
- **de Paiva, A., B. Poulain, y cols.**(1993). "A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that

- binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly." *J Biol Chem* 268(28): 20838-44.
- **Demaerschalk, B. M. and M. J. Strong** (2000). "Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Curr Treat Options Neurol* 2(1): 13-22.
 - **Deng, H. X., A. Hentati, y cols.**(1993). "Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase." *Science* 261(5124): 1047-51.
 - **Desnuelle, C., M. Dib, y cols.**(2001). "A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2(1): 9-18.
 - **Dijkers, P. F., R. H. Medema, y cols.**(2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." *Curr Biol* 10(19): 1201-4.
 - **Dittrich, F., G. Ochs, y cols.**(1996). "Pharmacokinetics of intrathecally applied BDNF and effects on spinal motoneurons." *Exp Neurol* 141(2): 225-39.
 - **Dobrenis, K., A. Joseph, y cols.**(1992). "Neuronal lysosomal enzyme replacement using fragment C of tetanus toxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2297-301.
 - **Donovan, J. J. and J. L. Middlebrook** (1986). "Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes." *Biochemistry* 25(10): 2872-6.
 - **Downward, J.** (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 262-7.
 - **Durham, H. D., J. Roy, y cols.**(1997). "Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS." *J Neuropathol Exp Neurol* 56(5): 523-30.
 - **Easton, J. B., N. M. Moody, y cols.**(1999). "Brain-derived neurotrophic factor induces phosphorylation of fibroblast growth factor receptor substrate 2." *J Biol Chem* 274(16): 11321-7.
 - **Eckenstein, F. P., F. Esch, y cols.**(1990). "Purification and characterization of a trophic factor for embryonic peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors." *Neuron* 4(4): 623-31.
 - **Eckenstein, F. P., F. Esch, y cols.**(1990). "Purification and characterization of a trophic factor for embryonic peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors." *Neuron* 4(4): 623-31.
 - **Eide, F. F., E. R. Vining, y cols.**(1996). "Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling." *J Neurosci* 16(10): 3123-9.
 - **Eketjall, S., M. Fainzilber, y cols.**(1999). "Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex." *Embo J* 18(21): 5901-10.
 - **Elliott, J. L. and W. D. Snider** (1995). "Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons." *Neuroreport* 6(3): 449-52.
 - **Enomoto, H., R. O. Heuckeroth, y cols.**(2000). "Development of cranial parasympathetic ganglia requires sequential actions of GDNF and neurturin." *Development* 127(22): 4877-89.
 - **Erickson, J. T., T. A. Brose, y cols.**(2001). "Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo." *J Neurosci* 21(2): 581-9.
 - **Ernsberger, U. and H. Rohrer** (1988). "Neuronal precursor cells in chick dorsal root ganglia: differentiation and survival in vitro." *Dev Biol* 126(2): 420-32.
 - **Escandon, E., D. Soppet, y cols.**(1994). "Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development." *J Neurosci* 14(4): 2054-68.

- **Estevez, A. G., J. P. Crow, y cols.**(1999). "Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc- deficient superoxide dismutase." *Science* 286(5449): 2498-500.
- **Estevez, A. G., N. Spear, y cols.**(1998). "Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation." *J Neurosci* 18(3): 923-31.
- **Evinger, C. and J. T. Erichsen** (1986). "Transsynaptic retrograde transport of fragment C of tetanus toxin demonstrated by immunohistochemical localization." *Brain Res* 380(2): 383-8.
- **Eyer, J., D. W. Cleveland, y cols.**(1998). "Pathogenesis of two axonopathies does not require axonal neurofilaments." *Nature* 391(6667): 584-7.
- **Fagan, A. M., H. Zhang, y cols.**(1996). "TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo." *J Neurosci* 16(19): 6208-18.
- **Feinstein, E., A. Kimchi, y cols.**(1995). "The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions." *Trends Biochem Sci* 20(9): 342-4.
- **Ferracci, F., G. Fassetta, y cols.**(1999). "A novel antineuronal antibody in a motor neuron syndrome associated with breast cancer." *Neurology* 53(4): 852-5.
- **Ferrante, R. J., L. A. Shinobu, y cols.**(1997). "Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation." *Ann Neurol* 42(3): 326-34.
- **Figlewicz, D. A., A. Krizus, y cols.**(1994). "Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis." *Hum Mol Genet* 3(10): 1757-61.
- **Figueiredo, D. M., R. A. Hallewell, y cols.**(1997). "Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport." *Exp Neurol* 145(2 Pt 1): 546-54.
- **Fishman, P. S. and D. R. Carrigan** (1987). "Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin." *Brain Res* 406(1-2): 275-9.
- **Fishman, P. S., D. A. Farrand, y cols.**(1992). "A simplified method for the preparation of tetanus toxin binding fragment for neurobiology." *J Neurosci Methods* 42(3): 229-36.
- **Fishman, P. S. and J. M. Savitt** (1989). "Transsynaptic transfer of retrogradely transported tetanus protein- peroxidase conjugates." *Exp Neurol* 106(2): 197-203.
- **Fiszman, M. L.** (2003). "Neuroprotección y factores neurotróficos." *Revista Neurológica Argentina* 28: 6-10.
- **Frade, J. M. and Y. A. Barde** (1999). "Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord." *Development* 126(4): 683-90.
- **Frade, J. M., A. Rodriguez-Tebar, y cols.**(1996). "Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor." *Nature* 383(6596): 166-8.
- **Francis, J. W., B. A. Hosler, y cols.**(1995). "CuZn superoxide dismutase (SOD-1):tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells." *J Biol Chem* 270(25): 15434-42.
- **Franke, T. F., D. R. Kaplan, y cols.**(1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." *Cell* 88(4): 435-7.
- **Friedlander, R. M., R. H. Brown, y cols.**(1997). "Inhibition of ICE slows ALS in mice." *Nature* 388(6637): 31.
- **Friedman, B., D. Kleinfeld, y cols.**(1995). "BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons." *J Neurosci* 15(2): 1044-56.
- **Friedman, W. J. and L. A. Greene** (1999). "Neurotrophin signaling via Trks and p75." *Exp Cell Res* 253(1): 131-42.

