



Biología Celular, Genética
y Fisiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga

Instituto de Investigación
Biomédica de Málaga

ESTRÉS OXIDATIVO COMO DIANA DE TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por FRANCISCO MANUEL GARCÍA GUIRADO
Licenciado en Biología
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Málaga**

Málaga, 2015



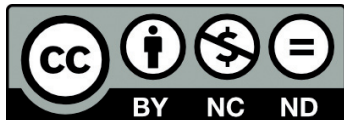


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Francisco Manuel García Guirado

 <http://orcid.org/0000-0003-1662-2691>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Doña YOLANDA DE DIEGO OTERO, Doctora en Biología, coordinadora del grupo PAIDI CTS-546 y CoIR del grupo de Investigación en Salud Mental del área 2 del IBIMA.

CERTIFICA que Don FRANCISCO MANUEL GARCÍA GUIRADO, licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA el trabajo titulado: **“ESTRÉS OXIDATIVO COMO DIANA DE TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Málaga, 14 de Octubre de 2015

Dra. Yolanda de Diego Otero
Directora



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Don FRANCISCO JAVIER RUIZ ALBERT, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICA que Don FRANCISCO MANUEL GARCÍA GUIRADO, licenciado en Biología por la Universidad de Málaga, ha realizado bajo su tutoría y en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA el trabajo titulado: **“ESTRÉS OXIDATIVO COMO DIANA DE TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Málaga, 14 de Octubre de 2015

Dr. Francisco Javier Ruiz Albert
Tutor



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Yo, FRANCISCO MANUEL GARCÍA GUIRADO, declaro que soy autor del presente trabajo de investigación titulado **“ESTRÉS OXIDATIVO COMO DIANA DE TRATAMIENTO EXPERIMENTAL DEL SÍNDROME X FRÁGIL”**, y que ha sido realizado en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, bajo la dirección de la Dra. Yolanda de Diego Otero, y como tutor al Dr. Francisco Javier Ruiz Albert.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga, 14 de Octubre de 2015.

Fdo. Francisco Manuel García Guirado



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo gracias a la financiación del siguiente proyecto de Excelencia de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía:

- Nuevas dianas terapéuticas para el Síndrome X frágil: Mecanismos moleculares mediados por proteínas Rho-GTPasas y NADPH-oxidasa, ensayos experimentales en modelos animales transgénicos y en humanos.
Consejería de Economía, Innovación y Ciencia. **P10-CTS-05704**
Fecha: 2011-2016
Investigador principal: M^a Yolanda de Diego Otero.

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas.

ARTICULOS

- de Diego-Otero Y, Calvo-Medina R, Quintero-Navarro C, Sánchez-Salido L, **García-Guirado F**, del Arco-Herrera I, Fernández-Carvajal I, Ferrando-Lucas T, Caballero-Andaluz R, Pérez-Costillas L.
A combination of ascorbic acid and α -tocopherol to test the effectiveness and safety in the fragile X syndrome: study protocol for a phase II, randomized, placebo-controlled trial.
Trials. 2014 Sep 3; 15:345.
- Lima-Cabello, E. **García-Guirado F.**, Pérez-Costillas L. Calvo-Medina R, Quintero-Navarro C., el Bekay-Rizky R., Sánchez-Salido L. and de Diego-Otero Y.
An abnormal nitric oxide metabolism contributes to brain oxidative stress in the mouse model for the Fragile X Syndrome, a possible role in intellectual disability.
Oxidative Medicine and Cellular Longevity. En prensa. 2015.

- el Bekay-Rizky R, **García-Guirado F.**, Calvo-Medina R., Sánchez-Salido L., Pérez-Costillas L. and de Diego-Otero Y.

Rac1-GTPase abnormal regulation in brain areas from the Fragile X mouse model, new target to treat anxiety and cognition

Neuronal plasticity. En revisión 2015.

CAPÍTULO DE LIBRO

Coordinadoras: Isabel García Alonso. Begoña Medina Gómez y Yolanda de Diego Otero.

Todo sobre el Síndrome X frágil. Guía para familias y profesionales.

*CAPÍTULO 5 Tratamiento psicofarmacológico actual y ensayos de tratamiento experimental. Autores: Yolanda de Diego Otero y **Francisco Manuel García Guirado.***

Altaria publicaciones. Serie: Aula inclusiva. 2014. ISBN: 978-84-941845-7-4

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes presentaciones en congresos y reuniones científicas.

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Carolina Quintero, Rocio Calvo Medina, Lourdes Sánchez Salido, Elena Lima Cabello, **Francisco García Guirado**, Isabel Fernández Carvajal, Lucia Pérez Costillas

Título: A phase II randomized placebo-controlled double-blind pilot clinical trial to test the safety and effectiveness of Ascorbic acid and Alpha-tocopherol on behavioral and learning problems in the Fragile X syndrome.

Congreso: National Fragile X Foundation 13th International Fragile X Conference.

Poster No. 0118-000105

Lugar de Celebración: Continental Conference Center. Miami. Florida. USA
28-29 Julio 2012.

- Autores: Lucía Pérez Costillas, Carolina Quintero, Rocío Calvo Medina, Lourdes Sánchez Salido, Elena Lima Cabello, **Francisco García Guirado**, Isabel Fernández Carvajal, Yolanda de Diego Otero.

Ponencia: Ensayo Clínico piloto fase II, aleatorizado y controlado con placebo a doble ciego para evaluar seguridad y efectividad de los antioxidantes ácido ascórbico y alfa-tocoferol sobre los problemas de comportamiento y aprendizaje del síndrome de X frágil.

Congreso: XVI Congreso Nacional de Psiquiatría

Poster No. PO-417

Lugar de Celebración: Palacio de Congresos y de la Música. Bilbao. 25-28 Septiembre 2012

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Carolina Quintero, Rocio Calvo Medina, **Francisco García Guirado**, Lourdes Sánchez Salido, Elena Lima Cabello, Isabel Fernández Carvajal, Lucia Pérez Costillas.

Ponencia: A randomized placebo-controlled double-blind pilot clinical trial to test the effectiveness of Ascorbic acid and Alpha-tocopherol on learning problems in males affected of the Fragile X syndrome.

Congreso: Jacques Monod Conference «Mechanisms of Intellectual Disability: from genes to treatment».

Conferencia código: CJM 06

Lugar de celebración: Roscoff, Brittany, (Francia). 3-7 Octubre 2012.

- Autores: Yolanda de Diego Otero, Carolina Quintero, Rocío Calvo Medina, Lourdes Sánchez Salido, **Francisco García Guirado**, Lucia Pérez Costillas, Isabel Fernández Carvajal

Ponencia: A phase III clinical trial to test the effectiveness of Ascorbic acid and Alpha-tocopherol on the Fragile X Syndrome.

Congreso: European Human Genetics Conference

Lugar de celebración: May 31-June 3, 2014. Milan. Italy. (Control No. 2014-A-475-ESHG) *Comunicación* J08.11

Publicación: *European Journal of human Genetics*. 2014. Vol. 22 Supl.1: 425.

- Autores: **Francisco García Guirado**, Elena Lima Cabello, Rajaa el Bekay Rizky, Rocio Calvo Medina, Carolina Quintero Navarro, Isabel Fernández Carvajal, Lucia Pérez Costillas, Yolanda de Diego Otero.
Ponencia: An Abnormal nitric oxide metabolism contributes to brain oxidative stress in the mouse model for the Fragile X syndrome, a pathophysiological role in intellectual disability.
Congreso: 17th International Fragile X and other Early-Onset Cognitive Disorders Workshop
Lugar de Celebración: IGBMC. Illkirch, Strasbourg. France. 27-30/10/2015.
- Autores: Yolanda de Diego Otero, Lucia Pérez Costillas, Rocio Calvo Medina, Carolina Quintero Navarro, Lourdes Sánchez, **Francisco García Guirado**, Isabel Benítez del Pino, Isabel Fernández Carvajal.
Ponencia: Fragile X syndrome treatment with ascorbic acid and Alpha-Tocopherol: a phase III clinical trial.
Congreso: 17th International Fragile X and other Early-Onset Cognitive Disorders Workshop
Lugar de Celebración: IGBMC. Illkirch, Strasbourg. France. 27-30/10/2015.

A mis padres

"No cesaremos de explorar. Pues al final de toda exploración llegaremos donde empezamos,
y conoceremos cuál es nuestro lugar por primera vez"

Thomas Stearns Eliot (1888 – 1965)



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Las pipetas dejan paso a las palabras y son muchas las que he escrito sobre el Síndrome X Frágil. Ahora en las postrimerías de este otoño malagueño, me acerco a la obtención del título de Doctor (PhD) y, por tanto, a la consecución de un sueño. Es en este momento en el cual quiero que el estéril blanco del folio se convierte en palabras de agradecimiento. Se que estás palabras que escribo no llegarán a cumplir mis expectativas, ya que no serán capaces de transmitir todo el agradecimiento que tengo.

A mi familia, Papá, Mamá y Nacho, pilares que sois de mi, de mi educación, de mi ser, de mi forma de actuar y de mi manera de entender a la vida. Sin vosotros a mi lado no me entiendo. No hay en este mundo papel que soporte la infinita gratitud que tengo hacia vosotros. Cada palabra de ánimo han sido para mi alma, un cosquilleo y se ha sentido en el corazón como una sístole de esperanza.

Mamá y Papá, en vuestros desvelos y en vuestras palabras siempre encuentro el apoyo necesario que me hace crecer. Por vosotros he llegado hasta aquí y a vosotros os brindo todo lo que hago. Mi mayor orgullo es decir que mis padres están leyendo estas líneas y que han puesto lo mejor que tenían, en todo momento, para ayudarme a que esto se haga realidad.

Nacho, Rocío y Alba gracias por estar conmigo y por darme los momentos de alegría, necesarios para poder seguir investigando. Como algo tan pequeño hace que quiera sacar lo mejor de mi.

Cuando hablas de alguien y se te llena los pensamientos de alegría, cuando piensas en esa persona y quieres hacer lo mejor, cuando en esos momentos donde desearías romper con todo y después de una palabra de ella quieres arreglarlo todo, cuando esa persona te acompaña y te da su animo y aliento en el momento adecuado; sabes ya, que esa persona es la mejor. Bea tu lo eres, te agradezco que estés a mi lado en estos momentos y que hayas estado en estos últimos años dando lo mejor que tenias (todo lo que tienes) para hacer que el día de hoy sea una realidad y que me encuentre tan cercano a mi sueño. Muchas gracias por todo el amor y por todo lo que me das. Siempre seremos nosotros.

A Francis, hermano no de carne pero de sentimiento similar (biólogo/cofrade como yo), y Rocío que deciros si desde que comencé a formarme como biólogo

siempre habéis estado y desde los primeros días de la carrera me habéis visto crecer y llegar ser lo que soy. Gracias por el cariño que me dais, la confianza que mostráis en mi y por hacerme vivir unas de las mejores sensaciones que se puede vivir. Tengo en ti, Francis, a un amigo y un hermano.

Pablo y Alex, nunca creí que de la carrera me iban a quedar a dos de los mejores amigos que tengo pues tengo que decir que me equivocaba, yo puedo decir, sin lugar a duda, que tengo a dos compañeros de la carrera que son mis amigos y me siento orgulloso de decir que sois parte de esta tesis doctoral.

A la doctora Yolanda de Diego, gracias, por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis doctoral bajo su dirección y por todos los consejos y enseñanzas que me has brindado durante este tiempo.

Lourdes, ya te dije que ibas a aparecer en estas letras, entre Cajales, Saras Borrel y Severos Ochoas nos pasamos los días de comportamiento y de tratamiento en el animalario. Atesoraré y guardaré cada una de las palabras, consejos y gesto de comprensión que has tenido conmigo. Gracias por enseñarme tanto, por darme tan buenos consejos y sobretodo por enseñarme que este trabajo puede ser bonito; sabes de sobra que te deseo lo mejor y que aquí tienes a un amigo.

Guillermo, zamarrillero, cofrade y sobretodo amigo. Gracias por estar allí cuando te he necesitado, por escucharme, por hacerme participe de tu vida y sobretodo por abrirme las puertas de esta casa que es IBIMA. Contigo empezó todo.

Cristina, Elena y Raul, los principios suelen ser difíciles pero con vosotros al lado no resulto nada complicado aprender todas las técnicas necesarias para arrancar. Cristina gracias por escuchar las primeras exposiciones y por darme parte de tu sabiduría en cada consejo. Elena, gracias por tu enseñanza de los westerns y de las PCRs, y Raul gracias por los consejos y ayuada en los primaros días de esta tesis.

Kike y Pedro, pues esto ya esta aquí. Hay gente de las que sabes que nunca vas a olvidar, de las que siempre se tendrá algo que aprender y que son irremplazables. Os acordáis de las noches donde solucionábamos el mundo, o las noches donde me solucionasteis mi mundo; pues es eso lo que ha contribuido a que esta tesis sea una realidad. Me aceptasteis como era y me acogisteis con mi defectos. Vosotros dos sois los que en momentos de debilidad, tuvisteis el coraje de decirme lo que

pensabais, los que me hicisteis que viera las cosas como eran, me mostrasteis la realidad y me centrasteis en lo realmente importante, la ciencia. Nunca una distancia es demasiado grande para que diga que tengo en vosotros a dos grandes amigos (uno un padrazo como el Bernabéu de grande y otro un gran melómano que más lo quisiera Radio 3). Por vosotros siempre escuchare buena música aunque el indi sigue sin ser lo mío. Sois dos de las personas más estupendas que he conocido.

Francis que en estos últimos tiempo has estado cerca y que si quería aprender algo de lo que hacías siempre estabas dispuesta a enseñarme. Gracias por todas tus palabras, tus consejos y sobretodo por sacarme de la rutina del trabajo en los momentos oportunos (seguir tu ritmo es complicado).

Mari Carmen, gracias por escucharme y por la compañía durante la escritura, girarme y ver que estabas me daba seguridad de que lo que estábamos haciendo tenía algún sentido. Rajaa gracias por estar siempre ahí, por escucharme y sobretodo acogerme en el Clínico.

Pablo, técnico auxiliar del laboratorio, gracias por todas las buenas palabras y de que no me faltará ni gloria. La vieja guardia siempre tendrá al mejor guerrero en ti.

No quiero dejar pasar la oportunidad de dar las gracias a todos los compañeros de trabajo del Hospital Civil por cada momento compartido y de ayuda que me habéis dado. He llegado a sentirme querido e integrado en el laboratorio en cada momento, sois geniales y simplemente únicos.

Por ultimo, quiero agradecer a mis Titulares de Zamarrilla su compañía y el haberme guiado a lo largo del periodo de licenciatura y en este periodo predoctoral; gracias por darme una vida llena de aprendizajes, amor, experiencias y sobre todo de felicidad. En cada rezo hacia Ti, Madre, he encontrado fortaleza y el aliento que sólo Tu sabes dar.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO Y EN LAS FIGURAS

- AGG – Triplete de adenina-guanina-guanina
- AMPA - Ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionico
- ANOVA-Análisis de la varianza
- Apo- Apocinina
- RNA Ácido ribonucleico
- mRNA- RNA mensajero
- Cb- Cerebelo
- CGG- Triplete de citosina-guanina-guanina
- CP- Corteza Prefrontal
- DAB – Diaminobencidina
- DI- Discapacidad intelectual
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- DNAc- DNA complementario
- *Fmr-1* - gen de discapacidad intelectual ligado al sitio frágil 1 (*fragile mental retardation*)
- EDTA- ácido etilendiaminotetraacético
- FMRP Proteína codificada por el gen de Fmr1 (*fragile mental retardation protein*)
- FRAXA -Fragilidad A del cromosoma X
- FXTAS - Tremor/ataxia relacionado con el X frágil
- FXPOI -Insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil
- GSH- Glutati3n reducido
- GSSG- Glutati3n oxidado
- Hipoc - Hipocampo
- hnRNP- Ribonucleoproteínas
- KO- *Knockout*
- LTD -Depresi3n a largo plazo
- LTP -Potenciaci3n a largo plazo
- MDA- Ácido malondialdehído

- Mel- Melatonina
- mGluR- Receptor metabotrópico de glutamato
- NES- Señal de exportación nuclear
- NLS- Señal de localización nuclear.
- NMDA- Ácido N-metil-D-aspartato
- NOS - Sintasa del oxido nítrico
- PB- Tampón fosfato
- PBS- Tampón fosfato salino
- PCR -Reacción en cadena de la polimerasa
- Prot- Proteínas
- RNasa- Ribonucleasa
- ROS -Especies reactivas de oxígeno
- RPM- Revoluciones por minuto
- RT-PCR - Reacción en cadena de transcripción reversa-PCR
- SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico
- SMART - Sistema de seguimiento por vídeo que permite registrar comportamiento social
- SNC -Sistema nervioso central
- SXF -Síndrome X Frágil
- TBARS- Sustancias que reaccionan al ácido tíobarbitúrico
- TAE- Buffer Tris-acetato-EDTA
- UV- Ultravioleta
- Vit C- Vitamina C (ácido ascórbico)
- Vit E- Vitamina E (α -tocoferol)
- VTN -Varones transmisores normales
- WB – *Western blot*
- WT- *Wild type*
- Xq27.3- Brazo largo del cromosoma X, región 27.3

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

1.	BREVE RESEÑA HISTÓRICA.....	1
2.	FENOTIPO DEL SÍNDROME X FRÁGIL	3
3.	HERENCIA.....	6
4.	EL GEN <i>FMRI</i>	9
5.	SILENCIAMIENTO GÉNICO DE <i>FMRI</i>	13
6.	LA PROTEÍNA FMRP, “ <i>FRAGILE MENTAL RETARDATION PROTEIN</i> ”	15
7.	CARACTERÍSTICAS DE MODELOS ANIMALES DEL SXF	20
	• ESPINAS DENDRÍTICAS- NEUROTRANSMISIÓN	24
	• EPILEPSIA E HIPERSENSIBILIDAD	26
	• ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD.....	27
	• COMPORTAMIENTO REPETITIVO	27
	• ANSIEDAD	28
	• DEFECTOS COGNITIVOS.....	29
8.	TRATAMIENTO Y ENSAYOS EXPERIMENTALES	31
	• ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUTAMATO.....	32
	• MODULADORES DE N-METIL-D-ASPÁRTICO	34
	• MODULACIÓN AMPA	35
	• MODULACIÓN DE LA SINTASA KINASA GLUCOGÉNICA 3 (GSK3).....	35
	• INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA.....	37
	• MODULADORES DEL ÁCIDO γ -AMINO BUTIRICO (GABA).....	37
	• DIANAS EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR	40
	• REGULACIÓN DE LA MATRIZ DE METALOPEPTIDASA-9 (MMP9)	41
	• RECEPTORES DE CANNABINOIDES	41
9.	EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL SÍNDROME X FRÁGIL	44
	• GENERACIÓN DE ROS Y RNS.....	47
	• DEFENSA ANTIOXIDANTE ENDOGENA	49
	• COMPUESTOS TERAPÉUTICOS ENSAYADOS	52
	○ Inhibidor de la proteína rac 1	52
	○ Vitamina e	54
	○ Vitamina c	55
	○ Apocinina	57
	○ Estatinas	59

HIPÓTESIS EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS

- HIPÓTESIS EXPERIMENTAL 65
- OBJETIVOS 66

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MARCAJE Y GENOTIPADO DE LOS ANIMALES 69
2. TRATAMIENTOS 72
3. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO 73
 - EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO 73
 - RECONOCIMIENTO DE OBJETO 74
 - LABERINTO EN CRUZ ELEVADO 76
 - ANÁLISIS DEL MIEDO CONDICIONADO 77
4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN-BLOT) 79
 - EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL CITOSOL Y MEMBRANAS 79
 - CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD 81
 - PREPARAR EL GEL DE ELECTROFORESIS 82
 - PREPARACIÓN DE LA MUESTRA 83
 - TRATAMIENTO INMUNOQUÍMICO DE LAS MEMBRANAS 84
5. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO 85
 - DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS 86
 - DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA 88
 - MEDIDA DE LAS ESPECIES REACTIVAS 90
6. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN DEL mRNA 91
 - CUANTIFICACIÓN Y MEDICIÓN DE LA PUREZA DEL RNA EXTRAIDO 93
 - PRODUCCIÓN DEL cDNA A PARTIR DEL RNA EXTRAIDO 94
 - MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DETERMINADOS GENES 95
7. FIJACIÓN, PREPARACIÓN E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS SECCIONES CEREBRALES 101
8. ANÁLISIS DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS POR EL MARCAJE DE GOLGI 102
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 103

RESULTADOS

ESTRÉS OXIDATIVO Y METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO.....	107
RAC 1 EN EL SÍNDROME X FRÁGIL	114
TRATAMIENTOS PARA EL SÍNDROME X FRÁGIL.....	120
• TRATAMIENTO CRÓNICO CON EL INHIBIDOR DE RAC1.....	120
• TRATAMIENTO CRÓNICO CON VITAMINAS ANTIOXIDANTES	125
• TRATAMIENTO CRÓNICO CON APOCININA	131
• TRATAMIENTO AGUDO CON ESTATINAS.....	141

DISCUSIÓN

METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL SÍNDROME X FRÁGIL.....	149
RAC1 EN EL SÍNDROME X FRÁGIL Y TRATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE RAC1	154
TRATAMIENTO CON VITAMINAS ANTIOXIDANTES	163
TRATAMIENTO CON APOCININA	167
TRATAMIENTO CON ESTATINAS	170

<u>CONCLUSIONES</u>	173
----------------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	177
----------------------------------	-----



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA

Las últimas estimaciones apuntan que aproximadamente un 3% de la población mundial presenta algún grado de discapacidad intelectual (DI) (Leonard H, Wen, 2002). La discapacidad intelectual podría ser definida como la incapacidad para desarrollar habilidades y destrezas acordes a los estándares normales establecidos por los análisis de inteligencia en la población general, dentro del rango de edad. El Síndrome X Frágil (SXF) se muestra como la causa más frecuente de DI hereditaria (Hagerman PJ, 2008), además de ser la principal enfermedad genética causante de autismo hereditario (Hagerman RJ y col, 2008). En cuanto a la prevalencia en la bibliografía se exponen diferentes cifras, pero generalmente la prevalencia del SXF es de uno cada 2500-4000 en varones mientras que en mujeres se disminuye a una de cada 6000-8000 (Hagerman PJ, 2008). Pero esta enfermedad podría ser más frecuente si se consideran los trastornos de conductas y DI leves (Crawford DC y col, 2002). Los resultados reciente de un meta-análisis indicarían que la prevalencia del SXF hace que baje a un varón de cada 7143 y en el caso de las mujeres sea de cada 11111 (Hunter J y col, 2014).

En 1943, el Síndrome X Frágil (SXF) fue descrito por primera vez por Martin JP & Bell J, que expusieron el primer pedigrí familiar con varios varones con discapacidad intelectual, rasgos faciales y macroorquidismo con una herencia ligada claramente al cromosoma sexual X (Martin JP & Bell J, 1943). Es en 1969 cuando Lubs describe la existencia de un sitio frágil al final del brazo largo del cromosoma X (Xq27.3) en cariotipos de células sanguíneas cultivadas, en una serie de pacientes con discapacidad intelectual asociado al X (Lubs HA, 1969). La existencia de un sitio frágil en el cromosoma X, en un porcentaje de las células de los pacientes, ha permitido distinguir a estos de otros que tienen también discapacidad intelectual, asociado al cromosoma sexual X pero no presentan fragilidad y sirvió durante años como método de diagnóstico. Otra característica frecuente fue la presencia de macroorquidismo (testículos de gran tamaño) en una proporción alta de pacientes varones tras la pubertad, que fue otro rasgo determinante en el diagnóstico de la patología hasta la llegada de las pruebas genéticas por técnicas de Biología molecular (Escalante JA y col., 1971; Turner G y col., 1975).

A pesar de que en 1969 Lubs descubriera el sitio frágil en el brazo largo del cromosoma X en la banda Xq27.3, no fue hasta unos años después cuando se pudieron repetir los experimentos de Lubs. En 1977 Sutherland hace el descubrimiento de que, dependiendo de la composición del medio donde los linfocitos son cultivados, el sitio de rotura se observará o no. Se ve que los medios deficientes en ácido fólico son necesarios para que se manifieste la fragilidad del cromosoma X (Sutherland GR, 1977). Una vez descubierto esto, se prueba en diferentes familias con aparente discapacidad intelectual ligada al X y se observa que está presente en alta proporción (Turner G y col. 1980). De esa manera se establece la presencia del sitio de fragilidad FRAXA, presente en el cromosoma X, como criterio de diagnóstico del síndrome. Sin embargo la presencia de otros 2 sitios frágiles en Xq28, hace poco eficaz esta técnica de diagnóstico ya que patologías diferentes podían confundirse por la presencia de fragilidad, y muchos casos de afectados no mostraban la fragilidad citogenética, lo que limitaba su utilidad. Y en contadas ocasiones podía ser usado para detectar a los portadores pues no manifestaban la fragilidad. Por lo que la utilización de técnicas modernas más efectivas ha permitido una mejora significativa del diagnóstico del síndrome.

Por esta característica se nombra esta patología al asociarse a un sitio frágil, que aparece como una banda isocromática al final del brazo largo del cromosoma sexual X que puede observarse al microscopio de una preparación de células en metafase para estudios de citogenética (Krawczun y col, 1985; Verdyck, P y col.2015).

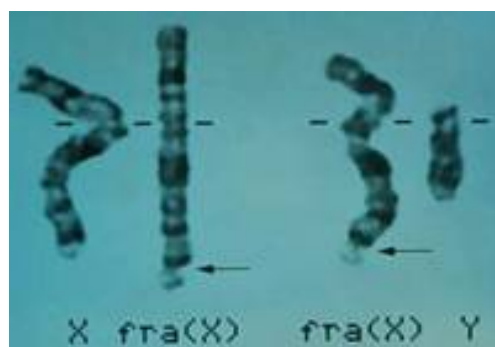


Figura 1. Visualización de los cromosomas X en pacientes femeninos y masculinos con el cromosoma X con fragilidad en su extremo inferior. En la parte derecha se muestra a una mujer con un cromosoma X normal y otro con fragilidad, mientras que en su izquierda se muestra un hombre con un cromosoma X frágil y el pequeño cromosoma Y. La flecha nos indica el sitio de rotura Xq27.3.

El elevado número de mutaciones en genes ligados al cromosoma X, que causan discapacidad intelectual, explica el elevado número de varones frente al reducido número de mujeres (Stevenson RE y col., 2000). La ausencia en varones de un segundo cromosoma X hace que no se puedan compensar posibles mutaciones genéticas. Durante las últimas décadas se han ido identificando hasta 124 genes que causan diferentes formas o síndromes que llevan a la discapacidad intelectual ligada al cromosoma X (XLMR), estas condiciones representan el 16% de todos los tipos de discapacidad intelectual de origen genético hereditario. Por lo que también se han mapeado numerosos genes ligados a formas de discapacidad intelectual (DI) con un tipo de herencia autosómica (Chelly J and Mandel JL, 2001, Neri G and Chiurazzi P, 1999). Numerosos genes identificados codifican para proteínas que tienen su función en la ruta Rho/Rac GTPasa, que está implicada en un gran número de procesos celulares como la remodelación de actina lo que afecta a la formación y maduración de las espinas dendríticas, que alterará el correcto establecimiento y mantenimiento de las sinapsis neuronales (Chelly J & Mandel JL, 2001). La forma más recurrente de XLMR es el Síndrome X Frágil (SXF), causado por una expansión inestable de las repeticiones CGG en el gen *FMRI* que tras un proceso de metilación su transcripción se verá silenciada, lo que lleva a la pérdida de la proteína FMRP, una proteína que funciona como transportadora de RNA (RNA binding protein). Desde 1991, y debido a trabajos de Verker (Verker AJ. y col., 1991), importantes estudios se han ido desarrollando para comprender el SXF, desentrañar la genética del gen *Fmr1* y la función de la proteína FMRP.

2. FENOTIPO DEL SÍNDROME X FRÁGIL

Los varones con mutación completa presentan comúnmente una baja incapacidad intelectual respecto a la media (el promedio del QI es de 40-50) (Hagerman PJ y col., 2009). Mientras que las mujeres con mutación completa presentan discapacidad en el aprendizaje, con un 25 % de incapacidad intelectual (De Vries y col, 1996). Las discapacidades que presentan las mujeres son: discapacidad visoespacial, problemas en la memoria de trabajo, procesamiento de la información y atención (Freund LS y col., 1993).

Las manifestaciones físicas en varones afectados por SXF son poco evidentes al nacimiento, y muy sutiles en la primera infancia. Las características fenotípicas descritas en el síndrome incluyen macroorquidismo (tamaño aumentado de los testículos sobre todo en la etapa postpuberal), orejas grandes y prominentes, macrocefalia, mandíbula alargada y alteraciones del tejido conectivo que provoca articulaciones hiperextensibles, pies planos, prolapso de la válvula mitral y piel suave (Hagerman PJ y col., 2009). Los pacientes con el SXF muestran normalmente otitis recurrentes, estrabismo, reflujo gastroesofágico, apnea y problemas de sueño y convulsiones, en muchos casos llegan a desarrollar epilepsia (Gross C y col., 2015).

Los varones que presenta al SXF tienen un comportamiento muy característico en el que se puede incluir hiperactividad, impulsividad, problemas de atención, ansiedad, labilidad emocional, así como unas series de características propias del autismo donde se incluirían el pobre contacto visual, la timidez, ausencia o problemas del lenguaje, agitación impulsiva de las manos, hiperexcitación o sobre-reacción a estímulos sensoriales (olores, luces, ruidos, nuevos ambientes y multitud de gente) y problemas en el comportamiento social (Hagerman PJ y col., 2009; Berry-Kravis & Potanos, 2004; Wang H y col., 2010). Diferentes estudios demostraron que hay un aumento de la actividad del sistema sensorial simpático como respuesta a estímulos electrodermales (Miller LJ y col., 1999), así como una respuesta pupilar distinta, variabilidad en tasa cardíaca (Boccia ML & Roberts JE. 2000) y anormalidad en la entrada de estímulos que puede demostrarse con los estudios de inhibición por prepulso (Hessl D y col., 2008). Los desórdenes de la ansiedad se dan tanto en varones como en mujeres con SXF, en estos se incluyen mutismo selectivo, poco contacto visual, aislamiento social y aparición de distintas fobias, entre ellas la fobia social (Hagerman y col., 2009; De Vries y col., 1996; Sullivan K y col. 2007).