- **Fukuzono, S., K. Fujimori, y cols.**(1995). "Production of biologically active mature brain-derived neurotrophic factor in *Escherichia coli*." *Biosci Biotechnol Biochem* 59(9): 1727-31.
- **Fundin, B. T., A. Mikaels, y cols.**(1999). "A rapid and dynamic regulation of GDNF-family ligands and receptors correlate with the developmental dependency of cutaneous sensory innervation." *Development* 126(12): 2597-610.
- **Gambale, F. and M. Montal** (1988). "Characterization of the channel properties of tetanus toxin in planar lipid bilayers." *Biophys J* 53(5): 771-83.
- **Ganzini, L., W. S. Johnston, y cols.**(1999). "Correlates of suffering in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology* 52(7): 1434-40.
- **Garces, A., G. Haase, y cols.**(2000). "GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron." *J Neurosci* 20(13): 4992-5000.
- **Gearing, D. P. and A. G. Bruce** (1992). "Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor." *New Biol* 4(1): 61-5.
- **Gearing, D. P., M. R. Comeau, y cols.**(1992). "The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor." *Science* 255(5050): 1434-7.
- **Giehl, K. M., S. Rohrig, y cols.**(2001). "Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons in vivo." *J Neurosci* 21(10): 3492-502.
- **Giehl, K. M., C. M. Schacht, y cols.**(1997). "GDNF is a trophic factor for adult rat corticospinal neurons and promotes their long-term survival after axotomy in vivo." *Eur J Neurosci* 9(11): 2479-88.
- **Giehl, K. M., A. Schutte, y cols.**(1998). "The survival-promoting effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on axotomized corticospinal neurons in vivo is mediated by an endogenous brain-derived neurotrophic factor mechanism." *J Neurosci* 18(18): 7351-60.
- **Gil, C., I. Chaib-Oukadour, y cols.**(2003). "C-terminal fragment of the tetanus toxin heavy chain activates Akt and MEK/ERK signaling pathways in a Trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons." *Biochem J* 23.
- **Golden, J. P., R. H. Baloh, y cols.**(1998). "Expression of neurturin, GDNF, and their receptors in the adult mouse CNS." *J Comp Neurol* 398(1): 139-50.
- **Golden, J. P., J. A. DeMaro, y cols.**(1999). "Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse." *Exp Neurol* 158(2): 504-28.
- **Gonatas, N. K., J. O. Gonatas, y cols.**(1998). "The involvement of the Golgi apparatus in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, and ricin intoxication." *Histochem Cell Biol* 109(5-6): 591-600.
- **Gooch, C. L. and Y. Harati** (2000). "Motor unit number estimation, ALS and clinical trials." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1(2): 71-82.
- **Gordon, P. H., L. P. Rowland, y cols.**(1997). "Lymphoproliferative disorders and motor neuron disease: an update." *Neurology* 48(6): 1671-8.
- **Gough, N. M., D. P. Gearing, y cols.**(1988). "Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(8): 2623-7.
- **Grimes, M. L., J. Zhou, y cols.**(1996). "Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes." *J Neurosci* 16(24): 7950-64.
- **Grimm, L., E. Holinski-Feder, y cols.**(1998). "Analysis of the human GDNF gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products." *Hum Mol Genet* 7(12): 1873-86.
- **Grondin, R. and D. M. Gash** (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease." *J Neurol* 245(11 Suppl 3): 35-42.

- **Guegan, C., M. Vila, y cols.**(2001). "Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurosci* 21(17): 6569-76.
- **Gurney, M. E., F. B. Cutting, y cols.**(1996). "Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 39(2): 147-57.
- **Gurney, M. E., H. Pu, y cols.**(1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." *Science* 264(5166): 1772-5.
- **Gurtu, V., S. R. Kain, y cols.**(1997). "Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis." *Anal Biochem* 251(1): 98-102.
- **Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, y cols.** (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* 302(5644): 415-9.
- **Hadano, S., C. K. Hand, y cols.**(2001). "A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2." *Nat Genet* 29(2): 166-73.
- **Hadari, Y. R., H. Kouhara, y cols.**(1998). "Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation." *Mol Cell Biol* 18(7): 3966-73.
- **Hafezparast, M., R. Klocke, y cols.**(2003). "Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport." *Science* 300(5620): 808-12.
- **Hagg, T. and S. Varon** (1993). "Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13): 6315-9.
- **Halban, P. A. and J. C. Irminger** (1994). "Sorting and processing of secretory proteins." *Biochem J* 299(Pt 1): 1-18.
- **Hallbook, F.** (1999). "Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families." *Curr Opin Neurobiol* 9(5): 616-21.
- **Halpern, J. L., W. H. Habig, y cols.**(1990). "Cloning and expression of functional fragment C of tetanus toxin." *Infect Immun* 58(4): 1004-9.
- **Halpern, J. L. and A. Loftus** (1993). "Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin." *J Biol Chem* 268(15): 11188-92.
- **Hamilton, J. F., P. F. Morrison, y cols.**(2001). "Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin." *Exp Neurol* 168(1): 155-61.
- **Harter, C. and C. Reinhard** (2000). "The secretory pathway from history to the state of the art." *Subcell Biochem* 34: 1-38.
- **Hays, A. P., A. Roxas, y cols.**(1990). "A monoclonal IgA in a patient with amyotrophic lateral sclerosis reacts with neurofilaments and surface antigen on neuroblastoma cells." *J Neuropathol Exp Neurol* 49(4): 383-98.
- **Heerssen, H. M. and R. A. Segal** (2002). "Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction." *Trends Neurosci* 25(3): 160-5.
- **Heinrich, P. C., I. Behrmann, y cols.**(2003). "Principles of IL-6-type cytokine signalling and its regulation." *Biochem J* 29.
- **Heller, S., T. P. Finn, y cols.**(1995). "Analysis of function and expression of the chick GPA receptor (GPAR alpha) suggests multiple roles in neuronal development." *Development* 121(8): 2681-93.
- **Helting, T. B. and O. Zwisler** (1977). "Structure of tetanus toxin. I. Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments." *J Biol Chem* 252(1): 187-93.
- **Helting, T. B., O. Zwisler, y cols.**(1977). "Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside." *J Biol Chem* 252(1): 194-8.