En mujeres con SXF la sintomatología es más leve, se exhibe más variabilidad y es menos frecuente la aparición de las características físicas o los problemas médicos, pero a veces presentan problemas de atención, impulsividad y déficit en la ejecución de funciones incluso cuando su CI está dentro del rango normal (Hagerman PJ y col., 2009; Berry-Kravis E & Potanos, 2004; De Vries y col., 1996; Wang H y col., 2010). Respecto a los rasgos autistas que son comunes en las mujeres con SXF pueden

aparecer timidez extrema, mutismo selectivo, fobias específicas, ansiedad social y déficit en cuanto a la socialización.

El desarrollo del lenguaje, ciertamente, se retrasa en muchos de los individuos con SXF. No es de extrañar que tanto mujeres como varones con SXF mantengan elementos pre lingüísticos a lo largo de su vida, sin embargo llegan a obtener la capacidad de comunicarse pero el desarrollo de las habilidades lingüísticas a lo largo de su vida es ciertamente menor que en individuo sin la enfermedad (Gross C y col., 2015).

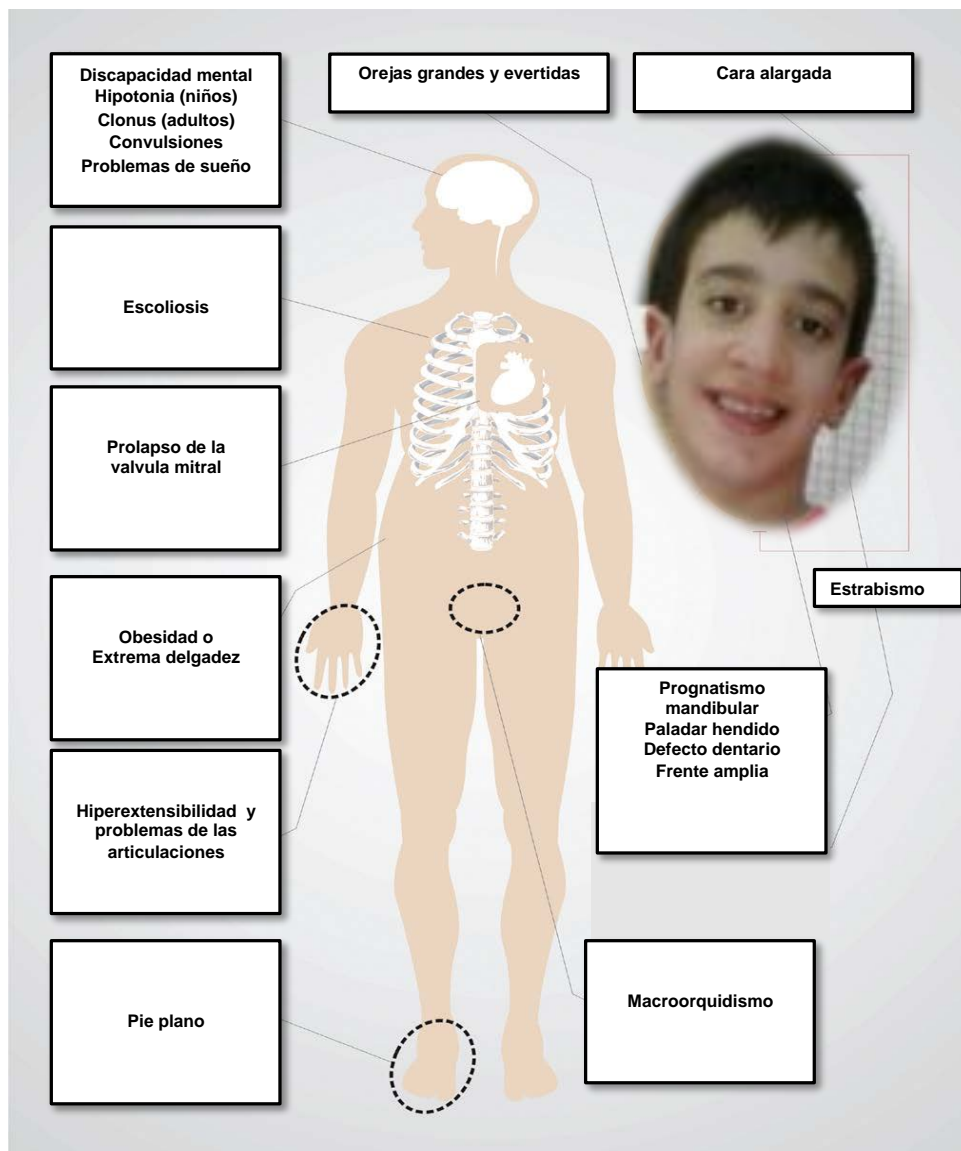


Figura 2. Características fenotípicas más comunes del SXF. Modificado desde Saldarriaga W et al, 2014.

3. HERENCIA

El SXF es una enfermedad genética con una herencia dominante ligada al cromosoma sexual X, caracterizada por tener una penetrancia incompleta y ser parte del grupo de enfermedades causadas por mutaciones en el gen de discapacidad intelectual X frágil (*FMRI*), denominadas trastornos asociados al X frágil (TASXF). En este conjunto de enfermedades engloba al SXF, el síndrome de tremor/ataxia asociado al X frágil (FXTAS) y el síndrome de insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FXPOI) (Rooms L Kooy RF, 2011).

El SXF presenta la característica del fenómeno de anticipación, es decir, que dentro de una misma familia la enfermedad se puede manifestar antes y tener una clínica más severa al transmitirse a la siguiente generación. En el SXF se cumple perfectamente con lo expuesto por Sherman en su famosa paradoja: 1) el riesgo de transmisión de la enfermedad aumenta en sucesivas generaciones y 2) se encuentran varones normales portadores que transmiten la enfermedad a todas sus hijas, que serán por tanto portadoras sanas (Fu et al, 1991).

Las mujeres se caracterizan por poseer dos cromosomas sexuales X en cada una de las células de su organismo, siendo portadoras si el gen *FMRI* presenta una expansión en el rango de premutación o mutación completa en uno de los dos cromosomas. Las diferencias fenotípicas presentes entre una mujer portadora de una premutación y otra con mutación completa se explica por los distintos niveles de expresión de la proteína de la discapacidad intelectual (FMRP) y por la inactivación que ocurre fisiológicamente al azar en uno de los dos cromosomas sexuales, el cromosoma X mutado o el normal en cada célula del organismo. Hay mujeres portadoras normales que no tienen los rasgos característicos del síndrome, aunque 1/3 de las mujeres portadoras de la mutación completa pueden tener algún grado de DI, en la mayoría de los casos la sintomatología es leve, pero excepcionalmente en algunos casos los niveles bajos de FMRP provocan un fenotipo físico y neuropsiquiátrico similar al observado en varones afectados. En las mujeres portadoras la probabilidad de que su descendencia herede el cromosoma alterado es del 50% (Reyniers y col, 1993, Dyer-Friedman J y col, 2002, De Vries BB y col, 1996).

En este Síndrome se describió por primera vez una forma de mutación nueva denominada mutación dinámica, se observó una zona del gen *Fmr1* que resultó ser inestable y que cambiaba de tamaño pasando de un estadio de premutación cuando en el gen se encuentra una expansión de 55-200 del triplete CGGn. Esta zona de repeticiones, debido a la pérdida de tripletes AGG que estabilizarían la secuencia cada 9-11 repeticiones, sufre una inestabilidad y tendrá riesgo de cambiar el número de tripletes CGGn en la siguiente generación para que, en muchos casos se expande a tamaños que duplican y hasta quintuplican el número de repeticiones. La prevalencia de portadores de premutación es en la población general es de una de cada 113-259 mujeres y de cada uno de cada 260-813 varones (Hagerman PJ, 2008). El estado premutado del gen no afecta sustancialmente a la expresión de la proteína FMRP, sin embargo, aumenta la expresión del mRNA que codifica el gen *Fmr1*, lo que en determinadas circunstancias determina la aparición de FXTAS de expansiones sobre 100 repeticiones de CGG van emparejadas a mutación completa y SXF en la consiguiente generación (Tassone F y col. 2007). La presencia de la premutación en el gen *Fmr1* no provoca manifestaciones fenotípicas en los portadores (tanto varones como en mujeres), sin embargo se ha descrito que la expansión de los alelos premutados sólo se produce por vía materna, y la probabilidad de que esto suceda depende de la edad de la madre, del número de las repeticiones y del número de interrupciones AGG presentes en el gen *Fmr1* con un tamaño de la premutación.

Los alelos premutados suelen expandirse al pasar a la descendencia y si superan los 200 tripletes de CGG, en un embrión varón que a diferencia de la mujer solo tienen un cromosoma sexual X, el individuo estará afectado por el síndrome manifestando algún grado de sintomatología. Al existir un estadio de premutación hay una excepción a esta generalidad que son los varones transmisores normales (VTN), que suelen ser los abuelos maternos de estos niños afectados. Los VTN son intelectualmente normales, sin embargo transmitirán el gen *Fmr1* premutado a todas sus hijas (que correspondería al 50% de la descendencia total) y no suele presentar sintomatología neuropedriática. Todos los hijos varones de un VTN serán sanos pues del par de cromosomas sexuales heredan el cromosoma Y del padre (Reyniers et al, 1997) Las mujeres portadoras (hijas de un VTN) presentan riesgos diferentes de transmitir la enfermedad a su descendencia de los calculados para una portadora con

mutación completa que expresa en algún grado la enfermedad y que recibió el gen de la hija de un VTN (generación III), esto es un ejemplo del fenómeno de anticipación genética, al que nos hemos referido anteriormente . (Fu y col, 1991).

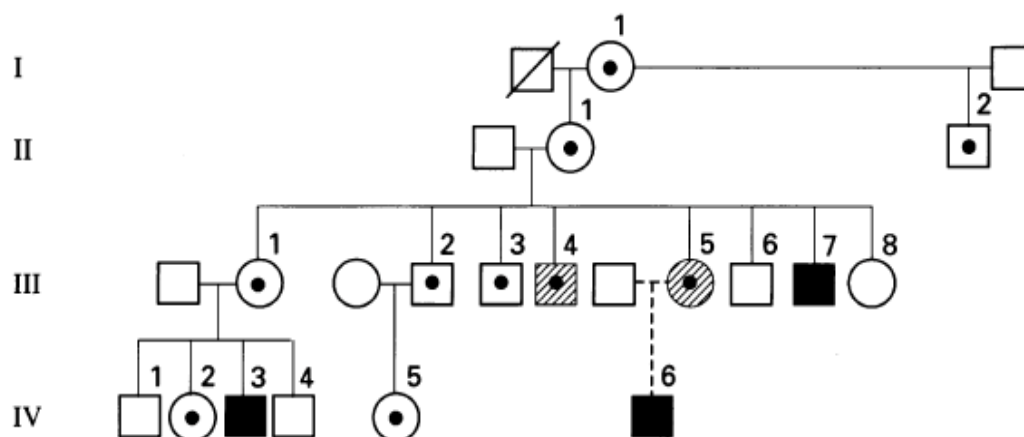


Figura 3. Genealogía de una familia que trasmite la mutación causante de distintos desórdenes relacionados con el SXF. El síndrome se diagnostica analizando el gen *Fmr1* para detectar la expansión de las repeticiones de CGGn. Símbolos cuadrados indican varón y redondos indican mujer. Símbolos en blanco indican un genotipo normal, en negro indican individuos con una mutación completa, y símbolos con un punto indican individuos portadores y rayados con un punto representan portadores con expresión fenotípica parcial. Tomado de Pintado E y col., 1995 (Pintado E y col., 1995).

El fenotipo clínico de las personas portadoras de una premutación, está íntimamente relacionado con la toxicidad producida por los niveles altos de mRNA codificado por el gen *FMRI*, sin embargo la proteína FMRP se expresa ,aunque en pequeña cantidad, pero suficiente para que no se desarrolle el fenotipo completo del SXF. Las mujeres portadoras de la premutación tienen incrementado el riesgo de desarrollar tremor/ataxia relacionado con el X frágil (FXTAS) (Hagerman RJ y col., 2001) e insuficiencia ovárica primaria asociada al X frágil (FXPOI) (Allingham-Hawkins y col., 1999). Se ha descrito recientemente que la premutación del gen *FMRI* puede generar fenotipos con problemas neurológicos como tremor, ataxia o demencia (tremor/ataxia asociado al x frágil (FXTAS) en la edad adulta, teniendo más presencia en varones (40%) que en mujeres (8-16%) (Tassone F & Hagerman R, 2012).La premutación en mujeres puede asociarse a una insuficiencia ovárica primaria (FXPOI, entorno al 20 % de las mujeres portadoras que han heredado el cromosoma X con la premutación de su padre NTM), manifestándose con el cese prematuro de la

menstruación o menopausia precoz. Tanto varones como mujeres que poseen premutación manifiestan mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes, incluyéndose hipotiroidismo y fibromialgia. (Pugin A y col., 2014). Evidencias recientes sugieren que los adultos portadores de una premutación en el cromosoma X (55-200) también presentan un alto riesgo de sufrir problemas de ansiedad, se ha demostrado que hay alteraciones en el sistema límbico debido a reducción en los niveles de FMRP y/o elevada cantidad del mRNA de *FMRI* que podría explicar este riesgo. Aun así poco se han estudiado los problemas psiquiátricos (incluido la ansiedad) en niños y adolescente con premutación (Cordeiro L y col., 2015).

4. EL GEN *FMRI*

El gen del discapacidad intelectual asociado al X frágil (*Fragile Mental Retardation 1 gene, FMRI*) está localizado en la posición Xq27.3 del cromosoma sexual X. (Verker AJ. y col., 1991).

El gen *FMRI* fue identificado en 1991 mediante el uso de la técnica de clonación posicional (Verker AJ y col., 1991). Este gen se caracteriza además, por la presencia de un triplete polimórfico en su secuencia 5'UTR (*5' untranslated region*) del primer exón, en la zona reguladora no codificante del promotor (Verker AJ. y col., 1991; Oberle L y col., 1991). La expansión en el número de este triplete da lugar a cuatro tipos de alelos diferentes de la zona de repeticiones: alelo normal estable (5-54 tripletes), alelo gris a veces inestable y precursores de los alelos premutados (45-54 tripletes), alelo premutados (55-200 tripletes), y alelo mutado (> a 200 tripletes) (Fernandez-Carvajal I y col., 2009, Nolin S.L. y col., 2003; Bagni C y col., 2012).

Los alelos premutados tienen la peculiaridad de pasar a alelos mutados en la siguiente generación debido a su inestabilidad, tal como se ha hablado anteriormente (Nolin S.L. y col., 2003).

El mecanismo molecular que conduce a la expansión de los trinucleótidos implica un inadecuado apareamiento de las cadenas de DNA durante la replicación del material

genético durante la división de las células (Schlötterer C. y col., 1992), o también durante la reparación de DNA mal copiado por la polimerasa (Sinden R.R; 2001).

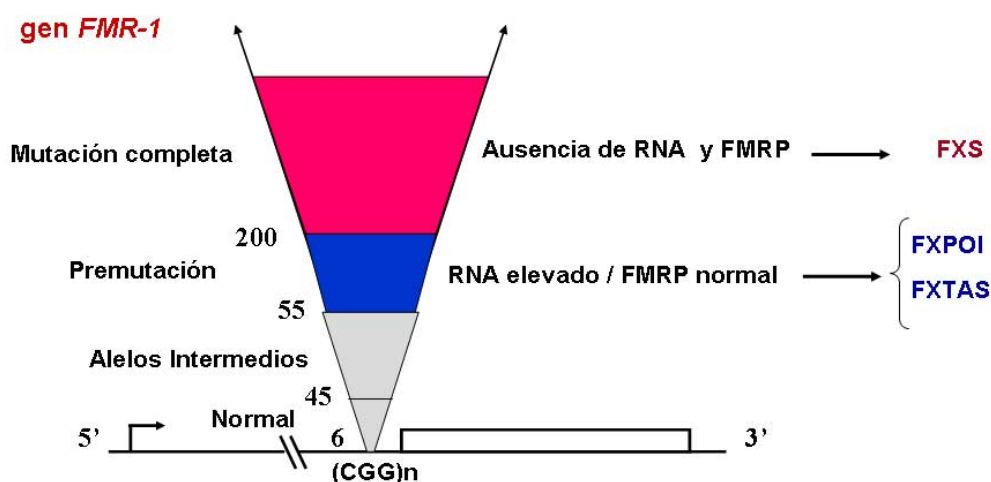


Figura 4: Diagrama representando los estados de la mutación del Gen Fmr1 implicado en varias patologías como el Síndrome X-frágil, FXTAS y FXPOI.

Como habíamos comentado anteriormente las interrupciones de triplete AGG se localizan de forma periódica entre repeticiones CGG_n, la presencia de las interrupciones estabiliza la secuencia en el ADN lo que reduce el riesgo de expansión de los alelos intermedios (45-54 CGG) o premutados (55-200 CGG) (Yrigollen C.M y col., 2012). En alelos de población normal el triplete AGG se localiza cada 9- 10 triplete CGG (Eichler y col., 1996). Cuando no se intercala AGG queda una larga cadena de trinucleótidos CGG que tiene una alta probabilidad de expandirse y dar lugar a un alelo premutado grande, especialmente cuando el número de triplete repetidos esté por encima de 30 CGG seguidos (Nolin S.L y col., 1999; Crawford y col., 2000). Los alelos premutados apenas tienen interrupciones del triplete AGG, siendo por lo tanto muy inestables. Al pasar de una generación a otra pueden expandirse y transformarse en una mutación completa (Oberle L y col., 1991). Hecho diferencial por el cual el estudio de las interrupciones AGG está siendo realizado actualmente por numerosos laboratorios de diagnóstico, ya que el riesgo de transmitir la enfermedad varía en función de la edad de la madre, el número de triplete y las interrupciones AGG como se apuntó anteriormente (Ver tabla 1). Esto fue calculado y extensamente estudiado en el trabajo Yrigollen CM y col., 2014 (Yrigollen CM y col., 2014).

Número de tripletes CGG en la premutación materna	Riesgo de expansión a mutación según número de CGG (%)	Edad de la madre	Riesgo de expansión a mutación completa dependiente de CGG y de interrupciones AGG (%)		
			0 AGG	1 AGG	2 AGG
55-59	3,7	20	0,4-1,5	0,1-0,5	0
		30	1,6-6,34	0,5-2,2	0-0,1
		40	6,5-23,1	2,3-9,1	0,1-0,5
60-69	5,3	20	1,5-22,7	0,5-8,9	0-0,5
		30	6,4-56,3	2,2-30	0,1-2,1
		40	23,1-85,0	9,1-65,3	0,5-8,6
70-79	31,1	20	22,7-84,7	8,9-64,8	0,5-8,4
		30	56,3-96,0	30-98	2,1-28,7
		40	85,0-99,1	65,3-97,2	8,6-63,8
80-89	57,8	20	84,7-99	64,8-97,2	8,4-63,3
		30	96,0-99,8	89-99,3	28,7-88,3
		40	99,1-100	97,2-99,8	63,8-97,1
90-99	80,1	20	99,0-99,9	97,2-99,8	63,3-88,2
		30	99,8-100	99,3-100	88,3-99,3
		40	100	99,8-100	97,1-99,8
>99	100	20	99,9-100	99,8-100	88,2-100
		30	100	100	99,3-100
		40	100	100	99,8-100

Tabla 1. Estimación del riesgo de expansión de una premutación del gen FMR1 hasta una mutación completa. Esta depende no sólo del número de repeticiones CGG sino también del número y distribución de las interrupciones AGG y la edad materna como se puede observar en la tabla.

Los alelos grises que contienen entre 45 y 54 unidades del trinucleótidos, CGG, se dice que son los precursores de los alelos premutados, a este rango se denomina zona gris y serán inestables dependiendo de si han perdido las interrupciones AGG que aparecerían cada 9-10 tripletes CGG (Oostra B.A. y col., 2001). En algunos pacientes con SXF se puede observar mediante la técnica del *Southern blot* o por PCR, varios tamaños de fragmentos (CGG) en diferentes células sanguíneas. La presencia de una premutación junto a la mutación completa se encuentra en el 20-40% de los pacientes varones, y se la denomina “mosaicismo somático”. Sobre el 3 % de los varones con SXF, la metilación no es completa y se denomina mosaicismo de metilación, suelen expresar un bajo nivel de proteína FMRP, en estos casos el nivel de discapacidad intelectual correlaciona con el porcentaje de células que están expresando a la proteína (Nolin S.L. y col., 1994; Rousseau F. y col., 1994). También se ha sugerido que debería existir mosaicismo de tejido, ya que se describen en estudios moleculares

de muestras sanguíneas algunos individuos con discordancia entre lo esperable por la mutación observada y su nivel de inteligencia (Basuta K. y col, 2015).

El gen *FMRI* ocupa 38 Kb, se lo localiza en la banda q27.3 del brazo largo del cromosoma X, y está compuesto por 17 exones y 16 intrones (Eichler y col., 1994). Este gen se expresa en un mRNA de 4.8 Kb, el cual tiene diferentes *splicing* alternativos (preferencialmente a niveles de los exones 12, 14, 15 y 17) y mediante técnicas de hibridación *in-situ* se ha encontrado en diferentes tejidos principalmente en cerebro y gónadas (Verkerk y col.,1993 ; Abitbol y col., 1993). El mRNA que se genera da lugar a varias regiones altamente conservadas en la evolución que incluyen:

- Dominio de localización nuclear. NLS (Nuclear Localatition Signal)- exones 5 y 6
- Dominio de exportación nuclear. NES (Nuclear Export Signal)- exón 14
- Primer dominio KH1- exones 7 y 9
- Segundo dominio KH2- Exones 9 y 11
- Caja RGG- Exón 15 (Bassell GJ-Warren ST, 2008)

Los dominios KH están codificados por 90 nucleótidos que se traducen en una secuencia de aminoácidos homologa a los dominios KH encontrados en las ribonucleoproteínas (hnRNP) y en otras proteínas con capacidad de unión de ARN (Khandjian EW y col., 2004). Los dominios KH se presentan usualmente en múltiples copias dentro de la proteína y son los responsables de la interacción con ssDNA, mRNA, y RNA ribosómico (rRNA). Los dominios KH consisten de tres hojas beta-plegadas juntos con tres dominios alfa-hélices (Valverde R y col., 2008).

FMRP, preferentemente, une mRNA que contiene la estructura tridimensional llamada cuartetos de G (G-quartet) (Darnell y col., 2001; Schaeffer y col., 2001). La región de FMRP correspondiente a la caja RGG es la responsable de la unión a los cuartetos de G de los mRNA. Es destacable hacer notar que la secuencia del mRNA de FMRP que codifica la caja RGG también forma una estructura de cuartetos de G por si misma (Schaeffer y col., 2001)

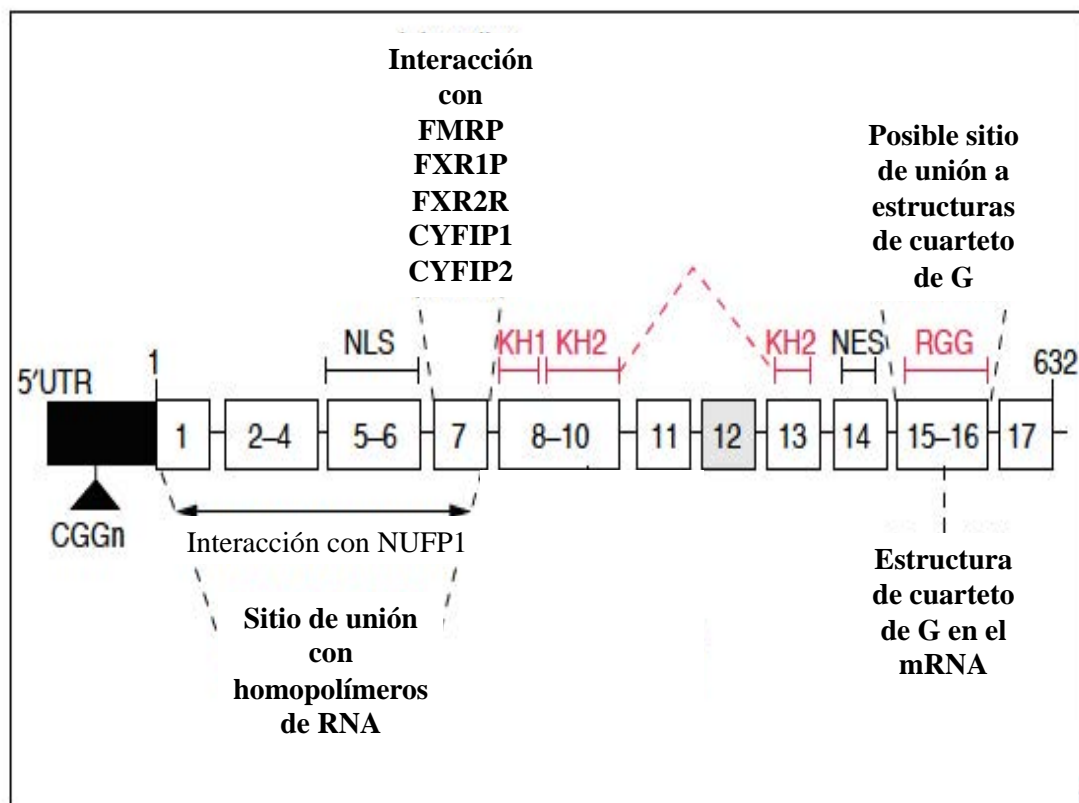


Figura 5. Estructura del gen *FMRI*, sitios de interacción con proteínas y ubicación de los dominios. Se distinguen los dominios KH1 y KH2, con una posible eliminación alternativa de los exones 11 y 12. La caja RGG entre los exones 15 y 16, así como los dominios de localización nuclear (NLS) y exportación (NES) Modificada desde Bardoni B & Mandel JL

5. SILENCIAMIENTO GÉNICO DE *FMRI*

El silenciamiento génico del gen *FMR1* es consecuencia de unas series de modificaciones epigenéticas (Pietrobono R y col., 2005). Cuando el número de repeticiones del triplete superan los 200-230 CGGn se produce un proceso de hipermetilación de las citosinas en el promotor del gen, esto tiene como consecuencia la inhibición de la expresión del gen *FMR1* lo que conduce a la pérdida de la proteína FMRP en las células del individuo, que dará lugar a las manifestaciones clínicas de SXF (Ashley C.T y col., 1993; Pieretti M y col., 1991; Naumann A y col., 2009). El momento de la metilación y la inactivación del gen *FMR1* ocurriría después de la fecundación durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Malter H.E y col., 1997).

Además de este proceso de metilación, en el SXF se ve que también se produce una desacetilación (eliminación de grupos acetilos) de las histonas H3 y H4, reducción de la acetilación de la lisina 4 en la histona 4 (H3K4) e incremento en la acetilación de lisina 9 en la misma histona (H3K9)(Tabolacci E y col., 2008) así como una tri-acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27) junto con un incremento de la acetilación de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20)(Kumari D & Usdin K, 2010). Estos cambios epigenéticos juntos a los producidos en el promotor mismo del gen FMR1, hacen que éste se mantenga en estado heterocromático por lo cual se evita la unión de los factores de transcripción y la polimerasa (Kumari D, Usdin K., 2001), por lo tanto no se produce el mRNA y ocurre el silenciamiento del gen FMR1 (Coffee B y col., 1999).

Como habíamos mencionado, algunos individuos que presentan la mutación completa tienen una proporción de células con la mutación completa sin presencia de metilación y por consiguiente existirá expresión de la proteína FMRP. A esto se le llama “mosaico de metilación” (Mc Conkie-Rosell y cols., 1993; Hagerman y col., 1994; Smeets y col., 1995; de Vries y col., 1996; Wöhrle y col., 1996; Taylor y col., 1999; Tassone F y col., 2000). Estos pacientes varones generalmente presentan un fenotipo menos severo, porque producen FMRP, pero el número de células que la expresan es baja comparada con varones normales (Hagerman y col., 1994; Smeets y col., 1995; de Vries y col., 1996; Tassone F y col., 1999). El nivel de expresión del mRNA de FMR1 en estos individuos es significativamente más elevado (Tassone F y col., 2000). La posible explicación a este alto nivel de expresión del mRNA del gen FMR1 estaría relacionado con un mecanismo compensatorio debido a dificultades en la traducción a proteína (Brouwer y col., 2007).

Se han descrito en la bibliografía individuos, en los que el grado de metilación, el ratio de inactivación-X (en mujeres portando tanto el alelo normal como el expandido), o la presencia de un mosaico genético puede resultar en una amplia variación de los niveles de expresión de la proteína FMRP lo que modifican las manifestaciones propias del síndrome provocando una variabilidad fenotípica muy amplia en estos individuos (Tassone F y col., 1999, Basuta K. y col. 2015).

El 98 % de los casos de SXF se produce por la hipermetilación del promotor del gen FMR1, sin embargo también se puede producir SXF debido a otros tipos de mutaciones, como pueden ser las mutaciones puntuales dentro de zonas conservadas y funcionales de la proteína codificada por el gen que conlleva una baja actividad de la proteína, o la delección de, parte del gen o su promotor que conducen a la falta de la función proteica determinada por el gen FMR1 (Peprah E., 2012; De Boulle K y col., 1993; Tassone F y col., 2000) Por ejemplo en un paciente se detectó una mutación puntual en el exón 10, sustitución del aminoácido isoleucina por asparragina en una región muy importante del gen FMR1 (I304N) modificando un dominio KH de la proteína FMRP (De Boulle K y col., 1993). Se han descrito varios casos de SXF que muestran una mutación completa hipermetilada y a su vez una delección de parte del gen FMR1 (García Arocena D y col., 2000; Fan y col., 2005).