- **Henderson, C. E., W. Camu, y cols.**(1993). "Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud." *Nature* 363(6426): 266-70.
- **Hentati, A., K. Bejaoui, y cols.**(1994). "Linkage of recessive familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 2q33-q35." *Nat Genet* 7(3): 425-8.
- **Hentati, A., K. Ouahchi, y cols.**(1998). "Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers." *Neurogenetics* 2(1): 55-60.
- **Hirano, A., H. Donnerfeld, y cols.**(1984). "Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neuropathol Exp Neurol* 43(5): 461-70.
- **Hoch, D. H., M. Romero-Mira, y cols.**(1985). "Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(6): 1692-6.
- **Holgado-Madruga, M., D. K. Moscatello, y cols.**(1997). "Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12419-24.
- **Homburg, C. H., M. de Haas, y cols.**(1995). "Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro." *Blood* 85(2): 532-40.
- **Honig, L. S., D. D. Chambliss, y cols.**(2000). "Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls." *Neurology* 55(8): 1082-8.
- **Hosler, B. A., T. Siddique, y cols.**(2000). "Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22." *Jama* 284(13): 1664-9.
- **Hottinger, A. F., M. Azzouz, y cols.**(2000). "Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus." *J Neurosci* 20(15): 5587-93.
- **Hughes, R. A., M. Sendtner, y cols.**(1993). "Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo." *J Neurosci Res* 36(6): 663-71.
- **Ibanez, C. F.** (1998). "Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors." *Trends Neurosci* 21(10): 438-44.
- **Ibanez, C. F.** (2002). "Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF." *Trends Neurosci* 25(6): 284-6.
- **Ikeda, K., B. Klinkosz, y cols.**(1995). "Effects of brain-derived neurotrophic factor on motor dysfunction in wobbler mouse motor neuron disease." *Ann Neurol* 37(4): 505-11.
- **Ince, P. G., J. Lowe, y cols.**(1998). "Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology." *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(2): 104-17.
- **Ince, P. G., J. Tomkins, y cols.**(1998). "Amyotrophic lateral sclerosis associated with genetic abnormalities in the gene encoding Cu/Zn superoxide dismutase: molecular pathology of five new cases, and comparison with previous reports and 73 sporadic cases of ALS." *J Neuropathol Exp Neurol* 57(10): 895-904.
- **Ip, N. Y., C. F. Ibanez, y cols.**(1992). "Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7): 3060-4.
- **Irie, S., T. Hachiya, y cols.**(1999). "Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation." *FEBS Lett* 460(2): 191-8.
- **Iwasaki, Y. and K. Ikeda** (1999). "[Cotreatment of amyotrophic lateral sclerosis patients]." *Rinsho Shinkeigaku* 39(12): 1253-5
- **Jin, G., N. Omori, y cols.**(2002). "Activation of cell-survival signal Akt by GDNF in normal rat brain." *Brain Res* 958(2): 429-33.

- **Jing, S., P. Tapley, y cols.**(1992). "Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors." *Neuron* 9(6): 1067-79.
- **Jing, S., D. Wen, y cols.**(1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." *Cell* 85(7): 1113-24.
- **Jones, K. R. and L. F. Reichardt** (1990). "Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20): 8060-4.
- **Jongen, J. L., E. Dalm, y cols.**(1999). "Depletion of GDNF from primary afferents in adult rat dorsal horn following peripheral axotomy." *Neuroreport* 10(4): 867-71.
- **Julien, J. P. and J. M. Beaulieu** (2000). "Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects?" *J Neurol Sci* 180(1-2): 7-14.
- **Kalra, S., A. Genge, y cols.**(2003). "A prospective, randomized, placebo-controlled evaluation of corticoneuronal response to intrathecal BDNF therapy in ALS using magnetic resonance spectroscopy: feasibility and results." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(1): 22-6.
- **Kaplan, D. R., B. L. Hempstead, y cols.**(1991). "The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor." *Science* 252(5005): 554-8.
- **Kaplan, D. R. and F. D. Miller** (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." *Curr Opin Neurobiol* 10(3): 381-91.
- **Kaspar, B. K., J. Llado, y cols.**(2003). "Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model." *Science* 301(5634): 839-42.
- **Kawamoto, Y., S. Nakamura, y cols.**(2000). "Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human central nervous system." *Neuroscience* 100(4): 701-12.
- **Kennedy, S. G., E. S. Kandel, y cols.**(1999). "Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria." *Mol Cell Biol* 19(8): 5800-10.
- **Kernie, S. G., D. J. Liebl, y cols.**(2000). "BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice." *Embo J* 19(6): 1290-300.
- **Kessler, J. A., W. H. Ludlam, y cols.**(1993). "Cytokine-induced programmed death of cultured sympathetic neurons." *Neuron* 11(6): 1123-32.
- **Khatib, A. M., G. Siegfried, y cols.**(2002). "Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy." *Am J Pathol* 160(6): 1921-35.
- **Khwaja, S., N. Sripathi, y cols.**(1998). "Paraneoplastic motor neuron disease with type 1 Purkinje cell antibodies." *Muscle Nerve* 21(7): 943-5.
- **Kikuchi, S., A. Ogata, y cols.**(2000). "Detection of an Amadori product, 1-hexitol-lysine, in the anterior horn of the amyotrophic lateral sclerosis and spinobulbar muscular atrophy spinal cord: evidence for early involvement of glycation in motoneuron diseases." *Acta Neuropathol (Berl)* 99(1): 63-6.
- **Kim, H. Y., M. Akbar, y cols.** (2001). "Inhibition of neuronal apoptosis by polyunsaturated fatty acids." *J Mol Neurosci* 16(2-3): 223-7; discussion 279-84.
- **Kishino, A., Y. Ishige, y cols.**(1997). "BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth." *Exp Neurol* 144(2): 273-86.
- **Kitagawa, H., T. Hayashi, y cols.**(1998). "Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats." *Stroke* 29(7): 1417-22.
- **Klein, R., S. Q. Jing, y cols.**(1991). "The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor." *Cell* 65(1): 189-97.
- **Knusel, B., H. Gao, y cols.**(1997). "Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons." *Neuroscience* 78(3): 851-62.

- Koh, J. Y., B. J. Gwag, y cols.(1995). "Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins." *Science* 268(5210): 573-5.
- **Kokaia, Z., J. Bengzon, y cols.**(1993). "Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6711-5.
- **Koliatsos, V. E., R. E. Clatterbuck, y cols.**(1993). "Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo." *Neuron* 10(3): 359-67.
- **Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, y cols.**(1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." *Blood* 84(5): 1415-20.
- **Kordower, J. H., M. E. Emborg, y cols.**(2000). "Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease." *Science* 290(5492): 767-73.
- **Kordower, J. H., S. Palfi, y cols.**(1999). "Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease." *Ann Neurol* 46(3): 419-24.
- **Kostic, V., V. Jackson-Lewis, y cols.**(1997). "Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis." *Science* 277(5325): 559-62.
- **Kotzbauer, P. T., P. A. Lampe, y cols.**(1996). "Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor." *Nature* 384(6608): 467-70.
- **Kouhara, H., Y. R. Hadari, y cols.**(1997). "A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway." *Cell* 89(5): 693-702.
- **Lacomblez, L., G. Bensimon, y cols.**(1996). "A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole Study Group-II." *Neurology* 47(6 Suppl 4): S242-50.
- **Lalli, G. and G. Schiavo** (2002). "Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR." *J Cell Biol* 156(2): 233-9.
- **Lamballe, F., R. Klein, y cols.**(1991). "trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3." *Cell* 66(5): 967-79.
- **Lang, T., D. Bruns, y cols.**(2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." *Embo J* 20(9): 2202-13.
- **Lee, K. F., A. M. Davies, y cols.**(1994). "p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF." *Development* 120(4): 1027-33.
- **Lee, K. F., E. Li, y cols.**(1992). "Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system." *Cell* 69(5): 737-49.
- **Lee, R., P. Kermani, y cols.**(2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." *Science* 294(5548): 1945-8.
- **Lefebvre, S. and W. E. Mushynski** (1988). "Characterization of the cation-binding properties of porcine neurofilaments." *Biochemistry* 27(22): 8503-8.
- **Leibrock, J., F. Lottspeich, y cols.**(1989). "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor." *Nature* 341(6238): 149-52.
- **Lessmann, V., K. Gottmann, y cols.**(2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." *Prog Neurobiol* 69(5): 341-74.
- **Levi-Montalcini, R.** (1987). "The nerve growth factor 35 years later." *Science* 237(4819): 1154-62.
- **Levi-Montalcini, R. and B. Booker** (1960). "Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by antiserum to a nerve growth protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 46: 384-391.

- **Levi-Montalcini, R. and V. Hamburger** (1951). "Selective growth stimulation effects of sarcoma on the sensory and sympathetic system of the chick embryo." *J Exp Zool* 116: 321-62.
- **Li, L., R. W. Oppenheim, y cols.**(1994). "Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse." *J Neurobiol* 25(7): 759-66.
- **Li, M., V. O. Ona, y cols.**(2000). "Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model." *Science* 288(5464): 335-9.
- **Liew, O. W., A. B. Choo, y cols.**(1997). "Parameters influencing the expression of mature glial-cell-line-derived neurotrophic factor in *Escherichia coli*." *Biotechnol Appl Biochem* 25(Pt 3): 223-33.
- **Lin, C. L., L. A. Bristol, y cols.**(1998). "Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis." *Neuron* 20(3): 589-602.
- **Lin, L. F., D. H. Doherty, y cols.**(1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." *Science* 260(5111): 1130-2.
- **Lin, L. F., T. J. Zhang, y cols.**(1994). "Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line- derived neurotrophic factor." *J Neurochem* 63(2): 758-68.
- **Lindahl, M., D. Poteryaev, y cols.**(2001). "Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells." *J Biol Chem* 276(12): 9344-51.
- **Linnarsson, S., A. Bjorklund, y cols.**(1997). "Learning deficit in BDNF mutant mice." *Eur J Neurosci* 9(12): 2581-7.
- **Liu, X., P. Ernfors, y cols.**(1995). "Sensory but not motor neuron deficits in mice lacking NT4 and BDNF." *Nature* 375(6528): 238-41.
- **Loeb, D. M., R. M. Stephens, y cols.**(1994). "A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth." *J Biol Chem* 269(12): 8901-10.
- **Lohof, A. M., N. Y. Ip, y cols.**(1993). "Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF." *Nature* 363(6427): 350-3.
- **Lu, P., A. Blesch, y cols.**(2001). "Neurotrophism without neurotropism: BDNF promotes survival but not growth of lesioned corticospinal neurons." *J Comp Neurol* 436(4): 456-70.
- **Lu, Y. Y., L. J. Wang, y cols.**(2003). "Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport." *Neurosci Res* 45(1): 33-40.
- **Lynch, T., M. Sano, y cols.**(1994). "Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex." *Neurology* 44(10): 1878-84.
- **Lyons, W. E., L. A. Mamounas, y cols.**(1999). "Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15239-44.
- **Magal, E., J. C. Louis, y cols.**(1993). "CNTF promotes the survival of neonatal rat corticospinal neurons in vitro." *Neuroreport* 4(6): 779-82.
- **Mahadeo, D., L. Kaplan, y cols.**(1994). "High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors." *J Biol Chem* 269(9): 6884-91.
- **Maisonpierre, P. C., M. M. Le Beau, y cols.**(1991). "Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations." *Genomics* 10(3): 558-68.

- **Majdan, M., C. Lachance, y cols.**(1997). "Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis." *J Neurosci* 17(18): 6988-98.
- **Mamounas, L. A., C. A. Altar, y cols.**(2000). "BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain." *J Neurosci* 20(2): 771-82.
- **Manabe, Y., I. Nagano, y cols.**(2003). "Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis." *Neurol Res* 25(2): 195-200.
- **Manning, K. A., J. T. Erichsen, y cols.**(1990). "Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin." *Neuroscience* 34(1): 251-63.
- **Mari, Y. M., A. E. Espinosa, y cols.**(1999). "Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*." *Biochem Biophys Res Commun* 258(1): 29-31.
- **Martin, L. J.** (1999). "Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism." *J Neuropathol Exp Neurol* 58(5): 459-71.
- **Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, y cols.**(1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." *J Exp Med* 182(5): 1545-56.
- **Marty, S., P. Berzaghi Mda, y cols.**(1997). "Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons." *Trends Neurosci* 20(5): 198-202.
- **Matsuo, A., S. Nakamura, y cols.**(2000). "Immunohistochemical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-1 in the rat brain: confirmation of expression in various neuronal systems." *Brain Res* 859(1): 57-71.
- **Mattson, M. P.** (2003). "Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders." *Neuromolecular Med* 3(2): 65-94.
- **McAllister, A. K., L. C. Katz, y cols.**(1996). "Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity." *Neuron* 17(6): 1057-64.
- **McAllister, A. K., D. C. Lo, y cols.**(1995). "Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex." *Neuron* 15(4): 791-803.
- **McDonald, N. Q. and W. A. Hendrickson** (1993). "A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif." *Cell* 73(3): 421-4.
- **Meakin, S. O., J. I. MacDonald, y cols.**(1999). "The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation." *J Biol Chem* 274(14): 9861-70.
- **Meier, R., D. R. Alessi, y cols.**(1997). "Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta." *J Biol Chem* 272(48): 30491-7.
- **Meng, X., M. Lindahl, y cols.**(2000). "Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF." *Science* 287(5457): 1489-93.
- **Menguy, T., S. Chenevois, y cols.**(1998). "Ligand binding to macromolecules or micelles: use of centrifugal ultrafiltration to measure low-affinity binding." *Anal Biochem* 264(2): 141-8.
- **Merighi, A.** (2002). "Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS." *Prog Neurobiol* 66(3): 161-90.
- **Meyer, M., I. Matsuoka, y cols.**(1992). "Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA." *J Cell Biol* 119(1): 45-54.