6. LA PROTEÍNA FMRP “*FRAGILE MENTAL RETARDATION PROTEIN*”

El gen *FMR 1* tal como hemos hablado en la sección anterior está compuesto por 17 exones y su pre-mRNA está sujeto a *splicing* alternativos que suele ocurrir preferencialmente a nivel de los exones 12, 14, 15 y 17. Esto provoca que se genere 12 diferentes isoformas, que varían principalmente en su zona C-terminal, con rangos de peso molecular que oscilan entre los 63 y 80 KDa, con mayor cantidad de las isoformas de mayor tamaño (Verkerk y col., 1993; Brackett y col., 2013). Sin embargo, en páncreas e hígado las isoformas tienen un menor peso molecular (entorno a 40 KDa), tal como se ha observado en estudios de tejidos pancreáticos y hepáticos de humanos, monos y ratones. Estas isoformas pequeñas se deben principalmente a la ausencia de la parte C-terminal ya que los tejidos analizados se observa que comparten homología en la secuencia de la parte N-terminal de la proteína FMRP (Kaufmann y col., 2002).

La expresión del gen *Fmr1* y de la proteína que codifica se ha estudiado ampliamente a lo largo del desarrollo utilizando técnicas de inmunohistoquímica y estudios de hibridación *in-situ* (Devys y col., 1993; Hinds y col., 1993). En el ratón adulto,

podemos observar el mRNA de *Fmr1* mediante estudios de hibridación *in-situ* con sondas marcadas. Estos estudios de hibridación *in-situ* del mensajero de *Fmr1* muestran que hay niveles moderados de expresión en tejidos como los riñones, hígado, colon, útero, glándula tiroidea y pulmón. No se observa expresión en músculo, corazón y aorta pero sí se observan alto niveles de expresión en el cerebro, testículos, ovarios, timo, esófago y bazo (Hinds y col., 1993). Mediante estudios de sinaptoneurosomas extraídos de la corteza del cerebro de ratón, el mRNA de *Fmr1* ha sido detectado en la membrana post-sináptica de las dendritas. La estimulación de la dendritas hace que el mRNA de *Fmr1* se traduzca, por lo que la presencia de la proteína FMRP en este área de la neurona sugiere que podría estar implicada en la maduración normal de las conexiones sinápticas (Comery y cols., 1997; Feng y col., 1997; Weiler y cols., 1997).

FMRP es una proteína de 632 aminoácidos que contienen múltiples sitios de unión al RNA y de interacción proteína-proteína. Existen distintas isoformas de la proteína FMRP que son expresadas en diferentes tejidos y órganos con una relativa abundancia en específica de cada tejidos (Kaufmann y col., 2002; Xie y col., 2009). Estudios de *western-blot* e inmunohistoquímica indica que los niveles de FMRP son más altos en tejidos de origen ectodérmico, entre ellos podemos encontrar cerebro y epitelio, aunque también en gónadas que son de origen endodérmico. Otros tejidos que tienen orígenes mesodérmico y endodérmico tales como músculos, hígado y glándulas mamarias presentan una baja cantidad de FMRP (Devys y col.1993; Khandjian y col.1995). Dentro de cada tejido, hay una especialización en cuanto al tipo de célula en la que expresa la proteína. En el cerebro se encuentran primordialmente en neuronas, mientras que en los testículos se observa FMRP en la espermatogonia pero no en células germinales maduras o células de Sertoli (Devys y col., 1993; Bakker y col., 2000; de Diego Otero y cols., 2000). En el cerebro de ratón, FMRP se encuentra altamente expresada en la capa granular del hipocampo (motivo por el cual podemos pensar que tiene relación con el aprendizaje), en corteza, en motoneuronas, y en las células de Purkinje del cerebelo (Hinds y col., 1993; Devys y col., 1993; Bakker y col., 2000). En el sistema nervioso central (SNC), su localización parece ser predominantemente en neuronas y no en células gliales, encontrándose altas concentraciones de FMRP en el soma de dendritas proximales, pero no en los axones (Devys y col., 1993; Verheij y col., 1993; Feng y col., 1997; Tamanini y col., 1997).

La proteína FMRP se expresa principalmente en el citoplasma, pero también es localizada en el núcleo de algunos tipos celulares (Devys y col.1993; Feng y col., 1997; Verheij y col., 1993). FMRP es capaz de reconocer a un número significativo de RNA codificantes y no codificantes, entre el que se encuentran hasta 800 mensajeros detectado en tejido cerebral (Aslhey y col., 1993; Siomi y col., 1993; O'Donnell and Warren., 2002; Zalfa y col., 2005; Johnson y col., 2006; Napoli y col., 2008) y diversos microRNAs (Edbauer y col., 2010; Gessert y col., 2010; Muddashetty and Bassell, 2009; Tiam y col., 2013). Muchos y diversos mRNA han sido detectados asociados a FMRP en estudio de inmunoprecipitación (Co-IP). Algunos de los mensajeros se correspondían a: Arc (proteína asociada a la regulación del citoesqueleto), CamKII alfa(kinasa dependiente de calmodulina/calcineurina), eEF1A (factor de elongación 1a), GluR1/2, Snapap 3/4 (proteína del andamiaje postsináptico unida a PSD-95), RGS5 (reguladora de la señales de proteínas 5), receptor GABA_A, APP (proteína precursora beta-amiloide 4), MAP1B (proteína asociada a microtubulos 1B), PSD-95 (proteína de densidad postsináptica 95) y Sema31 (semaforia 3F). Todos estos mRNA interactúan con la proteína FMRP sobre la estructura tridimensional llamada cuartetos de G (G-quartet) que se ha observado dentro de la región RGG (Bassell GJ-Warren ST, 2008; Darnell JC y col., 2010) La región de FMRP correspondiente a la caja RGG es la responsable de la unión a los cuartetos de G de los mRNA. Es destacable hacer notar que la secuencia del mRNA de FMRP que codifica la caja RGG también forma una estructura de cuartetos de G por si misma (Schaeffer y col., 2001).

La proteína FMRP homodimeriza y heterodimeriza con otras proteínas de su misma familia FXR-1 y FXR-2, que a su vez interactúan con proteínas citoplasmáticas y nucleares, tales como Argonauta 2 (Ago2) (Muddashetty y col., 2011), la proteína de microesfera de 58 KDa (MSP58) (Davidovic y col., 2006), la proteína nuclear de interacción con FMRP 1 y 2 (NUFIP 1-2) (Bardoni B y col., 2003), la proteína del complejo de supervivencia de las motoneuronas (Piazzon y col.,2008) y las proteínas con dominio Tudor 3 (Tdrd3) (Linder y col., 2008; Chever and Ceman, 2009).

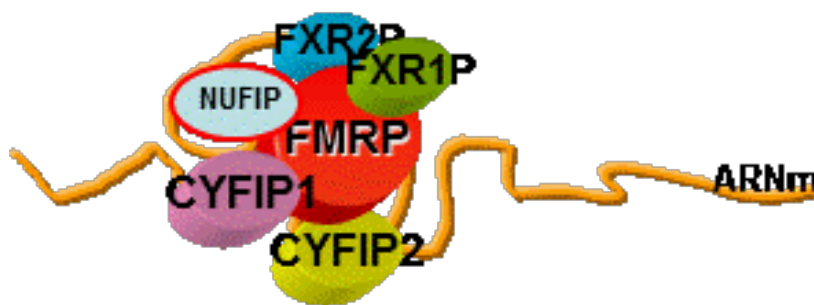


Figura 6: Interacción de la proteína FMRP con otras proteínas y el ARNm, en complejos ribonucleoproteicos que funcionan en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma, así como regulando su traducción.

El producto del gen *FMRI* (FMRP) tiene una alta expresión en el cerebro, y es una proteína implicada en el transporte desde el núcleo hasta el soma y las dendritas y a su vez regula la traducción de mRNAs, una gran cantidad de ellos importantes en la función sináptica. En neuronas FMRP no sólo está localizada en la región pericarial sino que también se encuentran en dendritas y espinas dendríticas (Kaufmann WE y col., 2002). En pacientes afectados, la ausencia de la proteína se asocia a una morfología anormal de las espinas dendríticas (Hinton y col., 1991; Rudelli y col., 1985).

La proteína FMRP puede dividirse estructuralmente dividida en tres principales regiones funcionales: región N-terminal, región central y una región C-terminal (Nelson y col., 2013).

- La **región N-terminal** es caracterizada por la presencia de dos dominios de Tudor (TD) (Ramos y col., 2006) que pueden unirse a cadenas simples de ácidos nucleicos y funcionan como la señal de localización nuclear (dominio NLS) que permite a la proteína internarse en el núcleo para unir los mRNA. Recientemente se ha demostrado que en la región N-terminal posee dos motivos Agenet, los cuales se creen que sirven como plataformas para la unión proteína-proteína (Myrick y col., 2015). Esta región amino terminal sería capaz de unirse o interactuar con los canales de potasio (K⁺) y tiene también un dominio KH0.

- La **región central** contienen dos dominios homólogos a KH (dominio KH1 y dominio KH2) que poseen alto grado de homología con los dominios hnRNP K, es la región por la que se une los mRNA. Además la región central se caracteriza por poseer la señal de exportación nuclear (dominio NES) que permite a la proteína transportar los mRNA desde el núcleo al citoplasma.
- La **región C-terminal** es la región que más conservada se encuentra a lo largo de las diferentes especies. Se caracteriza por la presencia de una caja RGG que contienen un triplete Arginina-Glicina-Glicina (Arg-Gly-Gly) bien conservado (Darnell y col., 2001; Menon y col., 2004; Sjekloca y col., 2009). Además se ha visto que la región carboxilo-terminal es capaz de interactuar con los canales de calcio (Ferron y col., 2014)

Varios de los dominios a los que hemos hecho referencia anteriormente son capaces de unir a moléculas de RNA y participar en el transporte de RNA al citoplasma así como participar en la regulación de la traducción de distintos RNA a su proteína funcional (Musco y col., 1996; Darnell y col., 2001; Ramos y col., 2006; Valverde y col., 2007; De Rubeis y col., 2012)

Una región, conservada a lo largo de las especies, es aquella que se encuentra entre los aminoácidos 438 y 521 situada entre la región central y la caja RGG es modulada por fosforilación. La fosforilación exacta de la serina 499 es la responsable de la modulación de la unión de la proteína FMRP con Dicer, involucrando de esta manera a FMRP en la ruta de los miRNA (Cheever & Ceman, 2009), además parece ser que la traducción de distintos mRNA dependiente de la activación del receptor metabotrópico de glutamato, mGluR, requiere de la desfosforilación de FMRP (Muddashetty y col., 2011). Debido a la función de FMRP transportando y regulando la expresión de numerosos mRNAs y la interacción con un grupo bastante extenso de otras proteínas que forman un complejo proteico, se puede demostrar su influencia en la excitabilidad celular del sistema nervioso (Contractor A y col., 2015).

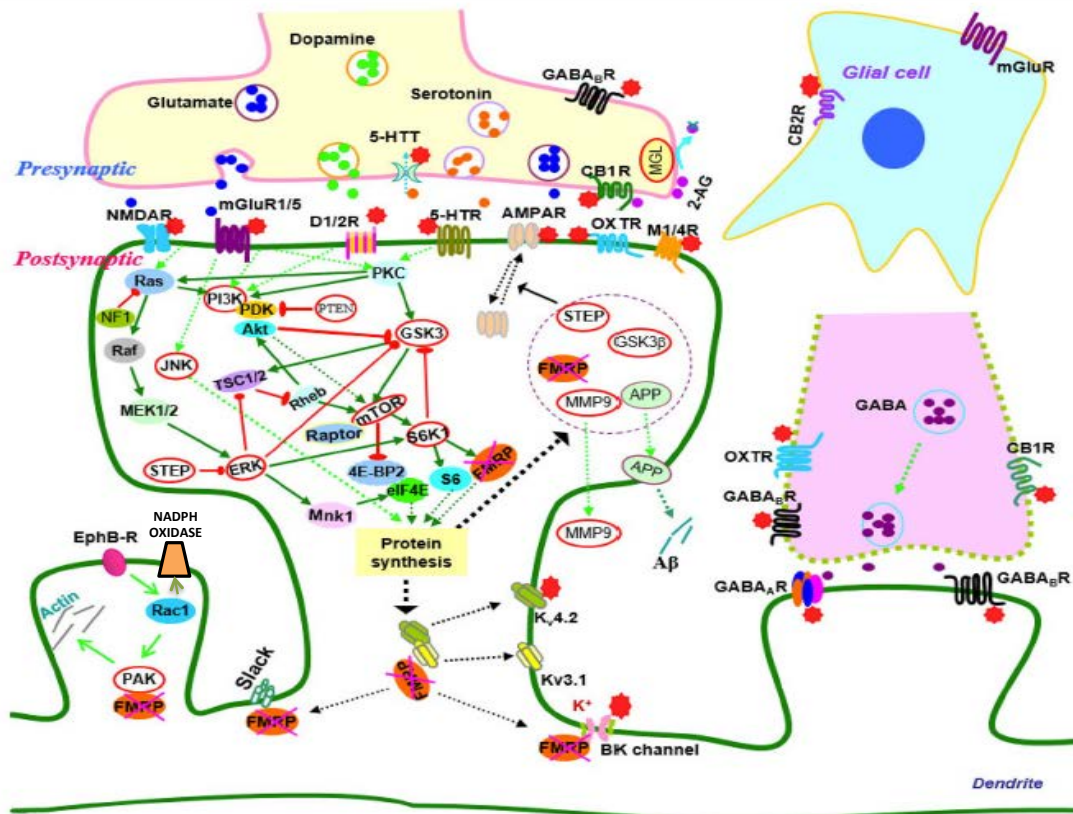


Figura 7. Interacciones de la proteína FMRP dentro de la neurona. Modificado desde Wang y col. 2015 (Wang H y col., 2015). Se puede ver que FMRP está regulada por Rac1 que a su vez regula a la producción de radicales libres desde la NADPH oxidasa.

7. CARACTERÍSTICAS DE MODELOS ANIMALES DEL SXF.

El animal de laboratorio (modelo animal) es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para comprender e investigar las causas de enfermedades que afectan al humano y a los animales, para desarrollar posibles tratamientos y métodos de diagnóstico (Von Hoosier G, 1999; Zuñiga J y col., 2001). Diversos modelos animales de SXF han sido desarrollados, tal es el caso de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el pez zebra o zebrilla (*Danio rerio*), el ratón (*Mus musculus*) y recientemente en la rata (*Rattus norvegicus*) (McBride SM y col, 2012; McBride SM y col, 2005; Hamilton SM y col, 2014; Tucker B y col, 2004; Bakker CE y col, 1994). Los mayores esfuerzos se han centrado en la caracterización y desarrollo del modelo animal del ratón con SXF, en particular el ratón *Fmr1-knockout* (KO), que fue inicialmente creado y caracterizado

por el consorcio establecido entre grupos holandeses y belgas (*Dutch-Belgian Fragile X Consortium*) (Bakker CE y col., 1994).

En la moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) han sido creados mutantes nulos de dFmrp y son viables (Zhang YQ y col., 2001). La anatomía que muestra el mutante es normal, pero su comportamiento está alterado. Los estudios con este modelo animal de deficiencia de dFmrp han evidenciado que la mosca nula presenta un ritmo circadiano anormal (Bushey D y col., 2009; Weisz ED y col., 2015), defectos y errático patrón en la locomoción (Zhang YQ y col., 2001) y un comportamiento de cortejo alterado (McBride SM y col., 2005). El cortejo es un elemento del comportamiento de las moscas que está muy bien estudiado, en este caso la mosca dFmrp nulo es el primer modelo que se utilizó para observar el comportamiento social relacionado con el autismo en moscas. Estudios realizados en 2012 han descrito también problemas en el aprendizaje y memoria en moscas heterocigóticas dfxr (Kanellopoulos AK y col. 2012).

La morfología del sistema nervioso central ha sido estudiada en profundidad identificándose ciertas anomalías en las neuronas, el análisis morfológico de las neuronas de las moscas han encontrado defectos en los axones o dendritas de un subconjunto específico de neuronas, tales como las células de la unión neuromuscular (NMJ). La pérdida de la proteína dFmrp en las moscas provoca defectos en los cuerpos de setas (un largo neuropilo en la región central del cerebro que es necesario para la memoria a largo y corto plazo) y alteraciones en las ramificaciones axonales de las neuronas (Zhang YQ y col., 2001; McBride SM y col., 1999).

La proteína dFmrp en *Drosophila* juega un papel importante en el control del daño que pueda sufrir el DNA, ya que regula el punto de control G2/M del ciclo celular y la apoptosis debido a que favorece el mantenimiento de la estabilidad genómica contra estrés genotóxico, suprimiendo de alguna manera a la expresión de CycB (Liu W y col., 2012). La sobreexpresión de dFmr1 a través del sistema UAS/GAL4 (Upstream Activating Sequence/Gal4 system) lleva a la pérdida de células por apoptosis en todos los tejidos examinados de la mosca adulta. Este fenotipo es dependiente de la actividad de los dominios KH de la proteína dFmrp (Wan L y col., 2000).

Hay muchas razones que hacen de *Drosophila* un modelo animal para el desarrollo de nuevos fármacos y buscar nuevos agentes químicos que sean beneficiosos para la enfermedad. Respecto al SXF se han identificado en el orden de nueve moléculas que rescatan la letalidad de la ausencia de *dFmrp*, tres de ellas están implicadas en la ruta inhibitoria GABAérgica. El tratamiento de las rutas del GABA hacen que se recupere la forma de los cuerpos de setas y que las moscas tengan un comportamiento de cortejo normal. Estos datos son consistente ya que concuerdan con lo observado en el SXF, donde se ve una inhibición de la ruta GABAérgica. (Chang S y col., 2008).

Otro modelo animal muy utilizado en biología del desarrollo sobretodo para el estudio del desarrollo embriológico es el pez cebra (*Danio rerio*), esto se debe a que el embrión se desarrolla fuera de la madre y los huevos son transparente por lo que cualquier cambio morfológico puede ser observado desde el exterior. El pez cebra posee tres genes ortólogos de la familia de *fmr1* (*fmr1*, *fxr1* y *fxr2*) que se corresponde con FMRP, FXR1P y FXR2P (Engels y col, 2004; Tucker B y col., 2004; van 't Padje, S y col., 2005). La transcripción de los tres genes miembros de la familia FXR en el pez cebra es similar, en el patrón de expresión, al ratón y a humanos (Tucker B y col., 2004). Para el estudio de la funcionalidad de la proteína FMRP en el desarrollo embrionario del pez, se puede generar knockout mediante la introducción de oligonucleótidos morfolino antisentido. De esta manera Tucker consiguió observar que había una arborización axonal anormal y defectos en la desfasciculación (Tucker B y col., 2006)

Los mayores esfuerzos se han centrado en la caracterización y desarrollo del modelo animal del ratón con SXF, en particular el *Fmr1* knockout (KO) mouse. El ratón *Fmr1*-KO fue inicialmente creado y caracterizado por el consorcio establecido entre grupos holandeses y belgas (Dutch-Belgian Fragile X Consortium) (Bakker CE y col, 1994). El primer ratón *Fmr1* KO fue generado usando células madres embrionarias de ratones wild type de la cepa de ratón C57BL/6J (B6), una cepa de ratón muy comúnmente utilizada en investigación. El mutante para *Fmr1* se genero mediante el uso de la técnica de recombinación homóloga de un vector en las células germinales (Mansour y col., 1988). Se construye un vector señal que contiene los 5,7 kb del gen *fmr1* de ratón cuyo exón 5 está interrumpido por el marcador positivo de resistencia a la neomicina (neo), además de este selector positivo también se introdujo el marcador

negativo del gen de la timidina kinasa (tk). En esto estriba una de las pocas diferencias entre el ratón knockout de *Fmr1* y los humanos, ya que en humanos el silenciamiento del gen se produce por la hipermetilación del promotor del gen mientras que en ratones se produce por la interrupción del gen en si mismo. (Bakker CE et al, 1994). Los machos *Fmr1*-KO se testaron mediante el uso de RT-PCR, además de acreditar la presencia o ausencia de la proteína FMRP en testículos, hígado, riñones y cerebro con la técnica del *Western-Blot*. (Bakker CE y col., 1994). Es importante remarcar que la ausencia de la proteína FMRP en estos ratones no provoca reducción en la fertilidad en ninguno de los sexos, al igual que no hay reducción de la fertilidad por el hecho de ser heterocigótica (WT/KO) u homocigótica (WT/WT, KO/KO) para la enfermedad en el caso de las hembras. Por lo cual el gen *Fmr1* no es esencial para la espermatogénesis u ovogénesis en ratones (Bakker CE y col., 1994).

La presencia de macroorquidismo en los pacientes con SXF es debido a la pérdida de FMRP, que es altamente expresada en testículos (Zang M y col., 2007). Los ratones *Fmr1*-KO tienen testículos significativamente más grandes que ratones WT, aunque la morfología de los mismos no se altera (Bakker CE y col., 1994; Slegtenhorst-Eegdeman KE y col., 1998, Bakker CE y col., 2000). El aumento del peso de los testículos es debido a un acrecentamiento en la actividad proliferativa de las células de Sertoli de los túbulos seminíferos durante el desarrollo testicular, las células de Sertoli aumentan el número de células germinales en los testículos, así como un aumento del líquido intersticial y por consiguiente el peso. El aumento de la actividad proliferativa no tiene concordancia, tal como se podría pensar, con un posible aumento de la hormona estimulantes de los folículos (FSH) en el plasma de estos animales, ya que se ha observado que no hay un aumento de la concentración de dicha hormona en sangre de los ratones *Fmr1*-KO (Slegtenhorst-Eegdeman KE y col., 1998). La FSH tiene el efecto trófico de estimular el crecimiento testicular. El análisis de la concentración de los niveles de esta hormona en pacientes con SXF y en ratones nulos no muestra un aumento concomitante de la concentración, por lo que se demuestra que el aumento del tamaño de los testículos no tendría que ver con cambios hormonales (Slegtenhorst-Eegdeman KE y col., 1998).

La introducción de una copia de *FMRI* de humanos (minigenes, plásmidos e incluso YACs) en el ratón *Fmr1-KO* con la intención de rescatar el fenotipo normal en los ratones *KO*, han producido el rescate en cuanto al tamaño de los testículos; sin embargo en las anomalías comportamentales no se consiguió normalizar el fenotipo (Peier AM y col., 2000). La presencia de unos testículos grandes en los ratones *Fmr1-KO* se considera como el espejo al macroorquidismo presente en pacientes *SXF* y se puede considerar como un aspecto que valida al modelo de ratón (Kazdaba TM y col., 2014). Sin embargo otros aspectos físicos no difieren entre los animales *WT* y los *Fmr1-KO* (Bakker CE y col., 1994; Peier AM y col., 2000).

ESPINAS DENDRÍTICAS- NEUROTRANSMISIÓN

La proteína *FMRP* se encuentra enriquecida en neuronas, particularmente en el soma (cuerpo celular), dendritas y en las espinas postsinápticas (Bakker CE y col., 2000, Antar LN y col., 2004, Feng Y y col., 1997, Cook D y col., 2011). Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones a lo largo de las dendritas, se consideran como los sitios de sinapsis, ya que son los sitios que tienen los receptores y las moléculas de señalización que son esenciales para la neurotransmisión sináptica (Nimchinsky EA y col., 2002). El análisis postmortem de tejido cortical de cerebro humano de individuos con *SXF* muestra un incremento en la densidad de espinas dendríticas respecto a individuos sanos control, con una presencia de una mayoría de las espinas inmaduras y elongadas (Rudelli RD y col., 1985, Hinton VJ y col., 1991, Wisniewski KE y col., 1991, Greenough WT y col., 2001, McKinney BC y col., 2005, Godfrand JM y col., 1996, Galvez R y col., 2003, Galvez R & Greenough WT, 2005). Un déficit análogo se observa directamente en las espinas dendríticas de las distintas variedades de ratones *Fmr1-KO*, tanto para el background genético de *B6* como el *FVB* (Grossman AW y col., 2006, Nimchinsky EA y col., 2001, Comery TA y col., 1997, Irwin SA y col., 2002).

Estudios del desarrollo de la corteza de ratones jóvenes (de una semana de edad) revelan un incremento de la densidad de las espinas dendríticas y de su longitud en animales mutantes en comparación con los controles sanos, estos datos no aparecen en animales con un mes de edad (Nimchinsky EA y col., 2001). Estos datos también

fueron observados por estudios de la corteza somatosensorial de ratones *Fmr1-KO* a las cuatro semanas de edad (Galvez R & Greenough WT, 2005). En este último estudio, además se observó que la maduración de la espinas dendríticas también estaba afectada, ya que los ratones con SXF exhibían un incremento en el densidad de las espinas dendríticas finas (inmaduras) en comparación con los controles (Galvez R & Greenough WT, 2005). Es más podría haber un periodo del desarrollo durante el cual la morfología de las espinas dendríticas se normaliza en ausencia de FMRP, pero esta no se sostiene en el tiempo. En estudios posteriores realizados en otras regiones cerebrales, se han encontrado similar déficit estructural en las espinas dendríticas en ratones de mayor edad, por ejemplo encontramos que en observaciones de ratones *Fmr1-KO* de 16 semanas de edad poseen mayor densidad de espinas inmaduras en la corteza visual comparado con ratones de la misma edad WT controles (Comery TA y col., 1997). Estos datos sugieren que la expresión de FMRP es necesaria para el desarrollo normal de las espinas dendríticas y que la pérdida de FMRP tiene un impacto negativo en la estructura física de las sinapsis.

Como regulador de la traducción de mRNA, FMRP tiene influencia en la síntesis de proteínas que pueden afectar a componentes de las sinapsis localizados en las espinas dendríticas. La potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) son aumentos o reducciones mantenidas a largo plazo, respectivamente, de la señales que se producen entre dos sinapsis neuronales (Buffington SA y col., 2014, Malenka RC & Bear MF, 2004). Ambas actividades son realmente dependientes de la regulación de la traducción, en función de dar una rápida respuesta a la actividad sináptica y a la función cognitiva. Análisis tanto de LTP y LTD, los cuales se asumen como representantes de la electrofisiología intrínseca del aprendizaje, cognición y memoria (Malenka RC & Bear MF, 2004), han revelado anomalías en la neurotransmisión de los ratones que tienen carencia del gen *Fmr1*. La depresión a largo plazo (LTD), depende de la síntesis de proteínas y de la activación de los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR), está aumentada en el hipocampo y en cultivos celulares de neuronas hipocámpales de ratones *Fmr1-KO* (Huber KM y col., 2006, Nosyreva ED y col., 2006, Nakamoto M y col., 2007).

La potenciación a largo plazo (LTP) se corresponde con una disminución de los receptores AMPA así como el aumento o aparición de los receptores de NMDA en la

superficie celular. La LTP se detecta alterado en ratones Fmr1-KO, esto es debido principalmente a que la proteína FMRP regula la internalización de los receptores AMPA desde la superficie de la membrana celular hacia el citosol y su ausencia produciría una reducción de la internalización de los mismos (Seese RR y col., 2012, Zhao MG y col., 2005). En las últimas observaciones del núcleo acumbens del cerebro de ratones Fmr1-KO, la medida de la neurotransmisión excitatoria basal indica que el déficit en LTP se acompaña por un aumento del ratio en los receptores AMPA/NMDA y una concomitante reducción de los receptores NMDAR en el ratón Fmr1-KO (Neuhof D y col., 2015).

Otro hallazgo indica que, los ratones Fmr1-KO adultos, tienen retraso en la formación del mapa o sistema somatosensorial, debido a las alteraciones de las dendritas y las espinas dendríticas de la cuarta capa de neuronas, producida por una reducción en las sinapsis y en los niveles de proteínas implicadas en la señal de transducción intracelular mediada por glutamato. Pero esto no ocurre en etapas tempranas del desarrollo, donde la traducción de mRNA no se ve alterada en los ratones Fmr1 KO. Estos datos sugieren que es muy importante tener en cuenta la edad en los estudios que se desarrollen con los ratones Fmr1-KO (Till S.M. y col., 2012). Todos estos estudios demuestran que la ausencia de Fmr1 produce alteraciones en las espinas dendríticas y en la actividad normal de las sinapsis, lo que puede contribuir al establecimiento del fenotipo del SXF. Además de darle la importancia necesaria a la proteína FMRP en la regulación de las proteínas que integran la función sináptica, por lo que no es ninguna sorpresa que la ausencia de FMRP tenga como resultado la alteración en las estructuras y funcionamiento de las sinapsis neuronales.

EPILEPSIA E HIPERSENSIBILIDAD

Aproximadamente entre un 10 y 20 % de los individuos con SXF con mutación completa exhiben cierto grado de epilepsia en su niñez (Incorpora G y col., 2002, Berry-Kravis E, 2002, Berry-Kravis E y col., 2010). Las convulsiones no están asociada al SXF y normalmente se controla mediante el uso de medicamentos anticulvulsivos (Heard TT y col., 2014, Hagerman PJ & Stastrom CE, 2009).

Diferentes estudios llevados a cabo sobre los ratones Fmr1-KO han visto como se producían convulsiones y ataques epilépticos por exposición de los ratones a sonidos de tipo sirena de alta intensidad (entorno a 125 dB); en lo que se ha pasado a denominar susceptibilidad audiogénica. La susceptibilidad audiogénica en los ratones Fmr1-KO tal como se relata en la bibliografía depende de la edad del ratón y del background genético de la cepa (Bakker CE y col., 1994; Musumeci SA y col., 1999; Heulens I y col., 2012; Pacey LK y col., 2009; Yan QJ y col., 2005; Dolan BM y col., 2013; Musumeci SA y col., 2000; Pietropaolo S y col., 2011; Ding Q y col., 2014; Veeraragavan S y col., 2011; Michalon A y col., 2012; Veeraragavan S y col., 2012).