- **Meyer, S. L., D. M. Lang, y cols.**(1994). "Production and characterization of recombinant mouse brain-derived neurotrophic factor and rat neurotrophin-3 expressed in insect cells." *J Neurochem* 62(3): 825-33.
- **Meyer, T., B. Alber, y cols.**(2003). "High rate of constitutional chromosomal rearrangements in apparently sporadic ALS." *Neurology* 60(8): 1348-50.
- **Meyer, T., A. Fromm, y cols.**(1999). "The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals." *J Neurol Sci* 170(1): 45-50.
- **Miana-Mena, F. J., M. J. Munoz, y cols.**(2003). "Fragment C tetanus toxin: a putative activity-dependent neuroanatomical tracer." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 63(3): 211-8.
- **Miana-Mena, F. J., S. Roux, y cols.**(2002). "Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 3234-9.
- **Milbrandt, J., F. J. de Sauvage, y cols.**(1998). "Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin." *Neuron* 20(2): 245-53.
- **Miller, R. G.** (1999). "Carrell-Krusen Symposium invited lecture. Clinical trials in motor neuron diseases." *J Child Neurol* 14(3): 173-9.
- **Miller, R. G., D. H. Moore, 2nd, y cols.**(2001). "Phase III randomized trial of gabapentin in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Neurology* 56(7): 843-8.
- **Miller, R. G., J. H. Petajan, y cols.**(1996). "A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group." *Ann Neurol* 39(2): 256-60.
- **Minichiello, L., F. Casagrande, y cols.**(1998). "Point mutation in trkB causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses." *Neuron* 21(2): 335-45.
- **Minichiello, L. and R. Klein** (1996). "TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons." *Genes Dev* 10(22): 2849-58.
- **Minichiello, L., M. Korte, y cols.**(1999). "Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning." *Neuron* 24(2): 401-14.
- **Mitsuma, N., M. Yamamoto, y cols.**(1999). "Expression of GDNF receptor (RET and GDNFR-alpha) mRNAs in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Brain Res* 820(1-2): 77-85.
- **Mitsumoto, H., K. Ikeda, y cols.**(1994). "Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF." *Science* 265(5175): 1107-10.
- **Mitsumoto, H., K. Ikeda, y cols.**(1994). "The effects of ciliary neurotrophic factor on motor dysfunction in wobbler mouse motor neuron disease." *Ann Neurol* 36(2): 142-8.
- **Mitsumoto, H. and K. Tsuzaka** (1999). "Neurotrophic factors and neuro-muscular disease: II. GDNF, other neurotrophic factors, and future directions." *Muscle Nerve* 22(8): 1000-21.
- **Mochida, S., B. Poulain, y cols.**(1989). "Light chain of tetanus toxin intracellularly inhibits acetylcholine release at neuro-neuronal synapses, and its internalization is mediated by heavy chain." *FEBS Lett* 253(1-2): 47-51.
- **Montal, M. S., R. Blewitt, y cols.**(1992). "Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of tetanus and botulinum neurotoxins." *FEBS Lett* 313(1): 12-8.
- **Montecucco, C., E. Papini, y cols.**(1994). "Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism." *FEBS Lett* 346(1): 92-8.
- **Montecucco, C. and G. Schiavo** (1995). "Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins." *Q Rev Biophys* 28(4): 423-72.
- **Moris, G. and J. A. Vega** (2003). "[Neurotrophic factors: basis for their clinical application]." *Neurologia* 18(1): 18-28.

- **Morris, N. P., E. Consiglio, y cols.**(1980). "Interaction of fragments B and C of tetanus toxin with neural and thyroid membranes and with gangliosides." *J Biol Chem* 255(13): 6071-6.
- **Mowla, S. J., H. F. Farhadi, y cols.**(2001). "Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor." *J Biol Chem* 276(16): 12660-6.
- **Moyle, W. R., R. K. Campbell, y cols.**(1994). "Co-evolution of ligand-receptor pairs." *Nature* 368(6468): 251-5.
- **Mukai, J., T. Hachiya, y cols.**(2000). "NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR." *J Biol Chem* 275(23): 17566-70.
- **Munson, J. B. and S. B. McMahon** (1997). "Effects of GDNF on axotomized sensory and motor neurons in adult rats." *Eur J Neurosci* 9(6): 1126-9.
- **Murer, M. G., F. Boissiere, y cols.**(1999). "An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease." *Neuroscience* 88(4): 1015-32.
- **Murer, M. G., Q. Yan, y cols.**(2001). "Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* 63(1): 71-124.
- **Murphy, M., R. Dutton, y cols.**(1997). "Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system." *Prog Neurobiol* 52(5): 355-78.
- **Murphy, M., K. Reid, y cols.**(1993). "Involvement of leukemia inhibitory factor and nerve growth factor in the development of dorsal root ganglion neurons." *Development* 117(3): 1173-82.
- **Murphy, P. L., S. M. Albert, y cols.**(2000). "Impact of spirituality and religiousness on outcomes in patients with ALS." *Neurology* 55(10): 1581-4.
- **Nagai, M., K. Abe, y cols.**(1998). "Identification of alternative splicing forms of GLT-1 mRNA in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients." *Neurosci Lett* 244(3): 165-8.
- **Narisawa-Saito, M., K. Wakabayashi, y cols.**(1996). "Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease." *Neuroreport* 7(18): 2925-8.
- **Negro, A., A. Tavella, y cols.**(1994). "Production and characterization of recombinant rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 from insect cells." *J Neurochem* 62(2): 471-8.
- **Nicholson, D. W., A. Ali, y cols.**(1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." *Nature* 376(6535): 37-43.
- **Nicole, O., C. Ali, y cols.**(2001). "Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway." *J Neurosci* 21(9): 3024-33.
- **Ninkina, N., J. Adu, y cols.**(1996). "Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons." *Embo J* 15(23): 6385-93.
- **Nishino, J., K. Mochida, y cols.**(1999). "GFR alpha3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion." *Neuron* 23(4): 725-36.
- **Nja, A. and D. Purves** (1978). "The effects of nerve growth factor and its antiserum on synapses in the superior cervical ganglion of the guinea-pig." *J Physiol* 277: 55-75.
- **Novikov, L., L. Novikova, y cols.**(1995). "Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion." *Neurosci Lett* 200(1): 45-8.
- **Novikov, L., L. Novikova, y cols.**(1997). "Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo." *Neuroscience* 79(3): 765-74.