Individuos con el SXF han mostrado hiperestimulación y sensibilización aguda a estímulos sensoriales (Verkerk AJ y col., 1991). En el modelo animal se ha observado déficits en la inhibición por prepulso (PPI), una medida de la puerta sensomotora, que correlaciona con coeficiente intelectual y atención (Braff DL y col., 2001; Frankland PW y col., 2004; Yuhas J y col., 2011; Hessler D y col., 2009)

ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD

Los individuos con SXF suelen ser presentar, por regla general, hiperactividad y tienen ciertas dificultades con la atención y el control de los impulsos (Hagerman RJ, 2002; Hatton DD y col., 2002; Cornish K y col., 2004; Sullivan K y col., 2006; Barley DB y col., 2008). Se ha observado que la ausencia de FMRP en los pacientes les confiere un aumento drástico déficit de atención correlacionado con la dificultad del problema aumenta, por lo que paciente con SXF tienen más dificultad en aquellos procesos donde se tienen que inhibir/activar respuestas neuronales (Wilding J y col., 2002).

COMPORTAMIENTO REPETITIVO

Perseverancia o continuidad de acciones repetitivas, tales como movimientos de manos han sido encontrados en personas con SXF (McLennan Y y col. 2011; Wolff JJ y col., 2013; Cordeiro L y col., 2011). Ratones Fmr1 KO han mostrado suave repetición de comportamiento durante las fases de entrenamiento de las diferentes

pruebas comportamentales, pero este comportamiento repetitivo se elimina después del entrenamiento. Los ratones Fmr1-KO muestran un aumento del comportamiento de aseo (*self-grooming*) respecto a los ratones WT controles. (Kramvis L y col., 2013; Pietropaolo S y col., 2011; McNaughton CH y col., 2008). Sobretudo, estos datos nos sugieren que Fmr1-KO muestra un comportamiento repetitivo que puede considerarse equiparable a lo descrito en las características del SXF en humanos.

ANSIEDAD

La ansiedad es uno de los síntomas centrales del SXF tanto de adulto como de niños (Hagerman RJ, 2002; Cordeiro L y col., 2011; Bailey DB y col., 2012). La evaluación del comportamiento relacionado con la ansiedad en el modelo de SXF murino dan unas series de resultados a veces paradójico, mientras que hay un rango de resultados que nos da ciertas diferencias entre el comportamiento ansioso de los ratones Fmr1-KO y los ratones WT, hay otros datos donde no se observan tales diferencias entre ambos.

La prueba comportamental más utilizada para medir la ansiedad es el laberinto en cruz elevado (*plus maze elevated*), que utiliza la preferencia del ratón por las zonas oscuras evaluando la cantidad de tiempo y entradas en que se producen en esta zona, comparándose con lo que ocurre en los brazos abiertos (Handley SL & Mithani S, 1984; Lister RG, 1987). Esta prueba indica que el ratón Fmr1-KO significativamente está más tiempo en los brazos abiertos y menos en los brazos cerrados, los resultados también indican una mayor locomoción del ratón por el laberinto (Peier AM y col., 2000; Heulens I y col., 2012). En otra prueba comportamental como es el laberinto de campo abierto (*open-field maze*), la distancia recorrida o tiempo gastado en el centro de la arena es considerado como un medidor de la ansiedad. En este tipo de prueba los animales WT prefieren estar más tiempo en la zona periférica del laberinto, mientras que los animales KO pasan gran parte del tiempo en la zona central (Yan QJ y col., 2004; Spencer CM y col., 2005). Tomando juntas estas publicaciones nos indican un bajo perfil de ansiedad en los ratones con SXF en los paradigmas empleados para su caracterización, lo cual es contrario al fenotipo de la enfermedad en los humanos. Mientras que estos estudios nos muestran una reducción de la ansiedad en los ratones

de SXF, hay otros que nos dicen lo contrario, viéndose que los ratones Fmr1-KO evitan el estar en la zona central del laberinto *open-field* (Restivo I y col., 2005) y se reduce el tiempo en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado (Bilousova TV y col., 2009).

Debido a esta diferencia de resultados es importante que haya una robustez en las pruebas comportamentales, ya que es esencial saber con exactitud el comportamiento ansioso de los ratones Fmr1-KO para valorar su mejoría en ensayos experimentales de tratamiento.

DEFECTOS COGNITIVOS

La mayoría de los pacientes con SXF presentan un desarrollo cognitivo disminuido, que van desde un rango de leve a severo. El valor IQ (valor de los test de inteligencia) decrece a lo largo del tiempo lo cual refleja un retraso en el desarrollo en individuos con SXF (Skinner M y col., 2005; Hall SS y col., 2008). Una vez que se generó el ratón nulo para FMRP, numerosos grupos de investigación han querido buscar el fenotipo de trastorno cognitivo visto en los pacientes con SXF en el modelo animal, para ello hay muchos test de inteligencia que se le puede realizar al ratón. El primero de ellos es el test de evitación pasiva, donde al ratón se le somete a un shock eléctrico en una cámara oscura y se mide cuanto tiempo tarda en salir de la cámara oscura. En este test se puede medir tanto la implicación del hipocampo como de la amígdala en el comportamiento (Lorenzini CA y col., 1996; Slotnick BM, 1973). Los resultados de diferentes test de evitación pasiva ofrecen resultados contradictorios, mientras unos indican que en el ratón Fmr1-KO no tiene alterado el aprendizaje de evitación pasiva (Dolen G y col., 2007) otros nos dicen que si tienen alterado el aprendizaje de la evitación pasiva (Michalon A y col., 2014; Qin M y col., 2002). Muchas de estas contradicciones se sustentan en las distintas cepas en las que se han generado los ratones transgénicos que se utilizan de modelo experimental.

Décadas de investigaciones para caracterizar el nivel de habilidades cognitivas de los individuos con SXF nos ayudan a predecir que los ratones Fmr1-KO deberían de tener déficit tanto en la memoria a corto plazo como en las habilidades visoespaciales así

como el procesamiento secuencial de información (procesamiento, ejecución de funciones y atención) (Cianchetti C y col., 1991; Maes B y col., 1994; Freund LS & Reiss AL, 1991; Kemper MB y col., 1988). El laberinto de agua de Morris es un test que nos sirve para evaluar la función hipocampal (se sabe que FMRP tiene una alta expresión en el hipocampo) que fue utilizado para determinar la habilidades visoespaciales del ratón Fmr1-KO para localizar una plataforma situada debajo del agua después de un entrenamiento, así como después de la variación de la situación de la plataforma (Bakker CE y col., 1994; Kooy RF y col., 1996). También junto con los estudios que se desarrollan en laberinto acuático de Morris, se realizó el laberinto en forma de E (Van Dam D y col., 2000) Todos estos estudios indicaron que el ratón Fmr1-KO tienen incrementada la actividad y el comportamiento exploratorio.

Paciente Síndrome x Frágil	Ratón Fmr1-knockout
Macroorquidismo	Macroorquidismo
Hiperactividad	Incremento actividad locomotora
Discapacidad mental	<ul style="list-style-type: none"> Deficiencia en el laberinto de agua de Morris. Deficiencia en la respuesta al miedo en el campo abierto y laberinto en cruz elevado. Deficiencia al miedo condicionado en el “<i>shuttle box</i>”.
Espinas dendríticas anormales	<ul style="list-style-type: none"> Espinas dendrítica inmaduras. Alteraciones de la fibras musgosas intra- e infra-piramidales.
Episodios epilépticos espontáneos	<ul style="list-style-type: none"> Aumento de la susceptibilidad a producirse episodio epilépticos espontáneos. Ataques debido a la susceptibilidad audiogénica

Tabla 2. Comparación de la sintomatología de los pacientes con SXF y la sintomatología presentada por los ratones con el gen Fmr1 silenciado (Fmr1-KO).

8. TRATAMIENTO Y ENSAYOS EXPERIMENTALES

El tratamiento farmacológico del SXF está, actualmente, dirigido a suprimir o paliar los síntomas. La medicación utilizada es diversa y depende mucho del síntoma a tratar en cada caso, se utilizan de forma sistemática a veces con muy baja eficacia:

- Hiperactividad - Metilfenidato
- Impulsividad y agresividad – Clonidina
- Crisis epilépticas – Anticonvulsionantes (Carbamazepina, Ácido Valproico)
- Antipsicóticos – Risperidona, Olanzapina
- Inhibidores de la recaptación de la serotonina – Fluoxetina Sertalina

Los compuestos agonista α_2 adrenérgico como la Clonidina, son capaces de deprimir la respuesta a los estímulos del cerebro, observándose una buena eficacia en niños con SXF. (Berry-Kravis E & Potanos K, 2004).

Los inhibidores de la recaptación selectiva de serotonina también se utilizan en el tratamiento de la ansiedad y del comportamiento obsesivo-compulsivo de los individuos con SXF (Berry-Kravis E & Potanos, K, 2004). Hay antipsicóticos que no son los típicamente utilizados, como es el caso de aripripazol, que son utilizados en los casos de autolesiones, hiperactividad y autismo relacionados con el SXF (Hagerman R.J., 2006).

El primer tratamiento que hubo y se pensó para el SXF, fue el ácido fólico. La razón por la que se usó fue que cuando se hacía el cariotipo de los cromosomas, los fibroblasto se cultivaban en medios pobres en ácido fólico y era cuando se observaba que aparecía la fragilidad del cromosoma X (Sutherland GR, 1977). Por eso se pensó que la introducción de ácido fólico podría ser útil para el tratamiento del SXF, aunque hoy se sabe que el efecto del ácido fólico no tiene nada que ver con su efecto citogenético sino que afecta a la síntesis de neurotransmisores como la dopamina. El ácido fólico es una de los pocos fármacos que se pueden recomendar durante la primera infancia ya que mejora la conducta y la concentración (Hagerman R. J. y col. 2002).

Se ha demostrado, en modelos de ratones SXF, que la exposición a un ambiente enriquecido puede mejorar la conducta, el enriquecimiento ambiental se consigue incluyendo materiales para la realización de nidos y la presencia de algún juguete con diferente textura y color en la jaula. La cría de roedores en un entorno complejo reduce la ansiedad, aumenta la habituación, mejora el aprendizaje y las anomalías neuronales, así como el aumento de la longitud y ramificaciones dendríticas, la densidad de la columna dendrítica, el número de espinas maduras, la sinaptogénesis y la neurogénesis. Se sabe que el enriquecimiento aumenta la expresión de los receptores de glutamato AMPA en ambos genotipos (WT y Fmr1 KO) sugiriendo que las vías de activación glutamatérgicas dependientes de FMRP se encuentran alteradas preservadas en el ratón Fmr1-KO y pueden ser normalizadas por la estimulación ambiental (Restivo L y col., 2005).

Parece ser que los pacientes con SXF se benefician de terapias ocupacional y musicoterapia (Berry-Kravis E & Potanos, K, 2004). Es posible conseguir grandes logros de mejoras en el comportamiento, trastornos conductuales y en el autismo de niños con SXF, mediante la implantación de técnicas específicas tanto en el ambiente escolar como en el familiar (Dyer-Friedman J y col., 2002)

Los avances en el conocimiento de la neurobiología que subyace en el SXF han permitido el desarrollo de nuevos fármacos que van a actuar en las diferentes vías de neurotransmisión involucradas en la patología del SXF. Se puede hacer una clasificación de las terapias farmacológica según el lugar de actuación de los fármacos: los hay que actúan a nivel de los receptores de neurotransmisores, los que actúan a nivel de proteínas de señalización intracelular o en las proteínas efectoras sinápticas.

ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DEL GLUTAMATO

Los mensajeros de FMRP están muy presente en la zona post-sináptica y son rápidamente traducidos en respuesta a la estimulación de los receptores del glutamato (mGluR) (Weiler IJ & Greenough WT, 1999), el mRNA de Fmr1 se transporta hacia las dendritas y una vez allí son sintetizado por estimulación a través de LTD (Kao DI

y col., 2010). También la activación de estos receptores involucra la traducción de diferentes mRNAs entre las que se encuentran aquellas que participan en la renovación de los receptores ionotrópicos AMPA (ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionico) y NMDA (ácido N-metil-D-aspartato). Lo cual ayuda a regular la fortaleza de la plasticidad sináptica (LTP), lo que es importante en el aprendizaje y memoria. Se postula que FMRP regula LTD y esta regulación ocurre a nivel de la traducción de mRNA.

La ausencia de FMRP resulta en una excesiva traducción de los mRNAs dianas de FMRP (como de las proteínas responsable de la internalización de los receptores de NMDA y AMPA) y que darían como resultado final un exceso de la activación del grupo I de los receptores del glutamato (Bear MF y col., 2004). Esta sobreexpresión explicaría el aumento de LTD en el hipocampo de los mutantes *Fmr1*, así como problemas en la transmisión sináptica y retraso en la maduración (Levenga J y col., 2010).

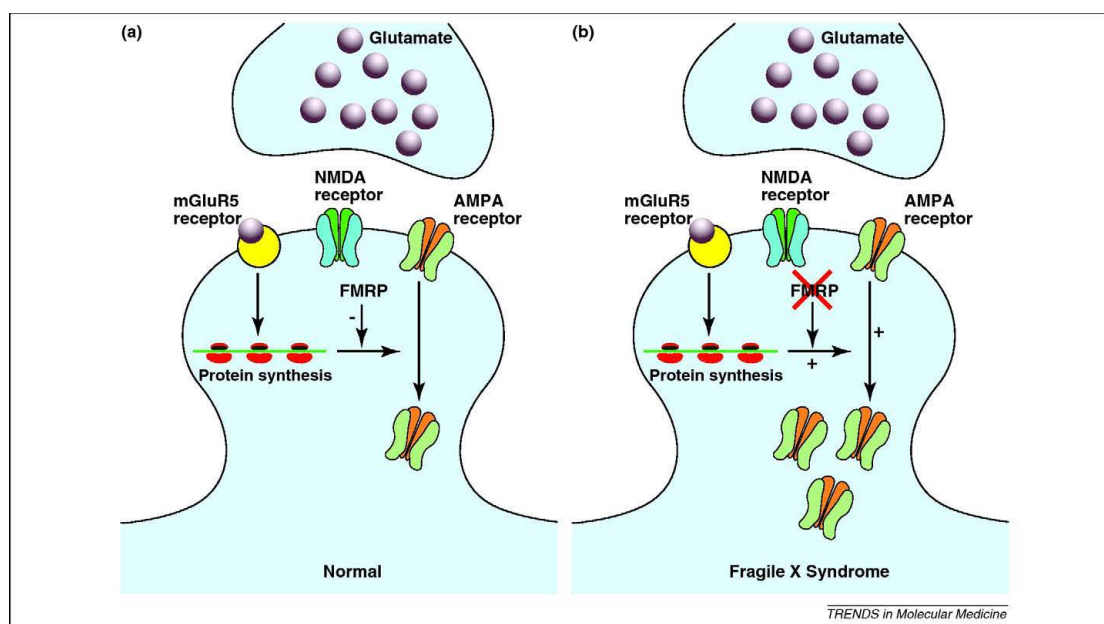


Figura 8: Teoría de la implicación de los receptores del glutamato en el SXF. Tomado desde Josien Levenga et al, 2010 (Levenga J y col., 2010 #7)

En concordancia con la “teoría del receptor del glutamato (mGluR)”, en los pacientes con SXF nos encontramos un exceso de las proteínas que siguen a la activación del receptor de glutamato y consecuentemente un incremento de la internalización de los receptores AMPA, todo esto es debido a la ausencia de la proteína FMRP que en

circunstancia normales inhibiría la síntesis de proteínas. El exceso en la activación de mGluR provoca un incremento de la actividad LTD o rotura sináptica que podría ser una de las principales causas de la pérdida de la plasticidad neuronal en el SXF. Esta teoría abrió la puerta a que desarrollar nuevas estrategias para mejorar la calidad de vida de los pacientes (Bear MF y col., 2004)

El receptor que se ha visto con mayor potencial terapéutico en este caso es el mGluR5. Bloqueando este receptor usando antagonistas específicos, se podría reducir la síntesis excesiva de proteínas así como alterar la plasticidad sináptica en el SXF. Lo que nos llevaría al rescate de la condición normal en la transmisión de señales y mejorar el comportamiento (Bear MF y col., 2004).

Muchos tratamientos, siguiendo la teoría anteriormente reseñada, han sido extensamente testados en los modelos animales de SXF. Los antagonista de mGluR5 son: 2-metil-6-(feniletilenil)-piridina (MPEP), fenorbam, mavoglurant, STX107, AFQ056, RO-1917523, CTEP, el uso de ellos en tratamientos han encontrado que reversan algunas características fenotípicas de animales con SXF, así como la hipersensibilidad audiogénica, alteraciones en la inhibición del prepulso (PPI) y la hiperactividad en el campo abierto (Chuang SC y col., 2005; Yan QJ y col., 2005; De Vrij FM y col., 2008; Pop AS y col., 2014). Igualmente fue creado un ratón heterocigótico Fmr1-KO con baja expresión de mGluR5, es decir con doble mutación una en el gen Fmr1 y otra mutación que reduce la expresión de mGluR5, lo que resulta en un rescate de algunas de las características del ratón Fmr1-KO (Dolen G y col., 2007).

MODULADORES DE N-METIL-D-ASPÁRTICO

Nemantina, una droga comúnmente utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, se ha ensayado como una posible terapia de SXF. Este medicamento modifica la función de las dianas de FMRP y rectifica el desequilibrio que hay entre la activación de receptores por el ácido γ -aminobutírico y el glutamato, todo ello se debe a que modifica la actividad al receptor ionotrópico del glutamato (NMDAR). La

nemantina es un antagonista no competitivo del receptor del ácido N-metil-D-aspartico. (Reisberg B y col., 2003).

El grado y dirección de la disfunción del receptor del ácido N-metil-D-aspartico en los ratones Fmr1-KO no está todavía claro y depende de la región cerebral y de la edad (Huber KM y col., 2002; Hu H y col., 2008; Pilpel Y y col., 2009; Eadie BD y col., 2012). Se realizó un estudio con células cultivadas de Fmr1 KO tratadas y no tratadas con nemantina y se observó un efecto estimulante en la maduración de las espinas dendríticas y en la formación de las sinapsis (Wei H y col., 2012).

Se han desarrollado varios ensayos en humanos con la nemantina, en uno de ellos se trato a niños con autismo o desorden en el desarrollo pervasivo (PPD) mostrándose que el 70 % de los sujetos tratado tenían mejoras significativas (Chez MG y col., 2007). Mientras que en otro estudio abierto con 6 niños con SXF se observa que en dos de ellos, el grado de irritabilidad se aumenta mientras que en los restantes hay una respuesta al tratamiento de acuerdo con su puntuación en el test CGI; esto nos ayudaría a decir que la nemantina es un podría ser utilizado en ensayos más amplios controlados con placebo para comprobar si es un posible fármaco para el SXF (Erickson CA y col., 2009)

MODULACIÓN AMPA

Se detecta una excesiva internealización de los receptores AMPARs debido al incremento de la señal de mGluR5 en ausencia de FMRP (Bear MF y col., 2004; Nakamoto M y col., 2007). Se piensa que esta alteración en la internalización de AMPARs es subyacente a los déficits tanto en LTP como en LTD. Añadiremos que se han observado que a niveles bajos de las subunidades GluR1 y GluR2 AMPAR en la corteza de ratones Fmr1-KO (Li J y col., 2002). El objetivo de la modulación positiva de AMPAR es la potenciación de las señales de AMPA y consecuentemente la normalización de LTP y LTD, así como mejorar la cognición.

El BDNF también incrementa los niveles de receptores AMPA y esto podría normalizar la forma de las espinas dendríticas. Además, se ha descrito una posible

correlación entre mutaciones en el gen de BDNF y la epilepsia en pacientes afectados del síndrome (Louhivuori V y col., 2009). BDNF también restaura el modelaje del citoesqueleto (Lauterborn JC y col., 2007) y afectar de alguna manera en el rescate del LTP hipocampal y a la polimerización de filamentos de actina en las espinas dendríticas.

A día de hoy solamente se ha desarrollado un ensayo clínico doble ciego placebo-control que ha medido la eficacia de un fármaco regulador de receptores de AMPA en el SXF. Esta droga incrementa los niveles de BDNF tanto *in vivo* como *in vitro* (Lauterborn JC y col., 2000). Interesantemente, se vio que breves tratamientos con ampakinas producen elevados niveles de BDNF que duran sorprendentemente largos periodos de tiempo (Lauterborn JC et al, 2003). El ensayo clínico se llevó a cabo con el fármaco CX516, un modulador positivo de los receptores AMPA, que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y además de aumentar la respuesta de excitación sináptica en el hipocampo, lo que podría inducir el mecanismo de potenciación a largo plazo y quizás mejoraría la memoria y la función cognitiva en las personas con SXF. Este ensayo no muestra ningún efecto positivo del medicamento en la memoria, lenguaje, atención y comportamiento. (Berry-Kravis E y col., 2006)

MODULACIÓN DE LA SINTASA KINASA GLUCOGENICA 3 (GSK3)

La ruta fisiológica que está detrás de la eficacia del litio en el SXF involucra la manipulación de la enzima GSK3. Se ha observado que en ratones adultos de Fmr1-KO los niveles de las dos isoformas de GSK3 son normales, pero tienen una regulación inadecuada de su inhibición por fosforilación (Min WW y col., 2009). En numerosos estudios llevados a cabo tanto en ratones como en la mosca dfmr1-KO, el litio y otros inhibidores selectivos GSK3 incrementan la fosforilación de la GSK3; mejorando de esta manera la morfología de las espinas dendríticas (Choi CH y col., 2011; Mines MA y col., 2010). Recientemente otros inhibidores específicos de la GSK3 han mostrado que tienen un efecto beneficioso en los ratones de Fmr1-KO, tales como mejoras en el comportamiento, mejoras en los parámetros electrofisiológicos como el LTP y en la resolución de problemas donde hay alguna implicación del hipocampo (Chen T y col., 2014; Franklin AV y col., 2014).

El litio ha sido usado en paciente con SXF para tratar la inestabilidad emocional y el estado agresivo al mismo tiempo, pero los resultados sobre la eficacia del mismo son anecdótico. El tratamiento con litio parece bien tolerado y los resultados de este estudio muestran una mejora en el comportamiento basado en los resultados de los test ABC-C y también sugieren una significativa mejora cognitiva (Berry-Kravis E y col., 2008).

Todos estos estudios sugieren que la manipulación/ inhibición de la GSK3 podría ser beneficiosa para los pacientes del SXF, pero se necesitan ensayos complementarios para comprobar su beneficio.

INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN DE SEROTONINA

En el 2011, Winarni y col., llevaron a cabo un estudio retrospectivo con 45 niños con SXF, con edades comprendidas entre 12-50 meses. El análisis encontró que los niños con SXF que recibieron SSRI sertralina tienen una mejoría significativa en el lenguaje en comparación con los niños que no recibieron dicho tratamiento. De este estudio surgió un ensayo para el tratamiento del SXF con sertralina en edades comprendidas entre 24 y 68 meses de edad, este está siendo llevado a cabo por UC Davis MIND Institute (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01474746). Se mide el efecto de la sertralina en tres dominios generales: desarrollo de habilidades y lenguaje temprano, habilidades de procesamiento sensorial y sintomatología relacionada con la ansiedad, aprendizaje y el espectro autista (ASD). Los resultados de este ensayo se han presentado recientemente en el 17º *International Fragile X Workshop* (27-30 Septiembre 2015. Estrasburgo. Francia) y se han demostrado mejoras significativas en el lenguaje tras el uso de sertralina en comparación con Placebo.

MODULADORES DEL ÁCIDO γ -AMINO BUTIRRICO (GABA)

La pérdida de FMRP se asocia a déficits en la neurotransmisión inhibitoria, de las cuales el neurotransmisor más importante es el GABA (Olmos-Serrano JJ y col., 2010). En el modelo de ratón *Fmr1* KO se ha demostrado una disminución en la

neurotransmisión GABAérgica en algunas áreas del cerebro tales como amígdala, corteza somatosensorial e hipocampo (Bear MF y col., 2004). Déficits en el receptor GABA (A) (receptor ionotrópico) se han demostrado pero sin cambios en GABA (B) (receptor metabotrópico). La disminución de los receptores GABA (A) se debe una reducción de la expresión del mensajero de RNA que codifica para el receptor GABA (A). Así mismo otros estudios han demostrado que el receptor GABA (A) muestra una reducción significativa en diferentes regiones cerebrales (D'Hulst C y col., 2009).

En los modelos animales de *Drosophila* y de ratón de SXF se ha conseguido revertir algunos de los parámetros comportamentales y morfológicos asociado al SXF con compuestos que actúan sobre la vía GABAérgica (Heulens I y col., 2012; Chang S y col., 2008) sugiriendo que la estimulación de dicha subunidad del receptor podría ser un tratamiento experimental viable para el SXF.

Tratamientos preclínicos han sido llevados a cabo mediante el uso de diferentes compuestos que actuarían modulando esta vía, como el uso de un compuesto esteroide neuroactivo con múltiples efectos farmacológicos que incluyen la modulación de los receptores nicotin-acetilcolina, activador de los canales de cloro y no selectivo agonista de los receptores GABA (A). Este compuesto está asociado con una reducción de la ansiedad y rescate de la susceptibilidad audigénica en ratones *Fmr1* KO (Heulens I y col., 2012). También el agonista de la subunidad δ , gabodoxol, atenúa el déficit de la excitabilidad en la amígdala y reduce la hiperactividad, además de atenuar medianamente el PPI (Olmos-Serrano JJ y col., 2010).

Otra molécula probada es la Taurina, que es un agonista del receptor GABA (A), mejora la adquisición de memoria y la retención en los test de evitación pasiva. Pero de esta molécula no se ha observado mejoría en el PPI del hipocampo en cultivo (El Idrissi A y col., 2010).

El primer ensayo clínico en pacientes, usando un agonista del receptor GABA para el tratamiento del SXF, fue un ensayo abierto con la droga riluzole. Esta droga está aprobada por la FDA para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, el efecto exacto de la misma no se sabe pero se piensa que es una atenuación del exceso de la

excitación por glutamato (Obrenovitch TP, 1998). Los estudios preclínicos han determinado que el riluzole trabaja como potencial agonista del receptor GABA (A), el cual se ha visto que está disminuido en el SXF. En este ensayo clínico no se observó mejorías significativas en las diferentes pruebas a las que fueron sometidos los pacientes (Erickson CA y col., 2011).

Acomprasato, una droga aprobada por la FDA para el tratamiento de la abstinencia del alcohol es otro compuesto que se está utilizando para el tratamiento del desequilibrio entre las vías de glutamato y GABA. El acomprasato tiene efectos pleitrópicos tanto en los receptores del glutamato (NMDAR) como en los receptores GABA (A). El primer ensayo en pacientes de SXF llevado a cabo con acomprasato fue un ensayo abierto con tres pacientes donde se observó mejorías significativas en las conductas sociales y comunicativas (Erickson CA y col., 2013). Después de este ensayo inicial se pasó a un ensayo clínico abierto en jóvenes con SXF, de los 12 pacientes que siguieron el tratamiento nueve de ellos tuvieron mejoras significativas del comportamiento social e la hiperactividad. Acomprasato está actualmente en la fase II de un ensayo clínico con pacientes de SXF doble ciego placebo/control (clinicaltrials.gov, NCT0911455)

Ganaxona es un modulador neuroesteroideo sintético que se une selectivamente al sitio de unión de los neuroesteroides del receptor GABA (A), que resulta ser opuesto a los sitios de unión de los benzodiazepinas (Nohria V & Giller E., 2007). En ensayo preclínicos con ratones Fmr1-KO previenen las convulsiones por estímulos auditivos (Heulens I y col., 2012). Ahora mismo está siendo utilizado en un ensayo fase II doble ciego placebo/control, (clinicaltrials.gov; NCT01725152).

Arbaclofeno (SXT209) es otro tratamiento que se ha probado y que tiene como diana de actuación restablecer el equilibrio en las vías GABA/glutamato en el SXF. La mayor diferencia con los anteriores tratamiento y en especial con el acomprasato y el riluzole es que el arbaclofeno actúa como agonista del receptor ionotrópico GABA (B), en lugar de ser un agonista del receptor GABA (A). En ratones Fmr1-KO el tratamiento con arbaclofeno produce una disminución en la susceptibilidad audiogénica. En adicción a estos datos, el arbaclofeno normaliza la densidad de espinas dendríticas en la corteza visual (Pacey LKK y col., 2011; Henderson C y col.,

2012). Un ensayo clínico doble ciego placebo/control con arbaclofeno sobre 63 individuos con SXF encontró solamente mejoras significativas en los test de resolución de problemas VAS y en el test de evitación social ABC (Berry-Kravis EM y col., 2012). Hasta hace relativamente poco se estaba llevando a cabo la fase III de un ensayo clínico con esta sustancia, pero resultados negativos hicieron que la empresa Seaside Therapeutics finalizará su ensayo en el SXF.

DIANAS EN RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

Recientemente se han propuesto otras dianas terapéuticas para el SXF, basadas en regulación de señales intracelulares. En un modelo animal FXS, el tratamiento metadoxina mejoró deficiencias del aprendizaje, la memoria y la interacción social y normalizó la sobreactivación de las proteínas de traducción de señales intracelulares como Akt y ERK en la sangre y el cerebro de ratones juveniles y adultos.

Metadoxina restaura la morfología neuronal anormal, así como reduce la producción excesiva de proteínas, alteraciones fisiopatológicas propias del SXF que serían responsables de problemas de aprendizaje y la memoria. La seguridad y eficacia de MDX en adolescentes y adultos con SXF se ha evaluado en un estudio de fase II, que se completó en 2015 y sus resultados se han presentado en el 17° *International Fragile X workshop* celebrado en Estrasburgo (Francia), en septiembre de 2015. Los investigadores concluyeron que el tratamiento con MDX durante 6 semanas de adolescentes y adultos con SXF no redujo la hiperactividad aunque si se observa mejoría en atención (Rubin J y col., 2015).

Otro compuesto que se ha probado para modular la señal de traducción intracelular mediada por ERK1/2 es la lovastatina, un medicamento que se prescribe ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia, puede corregir el exceso de síntesis de proteínas en el hipocampo del ratón modelo de FXS y puede evitar epileptogénesis (Osterweil EK. Y col. 2013). Un reciente estudio reporta un ensayo Clínico abierto para tratar 15 pacientes con SXF utilizando este compuesto durante tres meses describiendo mejoría en parámetros de comportamiento usando el test ABC-C en 12 de los 15 pacientes tratados (Caku A. y col. 2014)

REGULACIÓN DE LA MATRIZ DE METALOPEPTIDASA-9 (MMP9)

En el modelo de ratón Fmr1-KO, se muestran elevados niveles de MMP-9 en hipocampo, contribuyendo posiblemente a los fenotipos del SXF. El tratamiento temprano con minociclina, un inhibidor de MMP-9 normaliza las espinas dendríticas inmaduras típicamente propias de los ratones con SXF y redujeron el comportamiento locomotor y el comportamiento alterado en el laberinto elevado (Bilousova TV y col., 2009).