- **Ochs, G., R. D. Penn, y cols.**(2000). "A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1(3): 201-6.
- **Olmsted, J. B., K. Carlson, y cols.**(1970). "Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(1): 129-36.
- **Olney, R. K., E. C. Yuen, y cols.**(2000). "Statistical motor unit number estimation: reproducibility and sources of error in patients with amyotrophic lateral sclerosis." *Muscle Nerve* 23(2): 193-7.
- **Oppenheim, R. W., L. J. Houenou, y cols.**(2000). "Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes." *J Neurosci* 20(13): 5001-11.
- **Paratcha, G., F. Ledda, y cols.**(2001). "Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts." *Neuron* 29(1): 171-84.
- **Paratcha, G., F. Ledda, y cols.**(2003). "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands." *Cell* 113(7): 867-79.
- **Peacock, S. L., C. M. McIver, y cols.**(1981). "Transformation of E. coli using homopolymer-linked plasmid chimeras." *Biochim Biophys Acta* 655(2): 243-50.
- **Penn, R. D., J. S. Kroin, y cols.**(1997). "Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial)." *Neurosurgery* 40(1): 94-9; discussion 99-100.
- **Penner, R., E. Neher, y cols.**(1986). "Intracellularly injected tetanus toxin inhibits exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells." *Nature* 324(6092): 76-8.
- **Pennica, D., V. Arce, y cols.**(1996). "Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons." *Neuron* 17(1): 63-74.
- **Pennica, D., K. L. King, y cols.**(1995). "Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1142-6.
- **Pennica, D., K. J. Shaw, y cols.**(1995). "Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex." *J Biol Chem* 270(18): 10915-22.
- **Perrelet, D., A. Ferri, y cols.**(2002). "IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons in vivo." *Nat Cell Biol* 4(2): 175-9.
- **Pezeshki, G., B. Franke, y cols.**(2001). "Evidence for a ligand-specific signaling through GFRalpha-1, but not GFRalpha-2, in the absence of Ret." *J Neurosci Res* 66(3): 390-5.
- **Phillips, H. S., J. M. Hains, y cols.**(1991). "BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease." *Neuron* 7(5): 695-702.
- **Phillips, H. S., J. M. Hains, y cols.**(1990). "Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons." *Science* 250(4978): 290-4.
- **Pioro, E. P., A. W. Majors, y cols.**(1999). "1H-MRS evidence of neurodegeneration and excess glutamate + glutamine in ALS medulla." *Neurology* 53(1): 71-9.
- **Pochon, N. A., A. Menoud, y cols.**(1997). "Neuronal GDNF expression in the adult rat nervous system identified by in situ hybridization." *Eur J Neurosci* 9(3): 463-71.
- **Poulain, B., L. Tauc, y cols.**(1988). "Neurotransmitter release is blocked intracellularly by botulinum neurotoxin, and this requires uptake of both toxin polypeptides by a process mediated by the larger chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(11): 4090-4.
- **Pozniak, C. D., S. Radinovic, y cols.**(2000). "An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death." *Science* 289(5477): 304-6.

- **Price, D. L., J. Griffin, y cols.**(1975). "Tetanus toxin: direct evidence for retrograde intraaxonal transport." *Science* 188(4191): 945-7.
- **Pullen, A. H. and P. Humphreys** (2000). "Ultrastructural analysis of spinal motoneurons from mice treated with IgG from ALS patients, healthy individuals, or disease controls." *J Neurol Sci* 180(1-2): 35-45.
- **Ramer, M. S., J. V. Priestley, y cols.**(2000). "Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord." *Nature* 403(6767): 312-6.
- **Reaume, A. G., J. L. Elliott, y cols.**(1996). "Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury." *Nat Genet* 13(1): 43-7.
- **Riccio, A., B. A. Pierchala, y cols.**(1997). "An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons." *Science* 277(5329): 1097-100.
- **Richards, L. J., T. J. Kilpatrick, y cols.**(1996). "Leukaemia inhibitory factor or related factors promote the differentiation of neuronal and astrocytic precursors within the developing murine spinal cord." *Eur J Neurosci* 8(2): 291-9.
- **Ripps, M. E., G. W. Huntley, y cols.**(1995). "Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 689-93.
- **Riviere, M., V. Meininger, y cols.**(1998). "An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole." *Arch Neurol* 55(4): 526-8.
- **Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, y cols.**(1990). "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor." *Neuron* 4(4): 487-92.
- **Rosen, D. R., T. Siddique, y cols.**(1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* 362(6415): 59-62.
- **Rothstein, J. D.** (1995). "Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." *Adv Neurol* 68: 7-20.
- **Rothstein, J. D.** (1995). "Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis." *Clin Neurosci* 3(6): 348-59.
- **Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, y cols.**(1996). "Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate." *Neuron* 16(3): 675-86.
- **Rothstein, J. D., G. Tsai, y cols.**(1990). "Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 28(1): 18-25.
- **Rouleau, G. A., A. W. Clark, y cols.**(1996). "SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 39(1): 128-31.
- **Rowland, L. P.** (1998). "Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Sci* 160 Suppl 1: S6-24.
- **Rowland, L. P. and N. A. Shneider** (2001). "Amyotrophic lateral sclerosis." *N Engl J Med* 344(22): 1688-700.
- **Ruit, K. G., P. A. Osborne, y cols.**(1990). "Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse." *J Neurosci* 10(7): 2412-9.
- **Sabbatini, P. and F. McCormick** (1999). "Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis." *J Biol Chem* 274(34): 24263-9.
- **Sagot, Y., S. A. Tan, y cols.**(1996). "GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice." *J Neurosci* 16(7): 2335-41.
- **Salehi, A. H., P. P. Roux, y cols.**(2000). "NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis." *Neuron* 27(2): 279-88.