Se han ejecutado dos ensayos clínicos que investigaron la efectividad de la minociclina en SXF. El primero, un ensayo abierto en 20 sujetos entre 13-35 años, con un solo deserción como resultado de los efectos adversos. Este estudio preliminar mostró una mejoría significativa en la sub escala de irritabilidad del ABC, en el VAS y en el CGI lo que justificó un segundo ensayo que fue un estudio doble ciego, controlado con placebo en 66 niños y adolescentes de 3.5 a 16 años, detectando una mejoría significativa en el CGI, así como una disminución en los niveles de MMP-9 (Leigh MJ y col., 2013).

RECEPTORES DE CANNABINOIDES

La movilización de endocannabinoides (eCB) una vez que son activados los receptores mGluR es un hecho probado (Hashimoto-dani y col., 2005), los receptores mGluR5 están alterados ya que como se ha dicho anteriormente en el ratón Fmr1-KO. Los eCB son derivados desde lípidos de membranas (Zhang L & Alger BE, 2010). El sistema endocannabinoide (ECS) es un modulador clave de la plasticidad sináptica, mejora cognitiva, ansiedad, nocicepción y epilepsia, todas estas circunstancias están afectadas en el SXF.

La administración aguda de un antagonista de CB1R (rimonabant) a ratones con SXF hacen que estos tengan una mejora en la fase de consolidación en la prueba del reconocimiento de objeto reduciendo de esta manera el déficit cognitivo, todo ello sin afectar de ninguna manera a sus congéneres WT. El tratamiento crónico con este

mismo compuesto reduce el número de espinas inmaduras con un incremento de espinas maduras (Busquets-Garcia A y col., 2013). Se podría, por consiguiente, considerar a este sistema como una diana terapéutica en el SXF

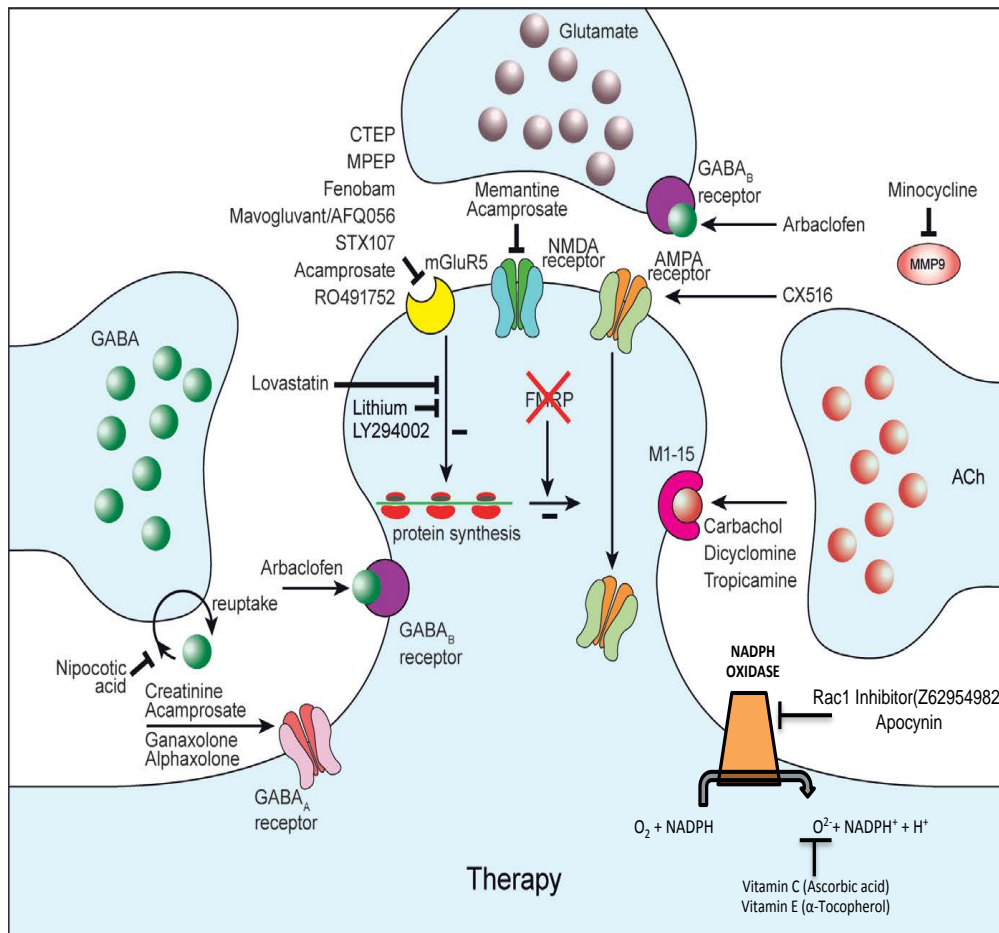


Figura 9: Diagrama representando las dianas terapéuticas que se han propuesto para tratar el SXF.

Muchas de las dianas que se han propuesto han pasado ya a fase de experimentación clínica, y se han desarrollando ensayos independientes por grupos de investigación o ensayos promovidos por la industria farmacéutica. Ejemplos de estos ensayos se recogen en la tabla siguiente.

Número de registro del ensayo	Tipo/Fase en la que se encuentra	Fármaco	Población	Diana	Estado	Promotor	Resultados
NCT 01894958	Multicentrico-Fase II	MNZ-2566	Varones adolescentes y adultos	Antagonista NMDA	En marcha sin reclutar pacientes	Neuren Pharmaceuticals Limited	Pendiente
NCT 01725152	Unicentrico-Fase II	Ganaxolona	Adolescentes y niños	Agonista GABA-A	En marcha sin reclutar pacientes	Marinus Pharmaceuticals	Pendiente
NTC 01474746	Unicentrico-Fase II	Sertalina	Niños	Inhibidor de la recaptación de serotonina	En marcha sin reclutar pacientes	Universidad de California, Davis (USA)	Pendiente
NCT 01911455	Multicentrico-Fase II	Acamprosato	Adolescentes y niños	Modulador del receptor de NMDA	En marcha sin reclutar pacientes	Children's Hospital Medical Center, Cincinnati	Pendiente
NCT 01329770	Unicentrico Fase II	Vitamina C + Vitamina E	Adultos, Adolescentes y niños	Antioxidantes	Finalizado	Hospital Regional universitario de Málaga	Eficacia a nivel cognitivo con una potencia del 65% y en lenguaje con un 49%.
NCT 02126995	Unicentrico-Fase II	Metadoxine MG01CI	Adultos y adolescentes	Vitamina 6	Finalizado	Alcobra Ltd.	Pendiente
NTC 01357239	Multicentrico-Fase II	Mavaglutant (AFQ056)	Adolescentes y niños	Antagonista mGluR5	Finalizado	Novartis (Basilea, Suiza)	Negativos, no hay mejoría en el comportamiento medido con la escala ABC-C (Jacquemont y col. (2011))
NTC 01015430	Multicentrico-Fase II	Basimglutant	Adultos	Antagonista mGluR5	Finalizado	Hoffman-La Roche	No hay eficacia
NTC 01013480	Multicentrico-Fase II	Arbaclofeno (STX209)	Adultos y adolescentes	Agonista GABA-B	Finalizado	Seaside Therapeutics, Inc.	Eficacia parcial, cierra el programa por falta de financiación por la empresa.
NTC 01053156	Unicentrico-Fase II	Minociclina	Adolescentes y niños	Antibiótico	Finalizado	Universidad de California, Davis (USA)	Mejoría tanto en el placebo como en el tratamiento (Paribello y col., 2010; Leigh y col., 2013)
NTC 01120626	Unicentrico-Fase II	Donepezil	Adolescentes y niños	Droga colonérgica	Finalizado	Universidad de Stanford (USA)	No hay mejoría en los test de inteligencia y comportamentales (Sahu JK y col., 2013)

Tabla 3. Resumen de los ensayos clínicos, las moléculas y sus dianas, que se han usado en la intervención terapéutica experimental en humanos con el SXF (Modificado del artículo de Diego Otero y col., 2014).

9. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL SÍNDROME X FRÁGIL

Es ampliamente conocido que el estrés oxidativo podría ser importante en una serie de enfermedades del sistema nervioso central, entre las que se encuentra el SXF. El oxígeno es esencial para el funcionamiento normal de los organismos eucariotas. Su papel en la supervivencia está unido a su alto poder redox, lo que le hace ser un excelente captador de electrones provenientes de sustratos reducidos. Los diferentes tejidos tienen desiguales demandas de oxígeno dependiendo de sus necesidades metabólicas. Neuronas y astrocitos, dos de las células mayoritarias del cerebro, son los responsables del alto consumo de glucosa y O_2 en el cerebro. De hecho el cerebro solo se corresponde al 2 % del peso total del organismo pero consume más del 20 % del total de oxígeno (Halliwell B, 2006). A pesar de lo esencial del oxígeno, estados en los cuales los niveles de O_2 son muy altos (hiperoxia) pueden producir toxicidad que puede conducir a neurotoxicidad cerebral (Ahdab-Barmada M y col., 1986; Davydov BI y col., 1988). La forma parcialmente reducida del oxígeno es altamente activa, ya que posee un radical libre que puede a la vez aceptar o donar electrones. Las formas de especies reactivas de oxígeno (ROS) más dañinas que se encuentran en las células incluyen los superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). El término ROS incluye también a varios radicales y no radicales que son fácilmente convertidos en radicales libres (O_3 , H_2O_2 , 1O_2) (Halliwell B, 2006). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen diferentes habilidades y el ROS que se ha observado con mayor reactividad es el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Las mitocondrias, las enzimas Xantinas Oxidasas y las NADPH-oxidasas son las fuentes más importantes de formación de ROS, de ahí que últimamente el estudio de estos componentes celulares esté en boga.

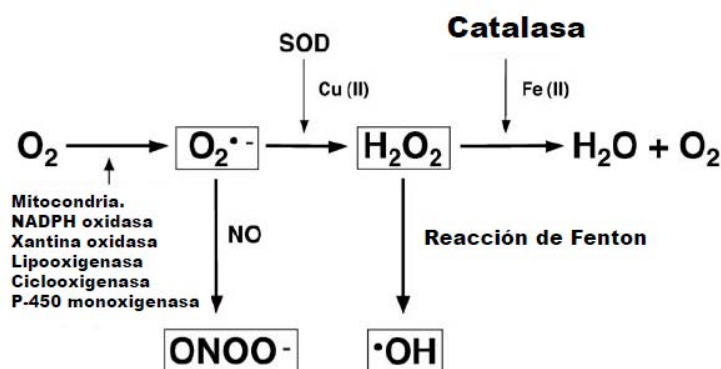


Figura 10. Especies reactivas de oxígeno/nitrógeno producidas durante la actividad fisiológica de las enzimas indicadas y reacciones de eliminación de radicales en la célula.

Los ROS pueden interactuar con diferentes elementos celulares provocando cambios en la función celular e incluso la muerte celular. Debido a esto el oxígeno actúa como un tóxico que debe de ser contrarrestado, por eso existe la defensa antioxidante (Droge W, 2002). Las células cerebrales y especialmente las neuronas requieren una protección antioxidante muy efectiva por diferentes razones:

- Las neuronas exhiben un alto consumo de oxígeno comparado con otros tejidos (10 veces más).
- Las neuronas tienen una alta vida.
- El óxido nítrico tiene un papel importante en el cerebro y puede formar especies reactivas de nitrógeno.

El estrés oxidativo es una condición en la cual, el balance entre ROS y los niveles de antioxidantes está desequilibrado y resulta en un daño celular por el exceso de ROS. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Síndrome de Down, Autismo y otras enfermedades neurodegenerativas inducidas por el alcohol, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington) debido a la modulación REDOX de muchas biomoléculas en las células que conducirá a un estado patológico a largo plazo.

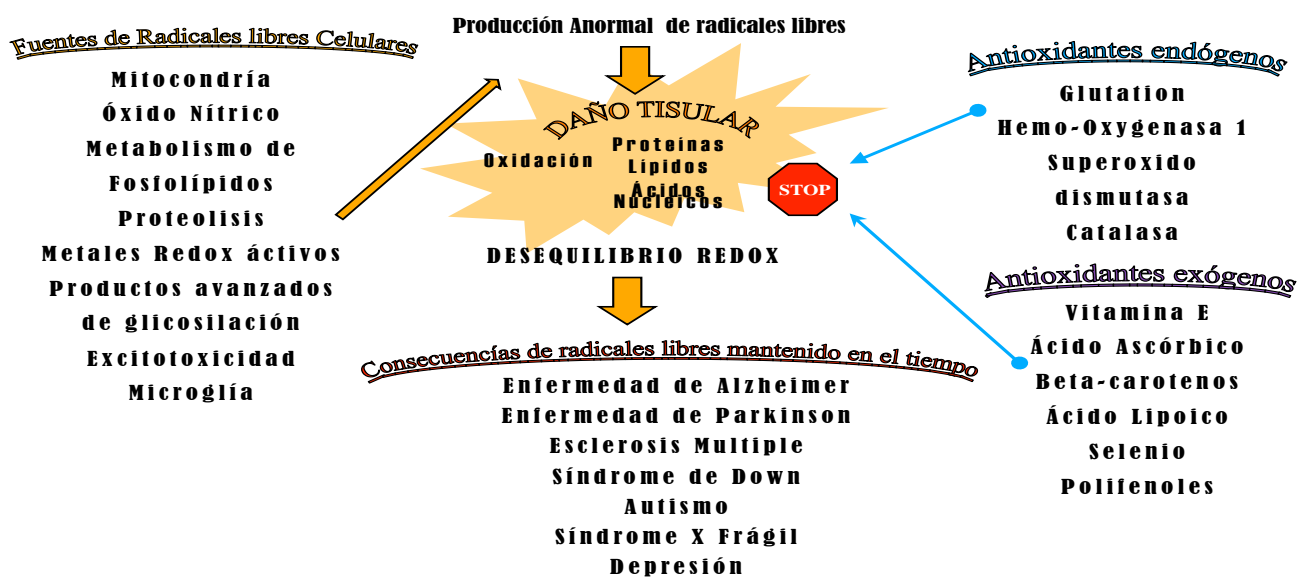


Figura 11 El desequilibrio REDOX celular causa patologías del sistema nervioso central. Un exceso de las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno y unos bajos niveles de antioxidantes en la célula causa estrés oxidativo y altera la fisiología de la célula, a largo plazo el tejido se verá afectado, fenómeno que participa en diversas enfermedades.

El estrés oxidativo podría perturbar la plasticidad sináptica en el cerebro, provocando daño celular. Esto puede darse en determinadas zonas del cerebro (hipocampo, amígdala y corteza) implicadas en el aprendizaje, emociones y memoria. Las moléculas celulares que sufren la oxidación por parte de los ROS son generalmente ácidos poliinsaturados (ácido araquidónico y ácido docosahexanoico), proteínas (atacan principalmente a la estructura de la cadena lateral de los aminoácidos formando grupos carbonilos) y ácidos nucleicos (dando lugar a mutaciones en el DNA) (Forman HJ y col., 2002).

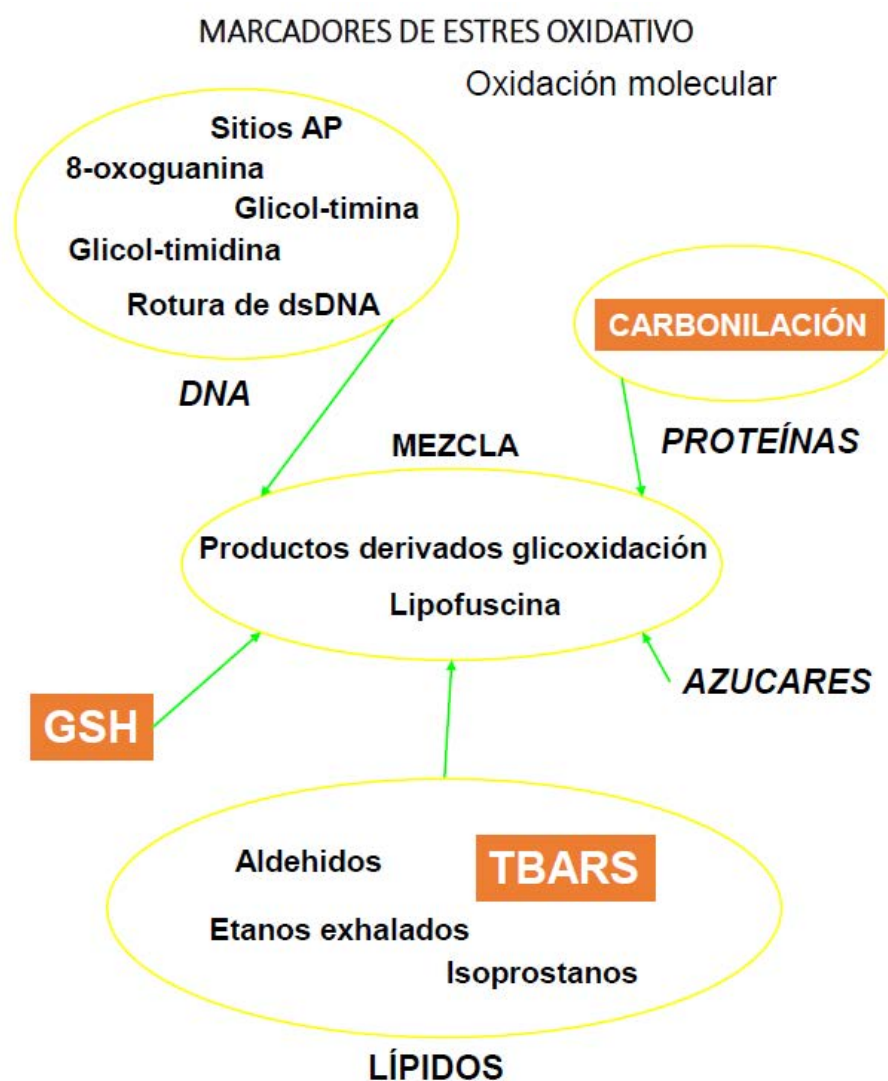


Figura 12. El estrés oxidativo puede medirse por distintos marcadores que afectan a distintas moléculas de la célula. Los más empleados en la bibliografía están marcados en recuadros naranja.

GENERACIÓN DE ROS Y RNS

Las fuentes principales que dan lugar al estrés oxidativo son varias estructuras que hay en las células. Estas son la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, mitocondrias y monoamina oxidasa.

La NADPH oxidasa es un complejo enzimático con diferentes unidades que fue primeramente descrita en fagocitos (Babior BM y col., 1973). NADPH oxidasa es un miembro de la familia de genes NOX, también llamada NOX2 u oxidasa fagocítica (PHOX). Siete genes NOX han sido identificados en el sistema nervioso central (CNS): NOX 1-5 y DUOX 1 y 2. La enzima que mayoritariamente se expresa en cerebro es NOX2, sin embargo existen ciertas evidencias de localización de NOX1 y NOX4, además posiblemente de NOX3, en sistema nervioso central. El complejo NADPH oxidasa consta de diferentes subunidades, algunas de ellas de membranas y otras que se encuentran en el citosol en estado de reposo. Tenemos el componente de membrana b558 que se conforma de las proteínas p22^{PHOX} y gp91^{PHOX} mientras que el componente citosólico está compuesto por: p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p40^{PHOX} y Rac1 GTPasa. La NADPH oxidasa se encuentra inactiva cuando todos los elementos que la componen se encuentran disociados en el citosol, la activación ocurre a través de un complejo proceso de interacciones entre proteínas que comienza con la fosforilación de la subunidad p47^{PHOX}, lo que provoca que esta se una al componente b558 y sirva de anclaje de las demás subunidades citosólica al complejo enzimático de la membrana. Una vez unidas todas las subunidades de la NADPH oxidasa está se encontrará activa, por lo que puede producir superóxido como producto final de la transferencia de protones a través de la membrana (Bedard K & Krause KH, 2007).

La producción de radicales libres involucra la reacción $O_2 + NADPH \rightarrow O_2^- + NADPH^+ + H^+$, a la reacción de oxidación le sigue una reacción de dismutación de O_2^- a H_2O_2 . Esta serie de reacciones se caracteriza por ser rápidas y transitorias, además de estar generalmente desatadas por la presencia de patógenos u otro estímulo (Sorce & Krause., 2009). La NADPH oxidasa está presente en distintos tipos celulares en el cerebro como son la microglía, neuronas y astrogía. Hay un concepto importante que se debe indicar y es que hay señales REDOX que requieren la presencia de ROS derivados de la NADPH oxidasa son necesarias para el

funcionamiento normal de las células. Así tal que la NADPH oxidasa activa parece ser requerida para provocar señales entre neuronas, que afectan la fisiología del sistema nervioso, así como la memoria y el aprendizaje, si estas señales pierden su regulación por lo que la acumulación de ROS contribuye a la neurodegeneración, neurotoxicidad y enfermedades cardiovasculares (De Diego-Otero y col., 2009)

La xantina oxidasa (XO) o xantina dehidrogenasa es una enzima ampliamente distribuida en los tejidos de los mamíferos y generalmente está implicada en el catabolismo de las purinas (Harrison R, 2002). La XO oxida gran cantidad de sustrato y puede pasar electrones al oxígeno molecular y así producir ácido úrico, superóxidos y peróxido de hidrógeno.

Las mitocondrias son un orgánulo muy importante en la producción de ROS, ya que la producción de ROS es constante y hay ciertos mecanismos de transporte que proporciona la salida de las especies reactivas de oxígeno de este orgánulo hacia el citosol, gracias a mecanismos REDOX. Las ROS en la mitocondria están formadas por muchas enzimas tales como: aconitasas, p66shc, succinato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa y sobre todo la cadena transportadora de electrones (Gandhi S & Abramov AY, 2012; Andreyev AY y col., 2015). Tenemos que tener en cuenta que las mitocondrias poseen potentes antioxidantes en su matriz, pero que en ausencia de antioxidantes estos orgánulos están implicado en la producción de estrés oxidativo.

El óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora con importantes funciones fisiológicas en el sistema nervioso. NO es sintetizado por tres diferentes isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS), las cuales están presente en el sistema nervioso central (CNS). Se sugiere que el NO juega un papel importante en la regulación de las adaptaciones celulares, y controla un rango muy grande de procesos en el cuerpo, incluyendo señales intracelulares, función inmune, expresión de enzimas antioxidante e inflamación celular. Están implicadas en el aprendizaje, memoria y los procesos comportamentales y cognición (Zara S y col., 2011)

Con el reconocimiento del papel del NO en la plasticidad sináptica (potenciación a largo plazo y depresión a largo plazo) y la activación mediada por los receptores

NMDA dependiente de calcio de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS-NOS2); numerosas moléculas y fármacos han sido usados para el estudio de las funciones fisiológicas y patológicas mediadas por esta molécula.

Además, altos niveles de producción de NO reaccionan con las ROS para formar al intermediario peroxinitrito (ONOO^-) que es una especie altamente reactiva que contribuye al daño oxidativo y a la nitroxilación de las proteínas. Señales de NO anormales podrían contribuir a una variedad de patologías neurodegenerativas, como es el caso de la discapacidad intelectual, la excitotoxicidad, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Parkinson, entre otras. La isoforma de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) está inducida por exceso de ROS y citoquinas todo ello a través de la activación de factor nuclear κB (NF- κB), un factor de transcripción ubicuo que juega un papel primordial en regular el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. Bajo condiciones normales, NF- κB está presente en el citoplasma como un heterodímero inactivo.

El estrés oxidativo puede activar al complejo I κB kinasa (IKKs) y permite que la NF- κB quede libre para trasladarse hacia el núcleo y activar la expresión de determinados genes (Manna SK y col., 2010; Ahn KS, & Aggarwal BB, 2005). Respecto al cerebro, NF- κB se ha observado que está implicado en el proceso normal de la plasticidad sináptica y memoria, pero también en el mecanismo molecular de las enfermedades neurológicas (Albensi BC & Mattson MP, 2000).

DEFENSA ANTIOXIDANTE ENDÓGENA

Las células poseen mecanismos intrínsecos para controlar que los niveles de especies reactivas de oxígeno se encuentren en homeostasis o equilibrio. Estos mecanismos de control son la presencia de pequeñas moléculas antioxidantes o enzimas que eliminan a los ROS. Los sistemas antioxidantes del organismo se dividen en sistemas enzimáticos, constituido por enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa y sistemas no-enzimáticos, constituido principalmente por la vitamina E (α - tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A, carotenoides (β -caroteno y licopeno), flavonoides, metales de transición (Se, Zn, Mn,

Cu, Fe), glucosa, urato, glutatión reducido, bilirrubina y proteínas como albúmina, ceruloplasmina, ferritina y lactoferrina. La superóxido dismutasa (SOD) es la mejor enzima antioxidante y juega un papel importante en la eliminación de O_2^- . La familia superóxido dismutasa está especializada en la eliminación del radical anión superóxido, derivado de estímulos extracelulares y de la actividad mitocondrial. Se han distinguido tres isoformas de la superóxido dismutasa características de mamíferos: cobre-zinc SOD (Cu/Zn SOD) codificada por el gen *sod1*, manganeso SOD (MnSOD) codificada por el gen *sod2* y la SOD extracelular (ECSOD) codificada a su vez por el gen *sod3*. Todas estas isoformas actúan de la misma manera y tienen la misma función, pero tienen distintas estructuras, localización cromosómica, requerimientos de cofactores y compartimentación celular (Miao L & Clair DKS, 2009). Glutatión peroxidasa es el nombre que recibe una familia de múltiples isoenzimas que cataliza la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos a agua o su correspondiente alcohol. Para realizar esta reacción se ayuda del glutatión reducido (GSH) como donador de electrones ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GS-SG + 2H_2O$). En mamíferos hay cuatro isoformas distintas, siendo la GPX1 la que se localiza en las células gliales, donde la actividad GP es diez veces más activa que en neuronas (Margis R y col., 2008). Catalasas son enzimas importantes en la defensa contra el estrés oxidativo, estas enzimas contienen un grupo ferro-hemo. Las catalasas son enzimas que se responsabilizan de la conversión de peróxido de hidrógeno a agua. Generalmente están localizadas en unos orgánulos que son los peroxisomas, aunque también se pueden encontrar en el citoplasma y mitocondrias. La actividad catalasa es mayor cuanto más cantidad de peróxido de hidrógeno hay las células (Gandhi S & Abramov AY, 2012).

$2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow$	$H_2O_2 + O_2$	SUPERÓXIDO DISMUTASA
$H_2O_2 \rightarrow$	$2 H_2O + O_2$	CATALASA
$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow$	$GS-SG + 2H_2O$	GLUTATIÓN PEROXIDASA
$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow$	$2GSH + NADP^+$	GLUTATIÓN REDUCTASA

Tabla 4: Principal defensa antioxidante celular.

Tal como nos hemos referido antes, hay pequeñas moléculas que pueden actuar como antioxidantes, estas pueden ser:

GSH. El glutatión reducido es el principal antioxidante en el SNC, resulta ser un tripéptido que contienen a los aminoácidos glutamato, glicina y cisteína, siendo un antioxidante y agente reductor que puede reaccionar, sin la necesidad de enzimas, directamente con los radicales libres. El glutatión se encuentra presente a concentraciones de milimolar en las células eucariotas (James SJ y col., 2009) y las mitocondrias poseen entorno al 10-15 % del GSH total (convirtiéndose de esta manera en un importante elemento defensivo del estrés oxidativo que se produce en este orgánulo).

Las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa eliminan el H_2O_2 y mantienen al glutatión en su estado reducido. Diversas líneas de investigación dan evidencias claras de que la reducción del glutatión contribuyen a la fisiopatología de algunos desordenes neuropsiquiátricos, tales como esquizofrenia (Gysin R y col., 2007), desordenes bipolares (Andreazza AC y col., 2008), enfermedad de Parkinson (Serra JA y col., 2001), enfermedad de Alzheimer (Emerit J y col., 2004) y autismo (James SJ y col., 2009).

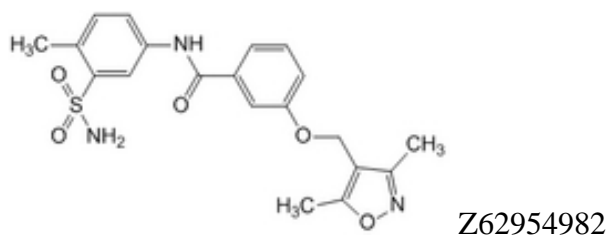
El ratio de GSH que se oxida hacia GSSG es considerado como un indicador reproducible del estado REDOX y puede ser usado como una medida clínica del estado oxidativo de un paciente.

Cuando existe un desequilibrio entre los ROS y los sistemas de defensa antioxidantes se produce un estado de estrés oxidativo, que es característico en algunas patologías, como el SXF (el Bekay R y col., 2007). Los pacientes afectados por el síndrome muestran un aumento de la actividad adrenocortical y esto altera el eje HPA (hipotálamo-pituitaria-glándulas adrenal) (Hessl D y col., 2002). Un exceso de hormonas adrenales está involucrado en la inducción del estrés oxidativo en el cerebro.

del cerebro por golpes, problemas cognitivos, hemorragia subaracnoidea y en el daño oxidativo típico de algunos desordenes neurodegenerativos (Carrizzo A y col., 2014).