- **Sambrook, J., E. F. Fritsch, y cols.**(1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*.
- **Sarker, K. P., K. Abeyama, y cols.**(1999). "Inhibition of thrombin-induced neuronal cell death by recombinant thrombomodulin and E5510, a synthetic thrombin receptor signaling inhibitor." *Thromb Haemost* 82(3): 1071-7.
- **Sawai, H., D. B. Clarke, y cols.**(1996). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells." *J Neurosci* 16(12): 3887-94.
- **Schiavo, G., E. Papini, y cols.**(1990). "An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin." *Infect Immun* 58(12): 4136-41.
- **Schindelhauer, D., S. Schuffenhauer, y cols.**(1995). "The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p12-p13.1." *Genomics* 28(3): 605-7.
- **Schwartz, P. M., P. R. Borghesani, y cols.**(1997). "Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning." *Neuron* 19(2): 269-81.
- **Segal, R. A. and M. E. Greenberg** (1996). "Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors." *Annu Rev Neurosci* 19: 463-89.
- **Seidah, N. G., S. Benjannet, y cols.**(1996). "Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases." *FEBS Lett* 379(3): 247-50.
- **Sendtner, M., P. Carroll, y cols.**(1994). "Ciliary neurotrophic factor." *J Neurobiol* 25(11): 1436-53.
- **Sendtner, M., B. Holtmann, y cols.**(1992). "Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section." *Nature* 360(6406): 757-9.
- **Sendtner, M., G. W. Kreutzberg, y cols.**(1990). "Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy." *Nature* 345(6274): 440-1.
- **Sendtner, M., G. Pei, y cols.**(2000). "Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors." *Cell Tissue Res* 301(1): 71-84.
- **Senger, D. L. and R. B. Campenot** (1997). "Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures." *J Cell Biol* 138(2): 411-21.
- **Shapiro, R. E., C. D. Specht, y cols.**(1997). "Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand." *J Biol Chem* 272(48): 30380-6.
- **Shaw, P. J., V. Forrest, y cols.**(1995). "CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients." *Neurodegeneration* 4(2): 209-16.
- **Shaw, P. J. and P. G. Ince** (1997). "Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol* 244 Suppl 2: S3-14.
- **Shone, C. C., P. Hambleton, y cols.**(1987). "A 50-kDa fragment from the NH₂-terminus of the heavy subunit of Clostridium botulinum type A neurotoxin forms channels in lipid vesicles." *Eur J Biochem* 167(1): 175-80.
- **Siklos, L., J. I. Engelhardt, y cols.**(1998). "Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice." *J Neuropathol Exp Neurol* 57(6): 571-87.
- **Silani, V., M. Braga, y cols.**(2001). "The pathogenesis of ALS: implications for treatment strategies." *Neurol Neurochir Pol* 35(1): 25-39.
- **Silani, V. and N. Leigh** (2003). "STEM CELL THERAPY FOR ALS: HOPE and REALITY." *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4(1): 8-10.
- **Simmons, Z., B. A. Bremer, y cols.**(2000). "Quality of life in ALS depends on factors other than strength and physical function." *Neurology* 55(3): 388-92.

- **Smirnova, I. V., S. X. Zhang, y cols.**(1998). "Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons." *J Neurobiol* 36(1): 64-80.
- **Smith, P. K., R. I. Krohn, y cols.**(1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
- **Snider, W. D.** (1994). "Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us." *Cell* 77(5): 627-38.
- **Snider, W. D. and S. B. McMahon** (1998). "Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors." *Neuron* 20(4): 629-32.
- **Soilu-Hanninen, M., P. Ekert, y cols.**(1999). "Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway." *J Neurosci* 19(12): 4828-38.
- **Springer, J. E., J. L. Seeburger, y cols.**(1995). "cDNA sequence and differential mRNA regulation of two forms of glial cell line-derived neurotrophic factor in Schwann cells and rat skeletal muscle." *Exp Neurol* 131(1): 47-52.
- **Squinto, S. P., T. N. Stitt, y cols.**(1991). "trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor." *Cell* 65(5): 885-93.
- **Stahl, N. and G. D. Yancopoulos** (1994). "The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines." *J Neurobiol* 25(11): 1454-66.
- **Stephens, R. M., D. M. Loeb, y cols.**(1994). "Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses." *Neuron* 12(3): 691-705.
- **Sterneck, E., D. R. Kaplan, y cols.**(1996). "Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells." *J Neurochem* 67(4): 1365-74.
- **Stucky, C. L. and M. Koltzenburg** (1997). "The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons." *J Neurosci* 17(11): 4398-405.
- **Suzuki, H., A. Hase, y cols.**(1998). "Prominent expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in human skeletal muscle." *J Comp Neurol* 402(3): 303-12.
- **Takahashi, M.** (2001). "The GDNF/RET signaling pathway and human diseases." *Cytokine Growth Factor Rev* 12(4): 361-73.
- **Taraviras, S., C. V. Marcos-Gutierrez, y cols.**(1999). "Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system." *Development* 126(12): 2785-97.
- **Thorne, R. G. and W. H. Frey, 2nd** (2001). "Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations." *Clin Pharmacokinet* 40(12): 907-46.
- **Timmusk, T., N. Belluardo, y cols.**(1994). "Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain." *Neuroscience* 60(2): 287-91.
- **Timmusk, T., U. Lendahl, y cols.**(1995). "Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice." *J Cell Biol* 128(1-2): 185-99.
- **Traynor, B. J., M. B. Codd, y cols.**(2000). "Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study." *Arch Neurol* 57(8): 1171-6.
- **Trotti, D., A. Rolfs, y cols.**(1999). "SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter." *Nat Neurosci* 2(5): 427-33.