Hay diversos mecanismos que regula la actividad de Rac. El ciclo de Rac GTPasa se encuentra entre un estado inactivo donde la proteína se encuentra unida a GDP y un estado activo donde la proteína se encuentra unida a GTP. La proteína GEF (Guanina Exchange factor) facilita la disociación de GDP de Rac1 y por lo tanto permite la entrada de GTP. A través de la interacción de GAP (GTPase-activating proteins) a la Rac 1 se pone en marcha la actividad intrínseca GTPasa haciendo que el GTP se transforme en GDP, por lo que la proteína se vuelve inactiva. En este momento se puede asociar el factor RhoGDI a Rac1 secuestrándola en su estado inactivo. Rac1 también cambia entre dos forma desde el citosol a la membrana a través de ciertas modificaciones post-transcripcionales que son la prenilación de ciertas proteínas, estas modificaciones aparecen ser necesarias para la translocación hacia la membrana (Mack NA y col., 2011; Tejada-Simon MV, 2015). La proteína FMRP y Rac1 interactúa genéticamente a través de la proteína CIFYP 1 y 2, efector de Rac 1, controlando la formación de las espinas dendríticas; indicando que Rac1 es responsable de la mediación del efecto de *FMRI* en el desarrollo de las espinas dendríticas (Castets M, y col., 2005). Rac 1 juega un papel en el desarrollo, maduración y mantenimiento de las espinas dendríticas debido a su papel regulador de la remodelación de citoesqueleto de actina.

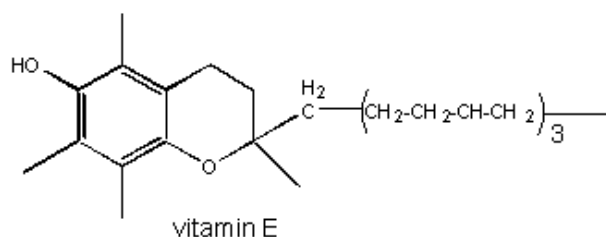
Al menos 4 componentes han sido descrito que poseen función de inhibidor de Rac1: NSC23766, (N6-)-2-((4-(Diethylamino)-1-methylbutylamino)-6-methyl-4 pyrimidinyl-2-methyl-4,6-quinolinediamine trihydro-chloride) , EHop-016, AZA1 y Z62954982 (isoxazolyl-benzamide). El inhibidor utilizado en este trabajo es Z62954982 (InSolution™ Rac1 Inhibitor II, Millipore) que es una benzamida selectiva que induce la inactivación de Rac1 al interferir la interacción de la unión Rac1-Tiam1 (Ferri, N., y col. 2009).



VITAMINA E

El término vitamina E se refiere a una familia de lípidos provenientes de plantas. Dentro de esta familia hay ocho miembros, los ocho isómeros de esta familia tienen, todos, un anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide. Se distinguen entre ellos o bien por poseer un patrón de metilación distinto en el anillo cromano (distinguiéndose alfa-, beta-, delta- o gamma-tocoferol) o bien por la presencia de saturación o no en la cadena de poliprenoide (saturada corresponderán a los tocoferoles y si es insaturada, a los tocotrienoles). Común a todos los miembros de la familia de vitamina E es la presencia de un grupo hidroxilo fuertemente electrofílico en el anillo cromano capaz de donar un átomo de hidrógeno para reducir radicales libres, por eso la vitamina E es un potente antioxidante (Ulatowski LM & Manor D, 2015).

La función de la vitamina E ha sido tradicionalmente adscrita como un nutriente antioxidante. Esta noción es basada en la cantidad tan grande de literatura que demuestra la eficacia y seguridad de la vitamina E como un elemento neutralizador de radicales peróxidos asociados a lípidos, que han sido generados a través de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Burton & Traber, 1990). Las reacciones donde intervienen el tocoferol son reacciones extremadamente rápidas (entorno a $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Atkinson y col., 2008; Atkinson y col., 2010). Muchos de los trabajos de vitamina E han sido realizados en el alfa-tocoferol, ya que es la vitamina E predominante en los tejidos.

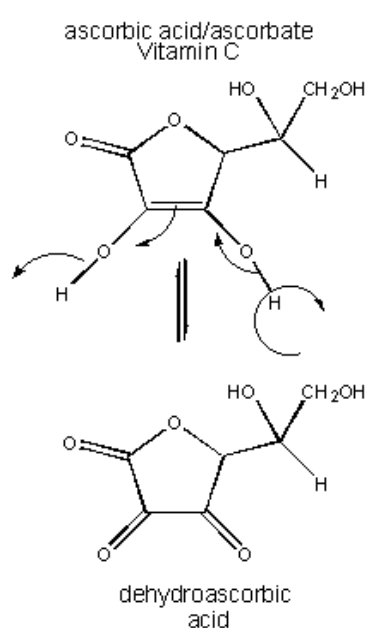


Numerosos estudios han establecido la evidencia de que la vitamina E juega un papel crucial en el mantenimiento de la salud neurológica. La primera enfermedad neurológica y neuromuscular donde se ve que la deficiencia de vitamina E tiene una importancia específica fue la ataxia espinocerebral (Sokol RJ, 1988). Se ha utilizado las vitaminas E por ejemplo para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

(ELS) ya que en esta enfermedad se ve afectada la enzima SOD1 (Graf M y col. 2005), la enfermedad de Alzheimer (AD) donde el estrés oxidativo esta muy relacionado con ella (Dysken MW y col., 2014) ya que se ha observado que afecta tanto a lípidos produciéndose la peroxidación de los mismo, ácidos nucleicos y oxidación de proteínas y enzimas; la enfermedad de Parkinson (PD) y la enfermedad de Huntington (Kamat CD y col., 2008). Además, la vitamina E redujo la peroxidación lipídica y la deposición amiloide en un modelo de ratón transgénico para la enfermedad de Alzheimer. La vitamina E desarrolla actividad antioxidante en lipoproteínas del líquido cefalorraquídeo en presencia de cantidades fisiológicamente relevantes de oxidantes.

VITAMINA C

La vitamina C (vit C) es una vitamina soluble en agua que contribuye como un donador de electrones en importantes reacciones biológicas en el cuerpo. La forma activa de la vit C es el ácido L-ascórbico, que primeramente existe como monoanión ascórbico a pH fisiológico (Dhariwal KR y col., 1991). Muchas especies son capaces de sintetizarla en el hígado a partir de glucosa, pero otras especies como murciélagos, cerdos, peces, primates e incluso humanos no la sintetiza por lo que tienen que suplirse a través de la dieta.



La toma y distribución de la vit C en el cuerpo está bajo un estricto control homeostático. La entrada de la vit C en las células se produce por transportadores específicos de vitamina C dependiente de sodio (SVCT 1 y 2), estos transportadores intercambian sodio por la vitamina C. En el cerebro el transporte depende de SVCT 2 que gobierna el transporte a través de los plexos coroideos hacia el fluido extracelular y que está alrededor de las neuronas (Rice, M.E. 2000).

La versatilidad funcional de la vit C relacionada con la estructura e integridad funcional del cerebro, lleva a pensar que la deficiencia de vit C en el sistema nervioso puede da lugar disfunciones cognitivas. Muchos experimentos han apoyado el papel crucial de la vit C en el cerebro siendo un potente antioxidante y eliminador de ROS, así como de un importante factor en el reciclaje de los antioxidantes del cerebro (por ejemplo la vitamina E, de la que hemos hablado en el anterior punto).

La función de la vit C en la integridad de los vasos sanguíneos, el balance REDOX y neuromodulación en el cerebro han llevado a que se desarrollen investigaciones sobre el efecto de la vitamina en el desarrollo del cerebro y el envejecimiento. El desarrollo neuronal y la maduración están comprometidos por falta de vitC, dado que su deficiencia da lugar una disminución del volumen cerebral. El desequilibrio REDOX en el cerebro ha sido asociado con isquemias, Alzheimer y la enfermedad del Huntington (Hansen SN y col., 2014).

El ácido ascórbico ha sido utilizado para atenuar la enfermedad de Huntington (Rebec, G.V y col., 2003), como posible tratamiento en la enfermedad de Alzheimer (Heo JH y col., 2013). Junto a estas dos enfermedades, la vit C se ha utilizado para mejorar el estado de demencia de pacientes adultos (Gray, S.L y col., 2008).

Usando el modelo animal de Fmr1-KO, nuestro grupo previamente ha demostrado que el estrés oxidativo es el primer factor involucrado en la fisiopatología de Fmr1-KO. En cerebros de ratones Fmr1-KO se encontraron incrementos en los niveles de ROS, peroxidación lipídica (medida como TBARS) y oxidación proteica (medido mediante los grupos carbonilos) respecto a ratones sanos-WT.

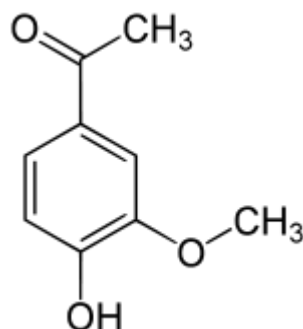
La actividad NADPH oxidasa también se observó que esta alta en ratones Fmr1-KO, así como los niveles antioxidantes del glutatión están alterados en los cerebros de los ratones nulos para FMRP (el Bekay R y col., 2007). Este patrón de alteración refleja un desequilibrio entre la formación de ROS y de antioxidantes, lo que provoca un daño oxidativo que se manifiesta con peroxidación lipídica y de proteínas que son marcas del SXF

Es por tanto que se llevaron a cabo estudios preclínicos usando antioxidantes como α -tocoferol o melatonina. La administración crónica de antioxidantes hacen que se reviertan ciertas características fenotípicas del ratón con SXF (De Diego-Otero y col., 2009; Romero-Zerbo et al, 2009). También se desarrolló un ensayo clínico controlado con placebo con una combinación de antioxidantes (α -tocoferol y ácido ascórbico) mejorando significativamente el comportamiento y cognición (de Diego-Otero Y y col., 2014).

APOCININA

La apocinina (apo) fue primeramente descrita por Schmiedeberg en 1883 y extraída desde las raíces de la *Apocynum cannabinum*, fue el remedio oficial que se usó para los problemas de corazón. En 1971, la apocinina fue identificada durante el aislamiento de los elementos inmunomoduladores desde las raíces de *Picrorhiza kurroa*. La apocinina es una acetofenina de peso molecular 166,17 kD y cristaliza en el agua, ha sido utilizada como un inhibidor eficiente del complejo NADPH oxidasa en muchos modelos experimentales.

APOCININA



La apocinina es un inhibidor de la translocación de componentes citosólicos del complejo de la NADPH oxidasa presente en las membranas celulares (Peters EA y col., 2001). La activación de la NADPH oxidasa está asociada al reclutamiento de todas las subunidades entorno a la membrana (Smit HF y col., 2001). Podemos considerar este compuesto como un inhibidor selectivo de la actividad NADPH oxidasa y su concomitante producción de ROS, ya que inhibe principalmente a la translocación de la subunidad p47^{phox} (Stolk J y col., 1994).

La apocinina presenta un efecto protector en distintos órganos como son riñones y corazón, debido a su propiedad de reducir el estrés oxidativo, así se demuestra en el uso beneficioso de la apocinina en el tratamiento del síndrome cardiorrenal tipo 4 (Liu Y y col., 2015). Los derivados de la apocinina inhiben ciertas señales intracelulares que dan como resultado un decrecimiento en la migración de las células en el cáncer de mama. Estos derivados de la apocinina causan un reagrupamiento significativo del citoesqueleto de actina ya que disminuyen los niveles de Rac1 activa y Cdc42. Esta posible relación entre Rac1 y apocinina es lo que le daría a la apocinina un carácter antitumoral (Klees RF y col., 2006).

En relación con enfermedades mentales se ha observado que la apocinina protege contra la isquemia global inducida tanto por estrés oxidativo como por daño neuronal del hipocampo y que la inhibición de la producción de ROS por el tratamiento con apocinina preserva la barrera hematoencefálica.

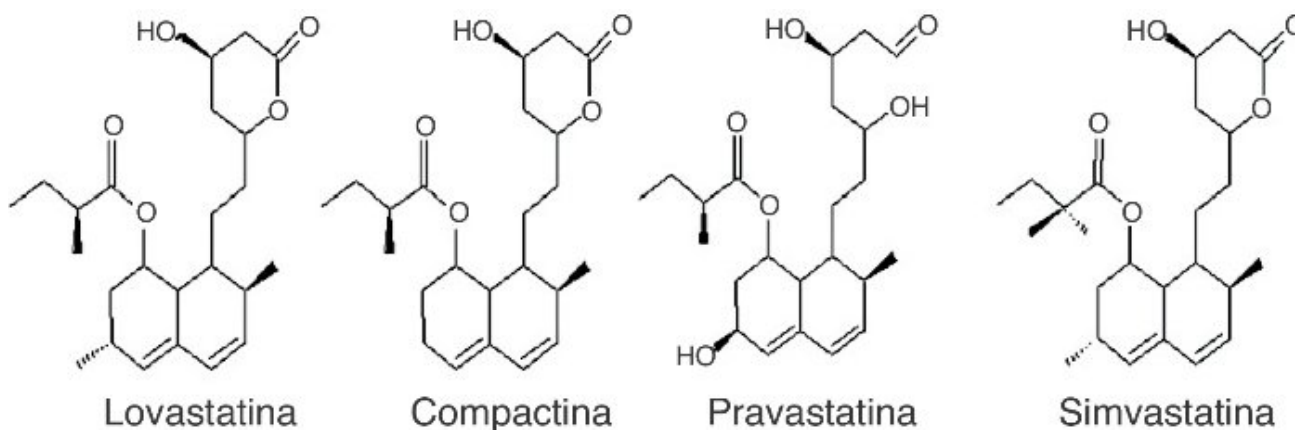
Se ha demostrado que los ratones que tienen la p47^{phox} silenciada (también conocido como factor citosólico neutrófilo-NFC) muestran resistencia a la esclerosis lateral amiotrófica inducida (EAE) (van der Veen RC y col. 2000), dando la idea que la apocinina puede ser considerado como un compuesto protector en esta enfermedad y la aplicación de apocinina en ratones con EAE inducida reducen sus signos clínicos (Choi BY y col., 2015).

ESTATINAS

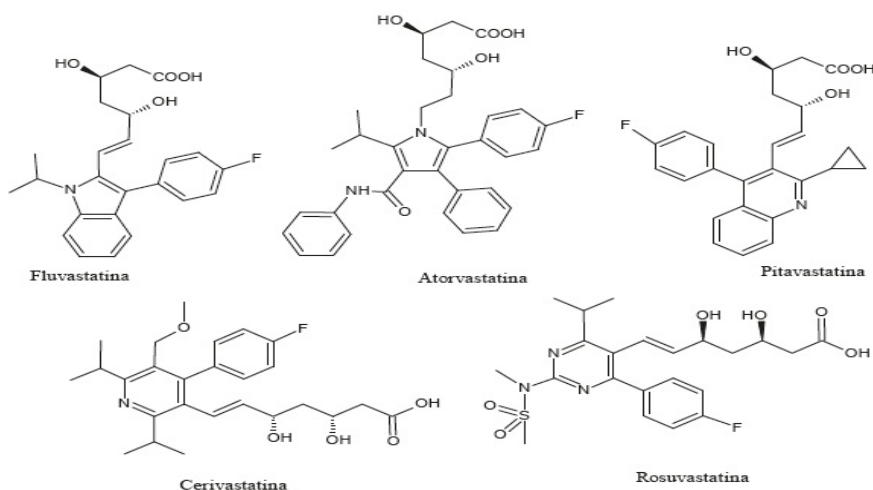
La síntesis del colesterol es un proceso donde interviene una gran cantidad de enzimas, entre la que se encuentra la 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa). Esta enzima cataliza la conversión de la HMG-CoA a mevalonato, que es un metabolito clave en la biosíntesis de colesterol. Son moléculas que se caracterizan por inhibir la acción de esta enzima, ya que poseen una estructura similar a la molécula HMG CoA. La afinidad de las estatinas por la enzima es de 1.000 a 10.000 veces la del sustrato natural (Wang TJ y col., 2001). Las estatinas son unas de las medicinas más efectiva y ampliamente usadas para la reducción de los niveles de LDL (lipoproteína de baja densidad) de colesterol en sangre y reducir los eventos cardiovasculares (Genest J y col., 2009).

A pesar de que todas las estatinas actúan a través del mismo mecanismo, estas pueden estar divididas en dos categorías basadas según su origen:

- Derivadas de hongos: Lovastatinas, simvastatina, mevastatina y pravastatina.



- Derivados sintéticos: fluvastatina,, atorvastatina, pitavastatina, cerivastatina y rosuvastatina



Todas son hepatoselectivas ya que es el hígado el que toma gran cantidad de estatinas absorbidas en el tracto intestinal (van der Most PJ y col., 2009). En este último año diversos artículos se refieren al efecto de la simvastatina en cerebro de roedores. Se ha llevado a cabo un estudio donde se ve que efecto podría tener la simvastatina en la expresión de iNOS (sintasa del óxido nítrico inducible) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) en modelos de ratas con la enfermedad de Parkinson (Tan W y col., 2015). También se ha evaluado el efecto protector de la misma en ratas a las cuales se le indujeron ataques epilépticos mediante la aplicación de pilocarpino (Li MQ y col., 2015). Además del recobro de la expresión de ciertos factores neuronales después del tratamiento de la demencia con simvastatina (Tušková R y col. 2015)

Se ha descrito que existe un efecto de las estatinas en la reducción de la activación de Rac1 (Adam, O. & Laufs, U. 2014), que podría ser muy interesante en patologías del sistema nervioso donde Rac1 está hiperactivada como es el caso del SXF, pudiendo ser una diana terapéutica que se está probando en el modelo animal y en humanos (Osterweil EK y col., 2013).

En esta tesis doctoral hemos hecho uso de dos estatinas diferentes: una estatina A así como una estatina B, cedidas por los laboratorios de la empresa NeuronBio SL (Granada).

ESTATINA -B

Es una molécula sintetizada y patentada por la empresa NeuronBio S.L, que tiene analogía funcional con la simvastatina pero con modificaciones en su estructura que la hacen tener un potencial neuroprotector mayor. Sobre ella no puedo hacer ninguna mención debido al contrato de confidencialidad que tenemos con la empresa. La empresa NeuronBio ha autorizado incluirlas en la tesis doctoral.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

El SXF es la discapacidad intelectual genética hereditaria más frecuente y está relacionada muy frecuentemente con el autismo. La prevalencia de esta enfermedad es de 1/2500 varones y 1/4000 mujeres. Una mutación dinámica, por expansión de trinucleótidos citosina-guanina-guanina (CGG) en el promotor del gen *Fmr1* (*Fragile X Mental Retardation*), conduce a la ausencia de la proteína FMRP, debido principalmente a una modificación epigenética por hipermetilación de las citosinas del promotor. Las características más repetidas del síndrome son discapacidad intelectual, anomalías faciales, macroorquidismo, displasia del tejido conjuntivo, otitis recurrentes, autismo, hiperactividad y convulsiones. Para el presente trabajo se utilizó el ratón nulo como modelo animal de la enfermedad, que muestra características comparables a las observadas en humanos afectados, como macroorquidismo, problemas de comportamiento, espinas dendríticas alteradas, convulsiones e hiperactividad. Todo esto hace que el ratón *Fmr1*-KO sea un eficaz modelo animal para estudiar las alteraciones relacionadas con la ausencia de FMRP y por lo tanto para analizar nuevas dianas terapéuticas del síndrome. La carencia de la proteína FMRP produce estrés oxidativo por una elevada actividad del complejo proteico NADPH-oxidasa. El aumento de ROS podría estar detrás del deterioro cognitivo y comportamental de los ratones *Fmr1*-KO. El tratamiento crónico utilizando moléculas que regulen la NADPH-oxidasa, podría significar una vía de tratamiento experimental para el Síndrome X frágil, que carece que tratamientos específicos eficaces en la actualidad.



Figura 14. Resumen del efecto sobre NADPH oxidasa de los distintos tratamientos que se van a aplicar. Las distintas moléculas actúan en diferentes elementos del complejo proteico NADPH oxidasa, afectando al ensamblaje del complejo o paliando los posibles efectos perjudiciales de la sobreproducción de ROS.

OBJETIVOS

1. Analizar el metabolismo del óxido nítrico, medir la concentración de nitritos/nitratos, proteínas nitrosiladas, estrés nitrosativo, y la expresión de las distintas isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) en áreas cerebrales como cerebelo, corteza e hipocampo.
2. Estudiar la vía de señalización y regulación de la proteína Rac1-GTPasa en los ratones Fmr1-KO en tres áreas cerebrales.
3. Ver el efecto del tratamiento crónico con un inhibidor de Rac1, sobre la densidad de espinas dendríticas y en el comportamiento de ratones Fmr1-KO.
4. Analizar la efectividad del tratamiento crónico con ácido ascórbico (vitamina C) y su combinación con α -tocoferol (vitamina E) en ratones Fmr1-KO. Estudiar el estrés oxidativo en cerebro y la actividad locomotora, ansiedad y aprendizaje mediante pruebas estandarizadas antes y después del tratamiento.
5. Estudiar la efectividad del tratamiento crónico con apocinina, un inhibidor de la subunidad p47 de la NADPH oxidasa. Analizar los parámetros bioquímicos en relación al estrés oxidativo y el comportamiento de los ratones Fmr1-KO antes de después del tratamiento.
6. Estudiar los efectos del tratamiento agudo con dos estatinas (SIM y NTS) inhibidores de la enzima HMG-CoA que a su vez impiden el ensamblaje de Rac1 en el complejo NADPH-oxidasa. Analizar los parámetros bioquímicos en relación al estrés oxidativo y su comportamiento de los ratones Fmr1-KO antes y después del tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. MARCAJE Y GENOTIPADO DE LOS ANIMALES.

A los ratones a la edad de 21 días se procede al destete, es decir separarlo de la madre. Una vez separados se ponen los machos en una jaula y las hembras en otra jaula, teniendo en cuenta que el cupo por jaula es de 5 animales (5 animales/jaula).

Después de la separación en distintas jaulas se le realiza el marcaje. Para ello vamos a proceder al corte de un dedo de la pierna izquierda, de esta manera se diferenciará a los ratones en un futuro. Se aprovecha la ocasión y el dedo cortado se pone en un Eppendorf debidamente rotulado y se congela hasta su uso para la extracción del DNA, de esta manera tenemos el tejido suficiente para realizar la extracción del DNA sin tener que provocarle más daño al animal. Este DNA servirá para el genotipado de los animales, ya que mediante la reacción de PCR con unos determinados primers obtendremos el genotipo de cada ratón. En el caso de que no se haya obtenido el tejido durante el marcaje del ratón se podría recurrir al corte de una pequeña fracción de cola (4-5 mm).

La extracción de DNA se basa en la digestión del tejido con proteinasa K en un tampón Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM y detergente (lauril sulfato sódico-SDS). Después de la digestión del tejido precipitamos las proteínas mediante el uso de una solución de NaCl 6 N. En el sobrenadante de dicho precipitado se hallará el DNA, el mismo que se precipita con el uso de etanol al 100%. El precipitado se lava con etanol al 70 %, además de ir eliminando posibles sales que estén adherida al DNA. El DNA se deja secar al aire libre para que se elimine el etanol sobrante, una vez pasado 30 minutos se le pone 50 µL de H₂O PCR Grade para rehidratar el DNA.

Para la digestión del tejido se pone 300 µL de tampón de extracción, 20 µL de proteinasa K (10mg/mL) y 15 µL de una solución de SDS al 20% en H₂O miliQ. Dejándose incubar en un baño (Selecta, Unitronic-OR, Barcelona, ESPAÑA) a 56°C durante 24 horas con agitación constante. La precipitación de las proteínas por sales (*salting-out*) se realiza poniendo a 100 µL de NaCl 6N en el producto de la digestión, todo se centrifuga a 13000 x g (Eppendorf, Hamburgo, ALEMANIA) durante 15 minutos a 4°C. En el sobrenadante de dicha precipitación se encontrará el DNA, para

precipitarlo le pondremos 600 μL de etanol al 100 %. Centrifugamos a 13000 x g durante 10 minutos a 4°C. Al pellet, fracción que contendrá el DNA precipitado se le lava con 100 μL de etanol 70°; para ello lo resuspendemos en esta cantidad de etanol y lo centrifugamos a 13000 x g durante 5 minutos a 4°C. Eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el DNA unos 30 minutos. Una vez seco ponemos 50 μL de H₂O PCR Grade para rehidratarlo y se guarda a 4 °C.

Pasada 24 horas desde la extracción, tiempo que sirve para que el DNA se hidrate y se estabilice, se mide su concentración por absorbancia del DNA a 260 nm para ello se utiliza el medidor de absorbancia NanoDrop2000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Wilmington, USA) donde se medirá la concentración de DNA de la muestra y la pureza de la extracción mediante el valor de 260/280.

Conocida la concentración de DNA que se posee en cada muestra, se preparará una dilución para conseguir la concentración de uso de 50 ng/ μL . La dilución se realiza en el mismo disolvente donde se resuspende el DNA, H₂O PCR Grade.

El genotipado se realiza mediante el uso de una PCR con diferentes pares de *primers* (WT y KO) para distinguir a los ratones WT y KO. En esta PCR se utiliza un kit comercial de SIGMA (SIGMA ALDRICH, RedTaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix With MgCl₂, Missouri, USA), compuesto por una solución mezcla de 0.06 U/cl de la enzima Taq DNA polimerasa, 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM KCl, 3 mM MgCl, 0.02% gelatina, 0.4 mM de una mezcla de dNTP (dATP, dCTP y dGTP, dTTP) y estabilizadores. A este producto se le pone la mezcla de primers correspondiente, así como el DNA. Los *primers* utilizados tienen estas secuencias

WT	Forward	5' -GTGGTTAGCTAAAGTGAGGATGAT- 3'
	Reverse	5' -CAGGTTTGGTGGGATTAACAGATC- 3'
KO	Forward	5' - ATCTAGTCATGCTATGGATATCAGC- 3'
	Reverse	5' - GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGG- 3'

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados en la reacción de PCR

Para la realización de la PCR se toman 5 μL del kit comercial de SIGMA, a los que se le añade 0,2 μL de cada primer (forward y reverse) y 1 μL de DNA a la concentración de 50 ng/ μL , completándose la reacción hasta 10 μL con H_2O .

PRODUCTO	VOLUMEN (μL)
RedTaq ReadyMix-PCR Reaction	5
Primer forward	0,2
Primer reverse	0,2
DNA (50 ng/ μL)	1
H_2O PCR grade	3,6

Tabla 6. Volumen de cada producto de la reacción de PCR

Una vez que se tiene preparada la reacción de PCR, esta es llevada a un termociclador (MBS Satellite 0,2 G Thermal Cycler, THERMO FISHER SCIENTIFIC, Wilmington, USA) con el siguiente programa cargado.

PASO	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TIEMPO	CICLOS
Activación de la enzima	94 $^{\circ}\text{C}$	10 minuto	1
Desnaturalización	94 $^{\circ}\text{C}$	30 segundos	35
Hibridación	55 $^{\circ}\text{C}$ ó 63 $^{\circ}\text{C}$	1 minuto	
Polimerización	72 $^{\circ}\text{C}$	30 segundos	
Polimerización final	72 $^{\circ}\text{C}$	10 minutos	1
Conservación	4 $^{\circ}\text{C}$	Infinito	

Tabla 7. Programa de PCR utilizados. La hibridación a 55 $^{\circ}\text{C}$ es utilizada para los *primers* WT, mientras que la hibridación de 63 $^{\circ}\text{C}$ es utilizada para los KO

La temperatura de hibridación varía en función si la reacción se esta llevando a cabo con los *primers* de WT (55 $^{\circ}\text{C}$) mientras si se está utilizando la pareja de *primers* para KO la temperatura de hibridación será de 63 $^{\circ}\text{C}$.

Al producto de la reacción se resolvió mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA y 5 μL de intercalante (GoldViewTM Nucleic Acid Stain, Gentaur GMBH, Marienbongard 2, Aachen, ALEMANIA). En cada pocillo se carga las 2 reacciones de la misma muestra previamente mezclada y se le aplica una carga de 85 V (150 mA) durante 60 minutos. El producto de la electroforesis se

visualiza bajo luz ultravioleta (UV) en el ImageQuant LAS 4000 (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, Little Chalfont, UK). Lo esperable es que se obtenga una banda de 465 pb en las muestras correspondientes a los ratones normales (WT) y de 800 pb en las muestras correspondiente a ratones mutados (Fmr1-KO). El patrón de peso molecular utilizado contiene 10 bandas (1Kb leader SIGMA ALDRICH, Missouri, USA) con un rango que va desde 100 a 1000 pb con un intervalo de 100 pb entre cada una de ellas.

2. TRATAMIENTOS

Se realizaron tratamientos tanto crónico como agudo mediante la administración por vía intraperitoneal (i.p.) de los compuestos: vitamina E (α -tocopherol), estatinas (SIM y NTS, proporcionadas por la empresa NeuronBio) y el inhibidor específico de Rac1 (Z62954982 (isoxazolyl-benzamide)) a una determinada dosis, diaria en función del tratamiento. En algunos casos se le suministró el tratamiento en el agua de bebida, es el caso de los compuestos: vitamina C (ácido ascórbico) y el inhibidor de la NADPH oxidasa (apocinina) Los grupos de ratones fueron tratados con suero fisiológico (0.9% NaCl) o agua de inyección comercial como control de los tratamientos.

COMPUESTO	DOSIS	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	TIPO DE TRATAMIENTO
Inhibidor Rac 1- Z62954982	2mg/kg/día	Administración intraperitoneal	Crónico 30 días
Vitamina E (α -tocopherol)	1.5 mg/kg/día	Administración intraperitoneal	Crónico 30 días
Vitamina C (ácido ascórbico)	1.5 mg/kg/día	Administración oral	Crónico 30 días
Inhibidor NADPH oxidasa-Apocinina	8mg/kg/día 32 mg/kg/día	Administración oral	Crónico 30 días
Estatina A SIM	1.5 mg/kg/día	Administración intraperitoneal	Agudo 7 días
Estatina B NTS	1.5 mg/kg/día	Administración intraperitoneal	Agudo 7 días

Tabla 8. Resumen de las dosis de los tratamientos aplicados a los ratones.

Las distintas dosis para cada tratamiento fueron preparadas a partir de la droga pura utilizando suero fisiológico estéril como diluyente en el caso de la vitamina E, en el caso del inhibidor de Rac1 se utilizó agua inyectable comercial con DMSO al 10% y en el caso de las estatinas el diluyente fue una sustancia que la misma empresa NeuronBio proporciona. En el caso del tratamiento oral el diluyente va a ser la misma agua filtrada que los ratones beben, en este caso suministrada por el Estabulario de la Facultad de Medicina de Málaga.

3. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO-*OPEN FIELD EXPLORATION*

La prueba de exploración de campo abierto da la oportunidad única de medir sistemáticamente la exploración a un nuevo ambiente, la locomoción general y proveer de una aproximación a la ansiedad que sufre los ratones. Repeticiones de la prueba da un método de medida de la habituación a un ambiente familiar. Hay dos factores que tienen influencia en los resultado del comportamiento en este tipo de test la primera es el aislamiento social que se produce y la segunda es el estrés creado por el nuevo ambiente (Prut L y col., 2003).

Hay diversas formas que han sido utilizadas para la realización de la prueba del campo abierto, la más común es la que hemos utilizado en esta tesis doctoral que es un laberinto en forma de cubo. El sistema está compuesto por cuatro arenas distintas unidas en forma de cuadrado (2 x 2 arenas), de la cuales cada arena tiene un tamaño de 50 x 50 cm con 50 cm de altura, siendo iluminada por una lámpara de intensidad constante y baja. El material con el que está hecho el laberinto es plástico y tiene una superficie con fondo negro.

El movimiento es captado por una cámara encima de las cuatro arenas, pudiéndose registrar el movimiento de cuatro ratones a la vez. El movimiento es registrado y analizado por el programa informático SMART (PANLAB, Barcelona, ESPAÑA), monitorizándose el movimiento que hay en la zona central y periférica de cada arena.

Los animales, 30 minutos antes de empezar la prueba, se llevaron a la habitación donde se desarrollaría el comportamiento. Este tiempo sirve para que los animales se aclimaten a la habitación de comportamiento. Para el desarrollo de la prueba se pone al ratón en el centro de la arena, permitiéndose que explore la arena durante 15 minutos. El programa SMART, registró el tiempo de permanencia en la zona central, zona periférica, la distancia total recorrida y el número de cruces entre zonas.

Una vez que pasa el tiempo de la sesión el animal retorna a la jaula donde estaba y el laberinto se limpia con agua jabonosa para eliminar posibles olores y así tener claro que el comportamiento se produce sin tener nada que ver el olor.



Figura 5: Laberinto campo abierto.
(x) posición del animal al comenzar la prueba

Figura 15. Representación de las zonas del laberinto y laberinto utilizado en el experimento, el fondo del laberinto en lugar de blanco es negro.

RECONOCIMIENTO DE OBJETO

En esta prueba de comportamiento utilizamos el mismo laberinto utilizado para la prueba del campo abierto (50 x 50 cm) hecho de Plexiglás gris. Esta técnica se basa en el protocolo propuesto por Ventura y colaboradores en su trabajo de 2004, donde estudiaban el efecto de la dopamina en la corteza prefrontal asociándolo a una mejoría en la capacidad de reconocer objetos (Ventura R y col., 2004).

Los objetos utilizados en este caso son un cilindro de plástico color violeta con tapa del mismo color de 8 cm de alto y 4 cm de diámetro (Objeto A), y otro cilindro de color blanco con tapón blanco de 8 cm de alto y 5 cm de diámetro (objeto B).

En el primer día del test se transportaron los ratones a la sala de comportamiento donde se dejaron 30 minutos para que se aclimataran a la sala. Una vez pasado este tiempo se ponen en la arena durante 50 minutos para que exploren el laberinto, quedando registrado y analizado por el programa SMART (PANLAB, Barcelona, ESPAÑA) lo que ocurre en cada intervalo de 10 minutos para ver si hay una adaptación al laberinto. Después de cada prueba se limpió el laberinto con una solución jabonosa para eliminar los olores que pudieran quedar en el campo abierto, haciéndose de esta manera la prueba siguiente sin dudas de que los ratones siguen el rastro del anterior.

El segundo día se procedió a la prueba de reconocimiento de objetos, donde se establece dos sesiones consecutivas. Una sesión pre-análisis donde al animal se le deja unos 10 minutos con dos objetos similares, dos objetos A. Terminada la sesión se saca al ratón y se le pone tres minutos en la misma jaula donde estuvo antes y unos de los anteriores objetos A es sustituido por un objeto B. La sesión análisis dura también 10 minutos y se realiza con dos objetos diferentes (A y B). Los ratones tienen la tendencia natural a explorar los objetos nuevos en comparación con los objetos familiares.

En ambos casos se mide la distancia total recorrida por el animal y el tiempo que el ratón está en contacto con cada objeto, siendo definido el contacto con el objeto como cuando el animal con su hocico toca el objeto quedando todo registrado y analizado por el programa SMART (PANLAB, Barcelona, ESPAÑA).

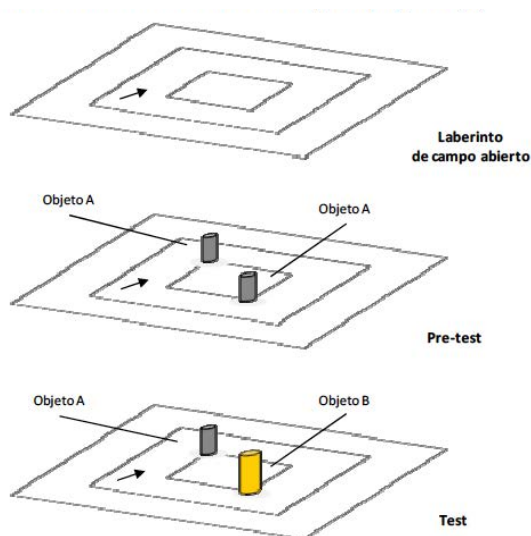


Figura 16. Representación de la localización de los objetos durante cada momento del experimento.

LABERINTO EN CRUZ ELEVADO- *ELEVATED PLUS MAZE*

La prueba de comportamiento del laberinto en cruz elevado es una de las más empleadas para evaluar y medir el comportamiento relacionado con la ansiedad (Lister, RG, 1987). La prueba se basa en la natural aversión de los ratones a las zonas abiertas y elevadas, así como de su comportamiento espontáneo exploratorio en nuevos ambientes. El laberinto en si consta de dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, cruzados en el medio perpendicularmente el uno con el otro, y un área central. A los ratones se les permite explorar todas las áreas y mover libremente entre ellas. El número de entradas en el brazo abierto y el porcentaje de tiempo, son usados como indicios de ansiedad en ratones.

El laberinto tiene una configuración en cruz, compuesto de dos brazos abiertos (25 cm de largo x 5 cm de ancho) y dos brazos cerrados perpendiculares de mismo tamaño (25 cm de largo x 5 cm de ancho x 20 cm de alto). Tiene una plataforma central (5 x 5 cm) donde se sitúa al animal al inicio de la prueba. Al brazo abierto se le pone un foco de luz de intensidad constante y perpendicular al laberinto, iluminando de esta manera las zonas abiertas además de mantener a las zonas cerradas en oscuridad. El laberinto se encuentra elevado a 50 cm de altitud y tiene un color negro que facilita el reconocimiento del animal por parte del sistema de captación.

Los ratones antes de empezar la prueba se dejaron en la habitación de comportamiento durante 30 minutos para que se aclimataran a la habitación. Pasado el periodo de aclimatación, se coge al ratón y se le sitúa en el área central del laberinto con su cabeza en dirección hacia el brazo cerrado, dejándose que los ratones se muevan libremente y exploren durante 5 minutos.

La prueba se graba utilizando un sistema de grabación acoplado a un ordenador que posee el programa de adquisición y análisis del movimiento del ratón SMART, (PANLAB, Barcelona, ESPAÑA). En este programa se controlan el número de entradas (considerando cada entrada como la entrada del centro de masa del ratón) en cada zona y el tiempo gastado en cada una de ellas.

Después de cada prueba, cada brazo y la zona central es limpiada con una solución jabonosa que elimina eficientemente el olor del ratón, así se puede conducir el test bajo unas condiciones donde los ratones no puedan seguir ningún rastro de olor.

La distancia recorrida, el número de entrada en cada brazo y el tiempo de permanencia en cada uno de ellos por cada ratón es calculado por el programa SMART. Así con lo cual la reducción en la exploración de los brazos abiertos del laberinto, sirven como medida de evaluación del incremento en los niveles de ansiedad.



Figura 17. Representación del laberinto en cruz elevado. Mide el comportamiento ansioso del ratón. El ratón comienza la prueba en la zona central del laberinto y la duración de la prueba es de 5 minutos.

ANÁLISIS DEL MIEDO CONDICIONADO- TEST SHUTTLE BOX

El análisis del miedo condicionado se estudio mediante la adaptación del protocolo propuesto por Phillips & LeDoux en 1992 (Phillips RG & LeDoux LG, 1992).

Para el desarrollo del procedimiento vamos a tener un estimulo condicionado (sonido) seguido de un estimulo incondicionado (descarga eléctrica en los pies del animal), todo ello provoca una respuesta al miedo desde los animales. La respuesta al miedo es la paralización del ratón, *freezing*, que es una medida fiable del miedo.

El laberinto utilizado para el análisis del medio condicionado está constituido por una caja de plexiglás, 22.5 cm de ancho y 32.5 cm de largo, con paredes negras y lisas de 33.3 cm de alto. El suelo de todo el laberinto va a ser de reja, a través de la cual se pasará una corriente eléctrica que es el estímulo incondicionado.

En el primer día de test se dejaron los animales en la sala de comportamiento 30 minutos para que se aclimataran a la sala, tal como se hizo en las anteriores pruebas. Cuando se pasa la aclimatación se ponen al ratón en la caja dejándose 5 minutos para su habituación y exploración al laberinto. Tras este tiempo, se procede a la realización de tres ciclos de entrenamiento de un total de 3 minutos:

1. Estímulo condicionado: 30 segundos de sonidos a 85 dB y 0,2 Hz de intensidad
2. Estímulo incondicionado: descarga eléctrica en las patas en los 2 últimos segundos del estímulo condicionado a 0,35 mA.
3. Reposo de 30 segundos

Seguido este entrenamiento se deja que el animal explore el laberinto un tiempo de 5 minutos donde se anotará el comportamiento y respuesta al miedo condicionado (post-EI), haciéndose hincapié en el tiempo de *freezing* y el número de *freezing*. Se deja al animal en la jaula donde estaba al principio. Pasada dos horas del condicionamiento se vuelve a poner al ratón en la caja observándose el comportamiento durante 5 minutos (post-EI 2 h).

Al segundo día del test se coge al ratón y se le introduce en la caja de la prueba, es decir en el mismo contexto donde se realizó el entrenamiento el día anterior, y se le observó durante 5 minutos (post-EI 24 h). Se devuelve al animal a la jaula y se le deja 90 minutos de descanso.

Pasado este tiempo se colocó al ratón en una nueva caja (caja de experimento) de Plexiglás de mismo tamaño y medidas que la caja de prueba pero con la diferencia que las paredes en este caso en lugar de ser completamente negra son negras y blancas, además de que el suelo no es de rejilla sino que es de goma. Esta caja se le puso un algodón impregnado de limón para despistar la atención del animal. En este contexto nuevo se le observa el comportamiento del ratón durante un tiempo total de 5 minutos, los 2 primeros minutos no se le aplica sonido (pre-EC) y en los 3 minutos restantes se le aplica un sonido de 85 dB y 0,2 Hz de intensidad, estímulo condicionado (EC).

Tal como hemos dicho antes, en las diferentes condiciones del ensayo fue registrado en segundos el tiempo que permaneció en estado de inmovilización (*freezing*) cada animal, indicando esto una medida del miedo condicionado.

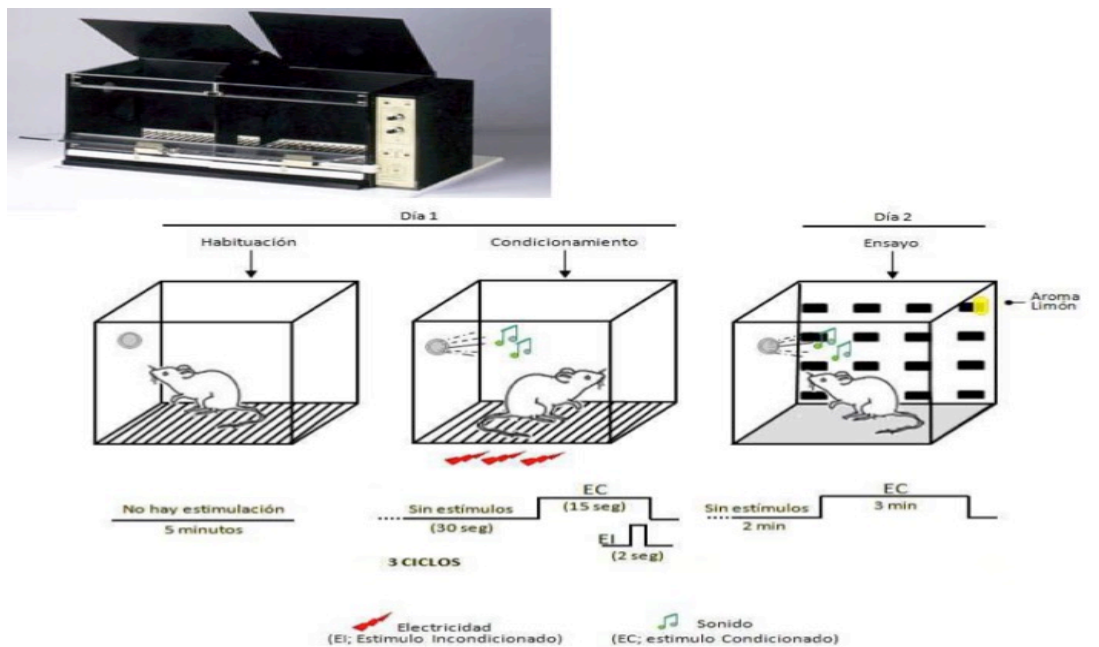


Figura 18. Aparato para el análisis del aprendizaje condicionado “shuttle box”, utilizado en los experimentos y esquema del experimento.

Todos los estudios comportamentales fueron aprobados por el comité Ético y de Investigación del Hospital Regional Carlos Haya y todos los experimentos fueron llevados a cabo en acuerdo con las Leyes Europeas de Investigación Animal (European Communities Council Directives 2010/63/EU, 90/219/EEC, Regulation (EC) No. 1946/2003) y las guía regional y nacional de España para la Experimentación Animal y Uso de Organismo Modificados Genéticamente (Real Decreto 53/2013 and 178/2004, Ley 32/2007 and 9/2003, Decreto 320/2010).

4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL CITOSOL Y MEMBRANAS

Para la extracción de las áreas cerebrales de las diferentes áreas cerebrales (corteza prefrontal, cerebelo e hipocampo) que van a ser utilizadas tanto para la extracción de proteínas como de ácidos nucleicos, a los ratones se le sacrifico mediante la técnica

dislocación cervical. Sin embargo, si el cerebro se va a utilizar en técnicas de inmunohistoquímicas se le sometió a un sacrificio por administración de pentobarbital sódico (un sedante) para proceder a su perfusión con el fijador paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB).

Antes de proceder al sacrificio de los ratones por dislocación cervical, se pesan los ratones y *a posteriori* se procede a la extracción de todos los órganos de interés (bazo, riñones, glándulas suprarrenales, páncreas, hígado, cerebro) y su pesado. Todos los órganos una vez pesado se pusieron en nitrógeno líquido para conseguir una congelación rápida y así evitar que se degrade el RNA y las proteínas.

El cerebro se extrae de ratones que han sido sacrificados mediante la técnica de dislocación cervical, siguiendo en todo momento las indicaciones que hace el Comité de cuidados y usos animal del Hospital Carlos Haya. Todos los estudios fueron aprobados por el comité Ético y de Investigación del Hospital Regional Carlos Haya y todos los experimentos fueron llevados a cabo en acuerdo con las Leyes Europeas de Investigación Animal (European Communities Council Directives 2010/63/EU, 90/219/EEC, Regulation (EC) No. 1946/2003) y las guía regional y nacional de España para la Experimentación Animal y Uso de Organismo Modificados Genéticamente (Real Decreto 53/2013 and 178/2004, Ley 32/2007 and 9/2003, Decreto 320/2010).

Las áreas cerebrales se diseccionaron utilizando bisturí, lupa binocular y hielo seco. Una vez extraídas se mantuvieron a -80°C hasta su uso. La extracción de proteínas comienza con la homogenización del tejido en 1 mL de tampón de extracción (Tris-HCl 0,1M con HEPES al 20 mM) e inhibidores de proteasas y fosfatasa (*Complete, Mini Easy Pack Sample*. ROCHE Basilea, SUIZA; *phenylarsine oxide*, SIGMA ALDRICH Missouri, USA y *Sodium Orthovanadate* SIGMA ALDRICH Missouri, USA).

La homogenización se realiza con el homogenizador *Kimble® Kontes Disposable PELLET PESTLES* (SIGMA ALDRICH Missouri, USA) y el sonicador (VIBRACELL™-ULTRASONIC, SONICS & MATERIALS, Conneticut, USA). Se puso en el tejido 200 μL de tampón de extracción con inhibidores de proteasas y

fosfatasas y se le sometió a la rotura mecánica de sus células con el homogenizador y el sonicador. Una vez que la homogenización se ha producido se añadió tampón de extracción hasta completar 1 mL. A todo esto se le somete a centrifugación de 1000 x g a 4°C durante 10 minutos, el pellet de esta centrifugación se desecha mientras que el sobrenadante lo dividimos en dos, una parte a la que se le va a realizar ultracentrifugación para la obtención de las proteínas de membranas mientras que en la otra parte se encuentra a las proteínas del citosol a las que se medirá su concentración usando el método de Bradford.

Para la obtención de las proteínas de membranas, la parte que previamente se separó, se le somete a ultracentrifugación de 80000 x g durante 40 minutos a 4°C. Del producto de la ultracentrifugación se quedó con el pellet, descartando por tanto al sobrenadante, que fue resuspendido en el mismo tampón de extracción sin inhibidores de proteasas. Toda la extracción se realizó en hielo, para evitar que las proteasas y fosfatasas se activaran y degradaran a las proteínas.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD

La medición de proteínas se va a realizar mediante el método de Bradford (Bradford MM, 1976) en el cual se compara los resultados de una curva patrón con los resultados de absorbancias obtenidos para nuestras proteínas. El protocolo a seguir para realizar el Bradford es el siguiente:

1. Realizar la curva patrón de albumina de la siguiente manera:

Número de tubo Eppendorf (#)	Concentración ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	Solución de Albumina (μL)	H ₂ O (μL)
1	2	50	0
2	1.5	37.5	12.5
3	1	25	25
4	0.5	12.5	37.5
5	0.25	6.25	43.75
6	0	0	50

Tabla 9. Volúmenes necesarios para realizar la curva patrón

2. En una placa de 96 pocillos se ponen 5 μL de muestra o dilución de la muestra, así como 5 μL de cada punto de la curva patrón y 5 μL de tampón de extracción que será el blanco de la prueba.
3. A cada muestra se le añade 250 μL de azul de Coomasie (*Comassie Brilliant Blue G-250*) (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Wilmington, USA) .
4. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Leer la placa a una longitud de onda de 595 nm en el VERSAMAX (VERSAmax, microplate reader, MOLECULAR DEVICES INC., Toronto, CANADÁ)
6. Una vez obtenidos los datos de absorbancia tanto para las muestras como para la curva patrón se procede al tratamiento por EXCELL de los resultados obtenidos.

Tanto de las muestras como de la curva patrón se realizan duplicados. De la media de los resultados de la curva patrón es con la cual se realiza la recta a través de ella se obtendrá la concentración de proteínas a través de una interpolación de las medias de los dos datos de las muestras.

Una vez conocida la concentración de proteínas, se puede calcular el volumen que es necesario cargar en el gel para que las proteína de interés se distinga bien después de hacerle la inmudetección con anticuerpos específicos contra ella.

PREPARAR EL GEL DE ELECTROFORESIS.

En un gel de electroforesis SDS-PAGE se puede distinguir dos fases o dos geles con diferentes funciones: fase/gel de concentración y fase/gel de separación. El gel de concentración sirve para agrupar las muestras en una sola banda aun habiéndose cargado distintos volúmenes en sus pocillos. Mientras que el gel de acrilamida se utiliza para separar las proteínas según su peso molecular. Para la preparación del gel hay que tener en cuenta dos aspectos de importancia:

- *Cantidad de muestras a cargar.* Este dato condicionará el tamaño que va a tener el pocillo de carga, generalmente los utilizados en esta tesis doctoral son de 1 mm ó 1.5 mm ya que son los apropiados para cargar alta cantidad de producto (20 μL).

- *Tamaño de la proteína a separar.* Una vez que se sabe por la bibliografía el tamaño de la proteína a detectar se decide que porcentaje de Acril-Bis acril a utilizar. Si no se supiera el tamaño de la proteína lo más apropiado sería utilizar un gel en gradiente de concentración, el más usual es el de 4-12%.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez conocida el volumen de muestra que se necesita para obtener una concentración determinada, se pone en un tubo al cual se le añade 10 μ L de tampón de carga Laemmli (Agua miliQ 6 mL; Tris/HCl 0.5 M pH 6.8 2 mL; SDS 10 % 3.2 mL; β -mercaptoetanol 0.8 mL; Azul de bromofenol 0.5% 0.8 mL y Glicerol 3.2 mL). En algunos casos las muestras provienen desde un tratamiento previo del homogenado con anticuerpos o proteínas específicas unidas a bolas de sepharosa para que la proteína a resolver inmunoprecipitado y se separe del total de proteínas del homogenado.

INMUNOPRECIPITACIÓN DE RAC 1-GTPase

Los inmunoconjugados PAK1-PBD y bolas de sepharosa fueron desarrollados tal como nos indica del Pozo MA y col., 2000 (del Pozo MA y col., 2000). A 80 μ g de extracto total de cerebro se le añadieron 30 μ L de PAK1-PBD-conjugado con bolas GST sepharosa, dejándose incubar a 4°C durante una hora con agitación constante. Después se lavan 4 veces con Tris-HCl 25mM pH 7.6, este inmunocomplejo se usa para el análisis por *western-blot* con anticuerpos anti-Rac1.

Posteriormente se calientan las muestras, tanto las que vienen de inmunoprecipitados como las que no han tenido ningún tratamiento, con 10 μ L de tampón de carga a 95°C durante 5 minutos en un termobloque con agitación constante de 800 rpm, pasado este tiempo centrifugamos las muestras a 13000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente; este último paso permite eliminar los posibles desechos que se provoca en la desnaturalización de las proteínas por el efecto del calor y la presencia del β -mercaptoetanol. Seguidamente se cargan las muestras en el gel que se encuentra en un tampón de electroforesis (3 g/L Tris; 14,4 g/L Glicina; 1 g/L SDS). Las muestras son separadas en una corriente eléctrica de 80V durante 15 minutos seguida de otra

corriente de 120V durante 60-75 minutos, en todos momentos el amperaje no supera los 400 mA. Las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF usando *Trans-Blot Turbo Blotting System* (BIORAD, Hércules, California, USA).

TRATAMIENTO INMUNOQUÍMICO DE LAS MEMBRANAS

Cuando las proteínas son transferidas a las membranas, hay que darle un tratamiento inmunoquímico para detectar la presencia de la proteína de interés y poder así medir su nivel de expresión.

A las membranas, antes de incubarla con el anticuerpo primario, se le tienen que bloquear los sitios de unión inespecíficos para evitar, de esta manera, que el anticuerpo se una a sitios donde no debería y por consiguiente se impide la aparición de falsos positivos. El bloqueo se realiza con leche desnatada en polvo disuelta en PBS-Tween 20 al 0,5 % (SIGMA- ALDRICH, Missouri, USA) a un porcentaje del 5%. El bloqueo se realiza manteniendo en incubación a las membranas con este tampón de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.

Seguido al bloqueo se pone el anticuerpo primario a la dilución requerida para cada uno de ellos y se incuba durante toda la noche a 4°C en agitación. De esta manera se consigue ralentizar la reacción y evitar, también, las uniones inespecíficas del anticuerpo. La dilución del anticuerpo se realiza en el mismo tampón utilizado para el bloqueo de la membrana.

Pasado el tiempo de incubación y después del lavado de la membrana con PBS-Tween 20 al 0,5 % (3 veces 5 minutos cada vez), se incuba con el anticuerpo secundario específico contra la fracción constante de los anticuerpos primarios, son anticuerpos que están desarrollados en especies distintas a donde se forma el anticuerpo primario y es desarrollado específicamente contra la fracción constante del anticuerpo primario. La dilución de este anticuerpo secundario es por norma general 1:2000, realizándose en el mismo tampón de bloqueo. Los anticuerpos secundarios utilizados en los diferentes *western blot* de esta tesis doctoral están conjugado con peroxidasa de pepino (HRP), que nos servirá para hacer el revelado.

Las membranas son reveladas usando un kit de quimioluminiscencia *Clarity Western ECL Substrate* (BIORAD, Hércules, California, USA) que consta de sustrato para el luminol y otro sustrato de peróxido, que se ponen en una proporción 1:1 sobre la membrana. La detección de las bandas que representan las proteínas estudiadas se realiza por el método de ECL. El resultado de la reacción es observado en el ImageQuant LAS 4000 (GE HEALTHCARE LIFE SCIENCE, Little Chalfont, UK) y analizado la intensidad de cada banda se calculó por densitometría utilizando el programa de acceso libre ImageJ (NIH Image).

5. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Para la medición del estrés oxidativo en los tejidos tenemos que empezar por la homogenización del tejido en el tampón fosfato a pH 8.

Tampón fosfato (PB) pH=8

- 14,19 g PO₄HNa₂
- 15,60 g PO₄H₂Na
- 1,46 g EDTA

Todo ello disuelto en un litro de agua miliQ

Para la homogenización del tejido utilizaremos el *Kimble® Kontes Disposable PELLET PESTLES* (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA), así como tres ciclo de sonicación de tres segundos cada uno y a 30 mHz de amplitud de la onda (VIBRACELL™-ULTRASONIC, SONICS & MATERIALS, Conneticut, USA). De este homogenado se separa unos 80 µL para la medición de la peroxidación de las proteínas (grupos carbonilos) del citosol, así como se tomaran 5 µL para medir la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. Al restante se le somete a una centrifugación de 2300 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos celulares, después de la centrifugación al sobrenadante se le realiza otra centrifugación a 24000 x g a 4°C para obtener un precipitado con las proteínas y lípidos de membranas que se resuspenderá en un tampón que contiene la siguiente composición

0.1 M NaCl, 0.5 mM KCl, 6.2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 4.9 mM Glucosa, 0.55 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃.

Protocolo

1. Homogeneizar en 1 mL buffer fosfato pH 8 mantenido a 4°C, utilizando un homogeneizador *Kimble® Kontes Disposable PELLET PESTLES* (SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA) y tres ciclos de sonicación de tres segundos cada uno y a 30 mHz de amplitud de la onda (VIBRACELL™ ULTRASONIC, SONICS & MATERIALS, Conneticut USA).
2. Separar 5 µL de muestra para medir la cantidad de proteínas totales mediante el uso del método Bradford, 80 µL del homogeneizado total para medir la peroxidación de proteínas y 300 µL para la medición de GSH y GSSG.
3. El resto del homogeneizado se centrifugan a 2300 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar de la muestra los restos celulares.
4. Se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo y se vuelve a centrifugar a 24000 x g durante 30 minutos a 4°C.
5. Al precipitado (membranas) se resuspende en 280 µL de tampón con la siguiente composición: 0.1 M NaCl, 0.5 mM KCl, 6.2 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 4.9 mM Glucosa, 0.55 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃.

DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La formación de componentes carbonilos es actualmente el método más general y ampliamente usado como marcador de la oxidación proteica tanto para muestras *in vitro* como para *in vivo*. Como marcador del daño oxidativo en las proteínas, el contenido de carbonilos se ha visto que se acumula durante la edad, inflamación crónica y algunas enfermedades relacionadas con la edad (Dalle-Done I y col. 2003, Dean RT y col. 1997).

La determinación del nivel de oxidación de proteínas se llevó a cabo analizando el contenido de grupos carbonilos y dieno-conjugados. Para analizar la oxidación de proteínas se sigue el método anteriormente publicado (Levine RL, 2002). A 80 μL de proteínas tanto de citosol como de membrana se le añade la misma cantidad de ácido tricloroacético al 20% mantenido en la nevera a 4°C, esta mezcla se centrifuga a 3300 x g a temperatura ambiente. El precipitado de dicha centrifugación se resuspende en 60 μL de una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2N a 10 mM y se deja incubando durante una hora en oscuridad (cada 15 minutos se le procede a agitación). Pasado ese tiempo se le pone 20 μL de ácido tricloroacético al 20 % e incubarlo durante unos 10 minutos. Seguidamente se centrifuga a 12000 x g durante 3 minutos y se resuspende el pellet en 100 μL de NaOH e incuba durante un tiempo de 15 minutos a 37°C en el baño con agitación. Pasado este tiempo, se centrifuga a 13000 x g durante 5 minutos y se mide a una longitud de onda de 360 nm en el sobrenadante (VERSAmax, microplate reader, MOLECULAR DEVICES INC., Toronto, CANADÁ). Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente

Los resultados obtenidos se corresponden a nmol/mg de proteínas, usando el coeficiente de extinción molar de $22 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La cantidad de proteínas oxidadas se expresa en nmol/mg de proteínas. La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford, tal como se expuso en un apartado anterior.

Protocolo

1. A 80 μL del homogeneizado inicial (citosol) y de la suspensión de membranas se le añaden 80 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en agua bidestilada (agua miliQ) mantenido a 4 °C.
2. Centrifugar a 3300 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.
3. Al pellet obtenido se resuspende en 60 μL de una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina 10mM en HCl 2N, protegida de la luz.

4. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, agitando cada 15 minutos.
5. Añadir 20 μL de TCA al 20% e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante, para quedarnos con el precipitado.
7. Añadir 100 μL de NaOH 1M para resuspender el precipitado.
8. Incuba a 37°C durante 15 minutos.
9. Centrifugar a 13000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Pasar el sobrenadante a una placa de 96 pocillos y medir la absorbancia a una longitud de onda de 360 nm en el VERSAmax (VERSAmax, microplate reader, MOLECULAR DEVICES INC., Toronto, CANADÁ).