- **Troy, C. M., K. Brown, y cols.**(1990). "Ontogeny of the neuronal intermediate filament protein, peripherin, in the mouse embryo." *Neuroscience* 36(1): 217-37.
- **Troy, C. M., N. A. Muma, y cols.**(1990). "Regulation of peripherin and neurofilament expression in regenerating rat motor neurons." *Brain Res* 529(1-2): 232-8.
- **Trupp, M., R. Scott, y cols.**(1999). "Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells." *J Biol Chem* 274(30): 20885-94.
- **Tu, P. H., P. Raju, y cols.** (1996). "Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 3155-60.
- **Turgeon, V. L. and L. J. Houenou** (1999). "Prevention of thrombin-induced motoneuron degeneration with different neurotrophic factors in highly enriched cultures." *J Neurobiol* 38(4): 571-80.
- **Turgeon, V. L., C. E. Milligan, y cols.** (1999). "Activation of the protease-activated thrombin receptor (PAR)-1 induces motoneuron degeneration in the developing avian embryo." *J Neuropathol Exp Neurol* 58(5): 499-504.
- **Tuszynski, M. H., J. Roberts, y cols.** (1996). "Gene therapy in the adult primate brain: intraparenchymal grafts of cells genetically modified to produce nerve growth factor prevent cholinergic neuronal degeneration." *Gene Ther* 3(4): 305-14.
- **Van der Valk, J. B. and H. P. Vijverberg** (1990). "Glutamate-induced inward current in a clonal neuroblastoma cell line." *Eur J Pharmacol* 185(1): 99-102.
- **Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi** (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* 346 Pt 3: 561-76.
- **Vanselow, B. K. and B. U. Keller** (2000). "Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurones from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)- related motoneurone disease." *J Physiol* 525 Pt 2: 433-45.
- **Vermes, I., C. Haanen, y cols.**(1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J Immunol Methods* 184(1): 39-51.
- **Vincent, A. and D. B. Drachman** (1996). "Amyotrophic lateral sclerosis and antibodies to voltage-gated calcium channels--new doubts." *Ann Neurol* 40(5): 691-3.
- **Walker, M. P., R. Schlager, y cols.**(2001). "Absence of echovirus sequences in brain and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients." *Ann Neurol* 49(2): 249-53.
- **Wang, T., K. Xie, y cols.**(1995). "Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses." *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4796-805.
- **Wang, W., P. M. Salvaterra, y cols.**(1997). "Brain-derived neurotrophic factor spares choline acetyltransferase mRNA following axotomy of motor neurons in vivo." *J Neurosci Res* 47(2): 134-43.
- **Wang, Y., S. Z. Lin, y cols.**(1997). "Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia- induced injury in the cerebral cortex." *J Neurosci* 17(11): 4341-8.
- **Warita, H., Y. Manabe, y cols.**(2001). "Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene." *Apoptosis* 6(5): 345-52.
- **Weible, M. W., 2nd, S. E. Bartlett, y cols.**(2001). "Prolonged recycling of internalized neurotrophins in the nerve terminal." *Cytometry* 43(3): 182-8.
- **Weller, U., M. E. Dausenroth, y cols.**(1991). "Cooperative action of the light chain of tetanus toxin and the heavy chain of botulinum toxin type A on the transmitter release of mammalian motor endplates." *Neurosci Lett* 122(1): 132-4.

- **Weller, U., C. F. Taylor, y cols.**(1986). "Quantitative comparison between tetanus toxin, some fragments and toxoid for binding and axonal transport in the rat." *Toxicon* 24(11-12): 1055-63.
- **Wellmer, A., V. P. Misra, y cols.**(2001). "A double-blind placebo-controlled clinical trial of recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rhBDNF) in diabetic polyneuropathy." *J Peripher Nerv Syst* 6(4): 204-10.
- **Wiese, S., F. Metzger, y cols.**(1999). "The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons." *Eur J Neurosci* 11(5): 1668-76.
- **Willard, M. and C. Simon** (1983). "Modulations of neurofilament axonal transport during the development of rabbit retinal ganglion cells." *Cell* 35(2 Pt 1): 551-9.
- **Williams, T. L., N. C. Day, y cols.**(1997). "Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* 42(2): 200-7.
- **Williamson, T. L., L. I. Bruijn, y cols.**(1998). "Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9631-6.
- **Wong, P. C., C. A. Pardo, y cols.**(1995). "An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria." *Neuron* 14(6): 1105-16.
- **Wong, P. C., D. Waggoner, y cols.**(2000). "Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2886-91.
- **Wong, V., R. Arriaga, y cols.**(1993). "The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5, but not NGF, up-regulate the cholinergic phenotype of developing motor neurons." *Eur J Neurosci* 5(5): 466-74.
- **Woodbury, D., D. G. Schaar, y cols.**(1998). "Novel structure of the human GDNF gene." *Brain Res* 803(1-2): 95-104.
- **Worrall, B. B., L. P. Rowland, y cols.**(2000). "Amyotrophy in prion diseases." *Arch Neurol* 57(1): 33-8.
- **Wright, J. H., P. Drueckes, y cols.**(1997). "A role for the SHP-2 tyrosine phosphatase in nerve growth-induced PC12 cell differentiation." *Mol Biol Cell* 8(8): 1575-85.
- **Wyatt, S., L. G. Pinon, y cols.**(1997). "Sympathetic neuron survival and TrkA expression in NT3-deficient mouse embryos." *Embo J* 16(11): 3115-23.
- **Xu, B., K. Zang, y cols.**(2000). "Cortical degeneration in the absence of neurotrophin signaling: dendritic retraction and neuronal loss after removal of the receptor TrkB." *Neuron* 26(1): 233-45.
- **Xu, Z., L. C. Cork, y cols.**(1993). "Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease." *Cell* 73(1): 23-33.
- **Yamada, M., H. Ohnishi, y cols.**(1997). "Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons." *J Biol Chem* 272(48): 30334-9.
- **Yamamoto, M., G. Sobue, y cols.**(1996). "Expression of glial cell line-derived growth factor mRNA in the spinal cord and muscle in amyotrophic lateral sclerosis." *Neurosci Lett* 204(1-2): 117-20.
- **Yamashita, T., K. L. Tucker, y cols.**(1999). "Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth." *Neuron* 24(3): 585-93.

- **Yan, Q., J. Elliott, y cols.**(1992). "Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death." *Nature* 360(6406): 753-5.
- **Yan, Q., J. L. Elliott, y cols.**(1993). "Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo." *J Neurobiol* 24(12): 1555-77.
- **Yang, Y., A. Hentati, y cols.**(2001). "The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis." *Nat Genet* 29(2): 160-5.
- Yoon, S. O., P. Casaccia-Bonnel, y cols.(1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." *J Neurosci* 18(9): 3273-81.
- **Zarling, J. M., M. Shoyab, y cols.**(1986). "Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24): 9739-43.
- **Zhang, Y., D. R. Olsen, y cols.**(1998). "Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* 12(2): 159-65.
- **Zhu, S., I. G. Stavrovskaya, y cols.**(2002). "Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice." *Nature* 417(6884): 74-8.
- **Zwick, M., L. Teng, y cols.**(2001). "Overexpression of GDNF induces and maintains hyperinnervation of muscle fibers and multiple end-plate formation." *Exp Neurol* 171(2): 342-50.