Los resultados obtenidos se corresponden a nmol/mg de grupos carbonilos en las proteínas oxidadas, usando el coeficiente de extinción molar de 22 mol⁻¹ cm⁻¹.

$$A = \hat{I} \times C \times b$$

A: Absorbancia

C: Concentración de proteínas (nm/mg)

b: centímetros de espesor de la cubeta

DETERMINACIÓN DE LA OXIDACION DE LIPIDOS DE MEMBRANA

La medida del malondialdehído (MDA), el producto derivado de la peroxidación de lípidos más abundante, ha sido extensamente usada como una medida de la oxidación de los lípidos y por tanto un acercamiento del nivel de estrés oxidativo que sufre el tejido. En esta tesis doctoral se ha medido la producción de MDA mediante la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, siguiendo el protocolo propuesto por Esterbauer & Cheeseman en 1990 (Esterbauer H & Cheeseman KH, 1990).

Paso a describir brevemente el protocolo. Primeramente se realiza una curva patrón con diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de 250 μM de MDA. Se toman 200 μL de cada punto de la curva estándar, así como 200 μL de las muestra de membrana y se le añade 200 μL de una solución de 0.5% de ácido tío barbitúrico (4,6-dihidroxipirimidina-2-SH) en ácido tricloroacético al 20%. Se mezcla bien y se deja incubando a 98°C en durante 10 minutos en un termobloque (SELECTA, Barcelona, ESPAÑA). La cantidad de TBARS producida fue medida por la absorbancia del sobrenadante de esta reacción a 532 nm (VERSAmax, microplate reader, MOLECULAR DEVICES INC., Toronto, CANADÁ). La medida de TBARS fue calcula en función de la absorbancia obtenida y la curva estándar. Como blanco de reacción se utilizó el mismo tampón en el que estaban disueltas las muestras. Los resultados son expresados en nmol MDA/mg proteínas (obtenido por el método de Bradford).

Protocolo

1. A 200 μL de muestra (membranas) y a 200 μL de cada punto de la curva patrón y al blanco se le añade 200 μL de una solución, preparada en el momento, de 0.5% de ácido tío barbitúrico (4,6-dihidroxipirimidina-2-SH) en ácido tricloroacético al 20% (mantenido a 4°C).
2. Mezclar vigorosamente 2 segundos con el vórtex.
3. La mezcla se incuba a 98 °C durante 10 minutos en el termobloque.
4. Se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Se mide la reacción colorimétrica del sobrenadante a 532 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro (VERSAmax, microplate reader, MOLECULAR DEVICES INC., Toronto, CANADÁ).

Los resultados obtenidos se extrapolan en la curva patrón y se corresponde a equivalentes de malondialdehido (MDA).

Curva estándar de malondialdehído (MDA)

Número de tubo	Concentración MDA (μM)	Composición del tubo
1	250 μM	250 μL de 1 mM MDA + 750 μL de H_2O
2	125 μM	500 μL del tubo 1 + 500 μL de H_2O
3	62.5 μM	500 μL del tubo 2 + 500 μL de H_2O
4	31.25 μM	500 μL del tubo 3 + 500 μL de H_2O
5	15.63 μM	500 μL del tubo 4 + 500 μL de H_2O
6	7.81 μM	500 μL del tubo 5 + 500 μL de H_2O
7	3.91 μM	500 μL del tubo 6 + 500 μL de H_2O
8	1.95 μM	500 μL del tubo 7 + 500 μL de H_2O
9	0.98 μM	500 μL del tubo 8 + 500 μL de H_2O
10	0 μM	200 μL de H_2O

Tabla 10. Volúmenes necesarios para realizar la curva estándar de MDA.

MEDIDA DE LAS ESPECIES REACTIVAS.

EXTRACCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATONES.

Los ratones se sacrificaron mediante decapitación y desangrado posterior. Posteriormente, se les inyecta en la parte peritoneal, 10 mL de NaCl 0.9%. Se hace un masaje peritoneal durante 5 minutos, y se realiza una incisión a nivel ventral. Con una pipeta se absorbe el líquido peritoneal enriquecido de macrófagos. Las células se recogen después de una centrifugación a 4 °C a 6000 rpm durante 5 minutos. Luego, el precipitado celular se resuspende en KR-HEPES.

MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Las células (10^6 células /mL), resuspendidas en el tampón de incubación KR-HEPES, se incuban con el agente a 37°C durante el tiempo requerido. Luego se añade 15 mM

luminol/ 2 mg/mL peroxidasa, en la oscuridad. La reacción se dispara con el estímulo (PMA) en la oscuridad y la luminiscencia se mide a 37°C.

Para medir los ROS totales (extra y intracelular) no se lavan las células. La reacción se pone en marcha con el estímulo y se registra la fluorescencia a:

Longitud de onda ext= 502 nm. Vent ext = 5

Longitud de onda em= 523 nm. Vent em= 10

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRATOS.

La medición de la concentración de nitratos en diferentes áreas cerebrales se llevó a cabo mediante el uso de un kit de medida comercial (ABCAM, Cambridge, UK). El kit comercial es de medida colorimétrica de óxido nítrico, la medida de nitrato/ nitrito se hace en un proceso que se divide en dos etapas. Brevemente paso a describir las dos etapas de las que consta: la primera de ella convierte el nitrato a nitrito utilizando nitrato reductasa y la segunda de ella utilizando el reactivo de Griess para convertir el nitrato a un producto azo purpura. La cantidad de producto azocromóforo refleja la cantidad de óxido nítrico en la muestra.

En esta tesis doctoral medimos en este caso la fracción citosólica (extraída tal como hemos hecho referencia anteriormente) de ratones Fmr1-KO y WT-control de dos edades diferentes edades (3 y 6 meses), de cada ratón se extrajo muestras de tres regiones cerebrales importantes en el estudio del SXF (cerebelo, corteza prefrontal e hipocampo).

6. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL mRNA

Antes de llevar a cabo esta parte metodológica de la tesis es muy importante tener en cuenta que ha de evitarse la contaminación con enzimas que degraden el RNA (RNAsas), por lo que en todo momento, las soluciones y materiales utilizados fueron tratados con inhibidores de estas enzimas así como que a estos mismos se le sometió a

esterilización previa. Hay que prestar gran atención en la manipulación y limpieza del área de trabajo.

La extracción del RNA se llevo a cabo mediante el uso de un kit comercial de QIAGEN (RNeasy®Lipid Tissue Mini Kit). Este kit puede extraer y purificar RNA desde diferentes tejidos, con un peso máximo de 100 mg por tejido. Para la extracción desde tejido cerebral la capacidad de unión del RNA a la columna RNeasy Mini spin y la capacidad de extracción del agente de lisis QIAzol es buena siempre y cuando no se exceda de esta cantidad, además de esta manera se asegura una buena pureza de RNA.

El primer paso de la extracción de RNA es pesar que cantidad de tejido (hipocampo, cerebelo o corteza prefrontal) tenemos, para cerciorarse que no se supera el limite de 100 mg. Una vez pesado el tejido se pone en tubo de Eppendorf de 2 mL en el cual se realizará la homogenización del tejido con QIAzol. Para la extracción se puso 1000 μ L de QIAzol y se utilizó como elemento homogenizador Ultra-Turrax (IKA Werke GMBH, Staufen, ALEMANIA). La homogenización se realizó a 4°C y siempre con la máxima precaución de que no producir ninguna contaminación.

El homogenado se deja durante 5 minutos incubando a temperatura ambiente (15-25°C). Con este paso conseguimos que las nucleoproteínas se disocien. Seguidamente a los 5 minutos se ponen 200 μ L de cloroformo y se mezclan vigorosamente. El resultante se incuba 3 minutos a temperatura ambiente (15-25°C) y se centrifuga durante 15 minutos a 12000 x g a 4°C.

Después de la centrifugación, se observa que la muestra se separa en tres fases: una inferior (fenol-cloroformo) que posee las proteínas, una interfase blanquecina que contiene el DNA y una fase superior acuosa incolora donde tenemos al RNA.

Se coge la fase acuosa superior y se transfiere a un nuevo tubo, se le añade el mismo volumen de etanol al 70 % (entorno a unos 600 μ L) y se mezcla utilizando el vórtex. Transferimos 700 μ L de esta mezcla a la columna RNeasy Mini spin y centrifugamos a 8000 x g durante 15 a temperatura ambiente (15-25°C), eliminamos el desecho.

Repetimos el mismo proceso con el volumen restante de la mezcla, así se consigue que todo el RNA quedará unido a la columna.

Se lava la columna con un reactivo propio de QIAGEN, el buffer RW1, se centrifuga a 8000 x g a 4°C durante 15 segundos. En este paso se procede a la purificación del producto del RNA, manteniendo solamente a las moléculas que son mayores de 200 nucleótidos y excluyendo selectivamente al RNA ribosómico (5,8 S y 5 S) y el RNA transferente (tRNA), lo que llega a significar un total del 15-20% del RNA total. Además se degrada la mayor parte del DNA contaminante ya que se incluye un tratamiento de la columna con DNasa I. Para este proceso de purificación se utilizó un kit de purificación de las columnas (RNase-free DNase Set, QIAGEN, Hilden, ALEMANIA) que consta de un buffer RDD y de DNasa que se ponen en las proporciones que nos dice el fabricante (10 µL de DNasa/muestra y 70 µL de buffer RDD/muestra) y se deja durante 15 minutos incubando a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo se añade buffer RW1 y se lava la columna a 8000 x g a 4°C durante 15 segundos.

La membrana se lava 2 veces con buffer RPE, la primera centrifugación será de 15 segundos mientras la segunda será de 2 minutos. Consiguiéndose en esta última que se retire el etanol de la membrana, para evitar que pudiera ser eluido junto al RNA en el paso siguiente. Las centrifugaciones son a 8000 x g y a 4°C. En este paso se eliminan sales y proteínas que pudieran estar pegadas al RNA.

En este momento, la columna se traspasa a otro tubo estéril. Se le pone 30 µL de H₂O libre de endonucleasas en el medio de la columna y se eluye el RNA mediante centrifugación a 8000 x g durante 1 minuto a 4°C.

CUANTIFICACIÓN Y MEDICIÓN DE LA PUREZA DEL RNA EXTRAIDO

Cuando se ha aislado y se ha purificado el RNA se procede a la cuantificación de la cantidad de producto obtenido, así como de su pureza.

La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría con el NanoDrop2000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Wilmington, USA) donde la concentración de RNA se obtiene por la absorbancia de esta molécula a 260 nm de longitud de onda y la pureza de la extracción mediante el valor de 260/280 (ratio que tiene que estar entre 1,8 y 2 para que se considere una pureza óptima).

Para la comprobación de la integridad del RNA extraído, se corren las muestras en un gel de agarosa al 1% en TBE. Se cargaría 0,5 µg de RNA en 2 µL de tampón de carga. El resultado esperable serían dos bandas nítidas que se corresponderían con las subunidades del RNA ribosómico 18 S y 28 S con una proporcionalidad de 1:2.

PRODUCCIÓN DEL cDNA A PARTIR DEL RNA EXTRAÍDO

El DNA complementario (cDNA) es un DNA de doble cadena importante en las técnicas de biología molecular obtenido a partir de RNA monocatenario (mRNA obtenido a partir de diferentes partes del cerebro en el caso de esta tesis doctoral), se produce gracias a la existencia de unas enzimas retro-transcriptasa que tienen la capacidad de utilizar como molde el RNA para obtener al cDNA. Es un paso previo esencial y necesario para la posterior realización de la PCR a tiempo real, ya que esta última se realiza utilizando como sustrato de la reacción a DNA en lugar de RNA debido a la especificidad de las enzimas DNA polimerasas utilizadas en estas técnicas.

Para la realización de la retrotranscripción vamos a utilizar el kit comercial *High-Capacity cDNA Archive Kit* (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt, ALEMANIA). La cantidad de RNA a utilizar como molde es 2,5 µg en 30 µL (sabiendo ya la concentración que tenemos de RNA es fácil de calcular esta cantidad), es decir se pone el volumen necesario de extracto de RNA para tener la cantidad de RNA estipulada (2,5 µg) y se completa hasta 30 µL con H₂O libre de RNasa. El volumen final de reacción va a ser 60 µL.

Se prepara un mix (2X RT master mix) que va a llevar los siguientes compuestos:

REACTIVO	VOLUMEN PARA UNA REACCIÓN (µL)
10 X RT Buffer	6
25 X dNTP Mix (100 mM)	2,4
10 X RT <i>ramdon primers</i>	6
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	3
Nuclease-free H ₂ O	12,6

Tabla 11. Volúmenes necesarios para la retrotranscripción

Una vez que está la master mix se pone los 30 µL de RNA a 2,5 µg, después se mezcla muy bien y se le da un spin. El termoclicador (*GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler*, APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt, ALEMANIA) se programa con los cuatro pasos a los que nos referiremos *a posteriori* y se pone en marcha la reacción. El programa de la reacción va a ser el siguiente:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4 °C
Tiempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	Hold

Tabla 12. Programa de para que se realice la retrotranscripción

En el primer paso de la reacción se consigue que los *primers* se unan al RNA, en la segunda etapa se produce la síntesis del cDNA. El tercer paso de la reacción nos sirve para la inactivación de la transcriptasa reversa y eliminar al RNA y posibles cadenas de RNA-DNA que se hayan podido producir.

El cDNA producido se puede guardar tanto a 4°C si se va a usar en un corto periodo de tiempo, como -20°C si se va a usar después de 2 semanas de la producción.

MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DETERMINADOS GENES

Para medir la expresión de un determinado gen en un momento dado o en unas condiciones específicas podemos utilizar varias técnicas de biología molecular y

proteómica. Las técnicas de biología molecular se deben principalmente a la medición de los niveles de mRNA (y su consecuente cDNA) que hay, gracias al uso de la PCR a tiempo real (Real time-PCR) o PCR cuantitativa (Q-PCR).

Desde que se descubriera la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por parte de Kary Mullis (Mullis K y col., 1986) en la década de los 80, esta técnica ha avanzado a pasos agigantados de tal manera que actualmente es de las que más se usa en los laboratorios de hoy en día. Tenemos la posibilidad de seguir y ver como se está realizando la PCR, así como de saber que nucleótido se está introduciendo en cada momento gracias todo ello a la existencia de equipamiento capaz de producir la reacción de PCR, así como de ver, discriminar y cuantificar a fluoróforos que se unen al DNA.

Actualmente en el mercado hay diversos sistemas que se utilizan para observar la expresión u observar la producción de producto de PCR en el mismo momento que se está produciendo este, los dos más utilizados se basan en distintos principios pero que llevan a lo mismo.

El primero de ellos, su química se basa en el uso de intercalante de DNA de doble cadena, el intercalante se denomina *SYBER Green I Dye* (Higuchi y col., 1993), cuya fluorescencia aumenta según aumenta el número de moléculas de DNA como consecuencia de la PCR. La desventaja del uso de este mecanismo es que este tipo de marcador detecta tanto a específicos como a inespecíficos productos de PCR. Este método se utilizó para la obtención de los primeros resultados de la tesis, aquellos donde se mide la expresión de Rac1-GTPasa en diferentes áreas cerebrales y en el cerebro completo.

Para las PCRs a tiempo real cuantitativa con *SYBER Green* se utilizó el termociclador con módulo óptico Opticon 2 (MJ Research) y como sistema de marcado fluorescente el Quantitec SYBR Green I PCR kit (QIAGEN, Hilden, ALEMANIA).

Para comprobar que la amplificación está siendo específica, esto es, que se está amplificando el fragmento elegido, se realizan dos pruebas complementarias. Por un lado, se realiza un análisis de las curvas de fusión (*melting curve*) y, por otro, se

separan los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. El análisis de las curvas de fusión aprovecha que cada producto de PCR tiene una temperatura específica de fusión y la capacidad del *SYBR Green I* de unirse a las dobles cadenas para detectar la presencia de diferentes productos de PCR. Así, tras los ciclos de PCR, se ejecuta un programa de incremento de temperatura y monitorización de la fluorescencia. Este incremento de la temperatura se hace en intervalos de 0.5 °C (desde 56 °C a 95 °C) tras los cuales se monitoriza la fluorescencia emitida de modo que, cuando se alcanza la temperatura de fusión de un determinado producto de PCR, se produce una brusca disminución de ésta, que aparece, tras un procesamiento matemático, como un pico (figura 14). Por otro lado, los productos de PCR se separan en un gel de agarosa comprobándose que aparece una única banda y, con la ayuda de un patrón de pesos moleculares, se comprueba que el tamaño corresponde al teórico del fragmento.

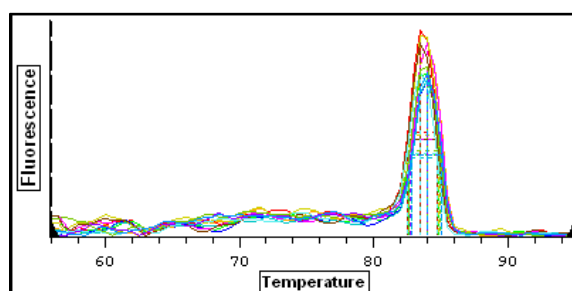


Figura 19. Curva de fusión que indica la ausencia de dímeros de primers y la amplificación de un solo producto de PCR

Para hacer la cuantificación se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de modo que las concentraciones de las muestras debían encontrarse entre las de los estándares (figura 15). Cuanto más próximo este el valor de la pendiente a -3.323 , mayor será la eficiencia de la reacción: $E = (10(-1/n)) * 100$. (E: Índice de Eficiencia; n: pendiente de la curva).

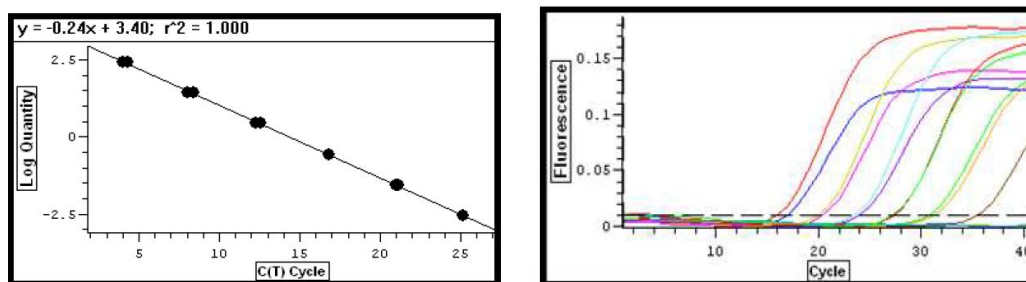


Figura 20. Recta patrón obtenida a partir de las diluciones seriadas de los estándares

Para determinar los niveles relativos de mRNA de cada uno de los genes estudiados, estos se compararon con β -actina, gen de expresión constitutiva (*housekeeping gene*), utilizado como referencia estándar en los estudios de Rac1-GTPasa. Para cada gen se utilizó una pareja de cebadores o primers (oligonucleótidos sintéticos de unos 20 nucleótidos de longitud) complementarios a los extremos de la región que se quería amplificar. Los cebadores para las PCRs fueron diseñados a partir de las secuencias de los genes de ratón localizados en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Símbolo	Nombre	Oligo forward 5' --- 3'	Oligo reverse 5' --- 3'	Número de acceso GenBank	Temperatura de alineamiento
β-actina	Actin-beta	tacagcttcaccac cacagc	aggaaggctgaaaag agc	aNM_008381	44.7 °C
rac1-GTPasa	RAS-related C3 botulinum substrate1	tcctagtgtgggtg tgctg	atggccattgtcacct ac	NM_009007	57.0 °C

Tabla 13. Secuencia de los primers utilizados para las PCRs. (pares de bases, pb)

El segundo método se centra en la introducción de una sonda que se une específicamente a una determinada secuencia de un gen, estas sondas suelen estar marcadas en su extremo 5'. La habilidad fluorogénica de estas sondas es capaz de desarrollar un método efectivo de detectar la presencia a tiempo real de productos de amplificados específicos.

La PCR a tiempo real para medir la expresión de las diferentes isoformas de NOS en diferentes áreas cerebrales se basó en el uso de sondas fluorogénicas desarrolladas por *Applied Biosystems* (sondas *TaqMan*®) (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt, ALEMANIA) capaz de detectar a productos específicos de PCR que se acumulan a lo largo de una reacción de PCR. Estas sondas tienen la característica de poseer en su extremo 5' un fluoróforo “*reporter dye*” y en su extremo 3' un “*quencher*”, mientras la sonda esté intacta la proximidad de los dos reduce la fluorescencia emitida por el

fluoróforo. Si la secuencia diana está presente la sonda se une a ella, además gracias a la actividad 5' nucleasa de la enzima polimerasa *Applied Biosystems hot-start DNA 8* (APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT, ALEMANIA) se libera al fluoróforo. Al separarse el fluoróforo del *quencher* se ve incrementada la intensidad de la fluorescencia del mismo. También se produce la eliminación de la sonda permite que se siga produciendo la extensión del primer, por lo que no se inhibe por tanto el proceso de PCR.

Adicionalmente se van liberando fluoróforos desde las sondas en cada ciclo transcurrido, dando como resultado el incremento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto amplificado. Cuanto más molde haya en el principio más rápidamente se incrementará la fluorescencia. De esta manera en los casos donde un gen se expresa mucho se ve que hay mayor cantidad de mRNA por lo tanto, mayor cantidad de cDNA se produce por retrotranscripción por lo cual la cantidad de molde es mayor. Los genes de mayor expresión por lo tanto son los primeros en mostrar fluorescencia, es decir en ciclos tempranos, y los de menor expresión son los que muestra fluorescencia en ciclos más altos. Con estos datos podremos obtener tanto la cantidad total de moléculas teníamos al principio de la reacción (a partir de una curva estándar) como obtener una cantidad relativa de moléculas respecto a un gen de expresión constitutiva (*housekeeping gene*).

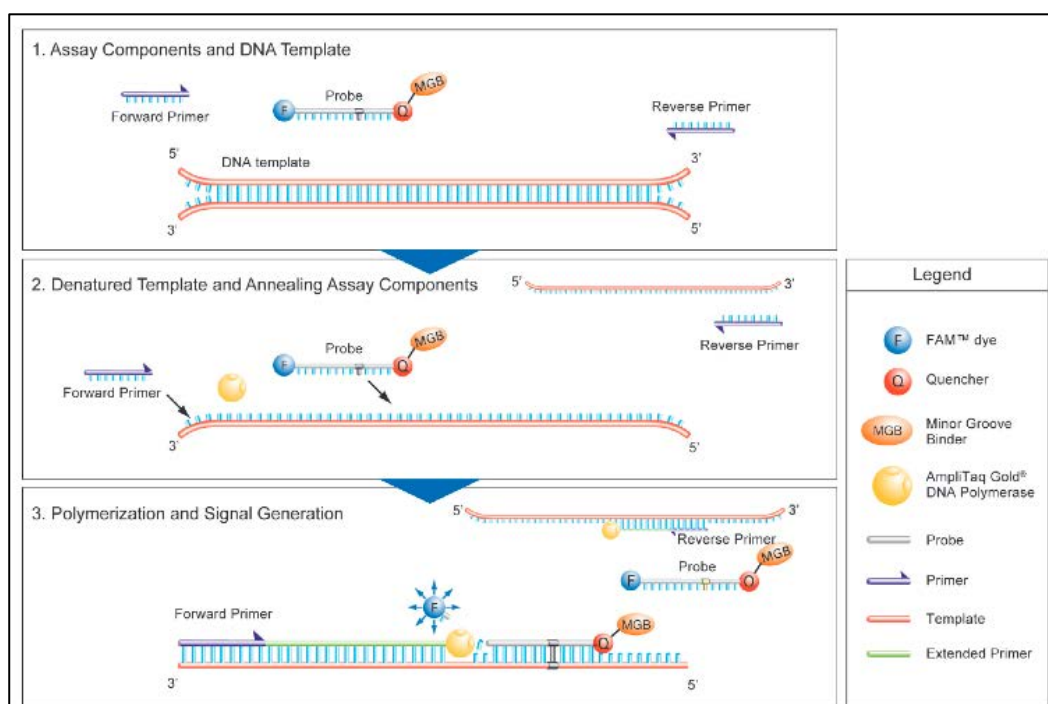


Figura 21. Representación de cómo funcionan las sondas TaqMan.

Para hacer la cuantificación se debe realizar una curva estándar con diluciones seriadas de una cantidad conocida de cDNA, de modo que las concentraciones de las muestras deberán encontrarse entre las de los estándares.

Mientras para saber la diferencia de expresión de un gen vamos a ver la diferencia relativa que se establece entre el gen de interés y un gen de referencia que en nuestro caso fue la GADPH (gen de expresión constitutiva utilizado como referencia estándar en los estudios de las subunidades de NOS).

Para la realización de la PCR a tiempo real primeramente tenemos que hacer una mix donde, se añadirá tanto una master mix con todos los elementos para llevar a cabo la PCR, enzimas, buffer y nucleótidos, TaqMan® Universal Master Mix II 2 X (10 µL) como las sondas con los *primers* para cada gen que serán suministrada en un mismo tubo TaqMan® Gene Expression Assays 20 X (1 µL). Después de hacer el mix se pone en la placa de 96 pocillos específica para este tipo de PCR (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates) y seguidamente se pone 9 µL de una solución de cDNA molde y agua libre de RNase con una cantidad de 2 ng de cDNA. Por lo que la reacción tendrá un volumen total de 20 µL.

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
TaqMan® Universal Master Mix II 2 X	10
TaqMan® Gene Expression Assays 20 X	1
cDNA template (2 ng)+ RNase-free water	9
Volumen total	20

Tabla 14. Volúmenes necesarios para la PCR con sondas TaqMan

A la placa se le pone un adhesivo transparente específico, evitándose que se formen burbujas. Se le da un spin (1000 rpm 1 minuto) para que se eliminen las burbujas del pocillo que puedan interferir en la reacción y todo el producto quede en el fondo del pocillo. Cargamos la placa en la maquina de PCR a tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT, ALEMANIA) y elegimos el programa estándar de 2 horas para sondas TaqMan®.

Los *primers* y *probes* que fueron usadas en esta tesis doctoral están disponible comercialmente por TaqMan Gene Expression Assays (APPLIED BIOSYSTEMS, WEITERSTADT, ALEMANIA) y se corresponde a: Mm 00607939_s1, Mm00435217_m1, Mm00440502_m1 and Mm00435175_m1.)

Los cambios relativos en la expresión de los distintos genes se determinaron usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando como gen constitutivo el gen de la GADPH.

7. FIJACIÓN, PREPARACIÓN E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS SECCIONES CEREBRALES

Los animales fueron plenamente anestesiados con 10 μ L/g de 5 % hidrato cloral (PROLABO, Fontenay-St.-Bois, FRANCIA) en suero a 0,9% de NaCl. Una vez anestesiado los animales se perfundieron intracardialmente con 0,9 % de NaCl para limpiar a la sangre de los animales, después se paso el fijador por los tejidos para fijarlos (Perfusion Peristaltic Pump Miniplus 3 M312, GILSON VILLIERS-LE-BEL, FRANCIA). Se fijaron los tejidos con fijador Simoyi con glutaraldehido (solución acuosa de 15 % de ácido pírco y 4% de paraformaldehido en PBS 0,1 M). Los cerebros se diseccionaron y se incuban durante 3 horas en el mismo fijador utilizado anteriormente, entonces se elimina el fijador y se pone buffer fosfato (PB) al 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas para limpiar al tejido. Los cerebros se criopreservan hasta que se proceda a cortar y su posterior tratamiento inmunológico. La criopreservación se realiza poniendo a los cerebros en una solución de 30 % sacarosa en PB 0,1 M pH 7,4 durante 24 horas.

Las secciones de giro dentado de 40 μ m de espesor de secciones coronales fueron obtenidos con el micrótopo de congelación (LEICA FRIGOMOBIL JUNG SM 2000, NUSSLOCH, GERMANY), las secciones se mantuvieron en una solución de 0,05 % de azida sódica (p/v) en PBS a 4°C hasta que se haga la inmunodetección de las proteínas.

La técnica inmunohistoquímica utilizada en este caso fue el marcaje con diaminobencidina peroxidasa (DAB) de secciones coronales seriadas. Brevemente, a

las secciones cerebrales se le desactivo la peroxidasa endógena, para posteriormente incubarla con el anticuerpo primario durante 48 horas a 4°C en agitación suave constante, el anticuerpo primario (Anti-Rac 1 IgG; 1:5000 C-14, SC-217. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC., CA, USA) está diluido en una solución de 2 % Tritón X-100 y 5 % suero de cabra en PBS 0,1M pH 7,4.

Se recupera el anticuerpo primario (para posteriores usos), mientras que al tejido se le da tres lavados con PBS 0,1 M pH 7,4 de 10 minutos cada uno y se incuba con el anticuerpo secundario apropiado a una dilución 1:1000 durante 90 minutos a una agitación constante suave a temperatura ambiente. Seguido a esto se elimina el anticuerpo secundario y se lava otra vez el tejido con PBS 0,1 M pH 7,4 y se incuba durante 90 minutos con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Kit Elite ABC; VECTOR LABORATORIES, California, USA) a una dilución 1:200. En este momento las secciones cerebrales son lavadas tres veces con PBS 0,1M pH 7,4 y dos veces con Tris-HCl 0.2M pH 7.6, e incubada en 0.02% DAB (#075k3729, SIGMA ALDRICH, St. Louis, USA) con 0.003% H₂O₂ en PBS 0.1M pH 7,4 hasta que se consigue la intensidad de señal que se quiere. La reacción es parada con Tris-HCl 0.2M pH 7.6 y las secciones son montadas en portas poli-lisinados usando medio de montaje Entellan®.

8. ANÁLISIS DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS POR EL MARCAJE DE GOLGI

El método utilizado para el análisis de las espinas dendríticas es el marcaje de Golgi. Brevemente paso a describirlo, a los ratones anestesiado con una sobredosis de pentobarbital sódico se le realiza una perfusión transcárdica utilizando como fijador a paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4 (Perfusion Peristaltic Pump Miniplus 3 M312, GILSON Villiers-Le-Bel, FRANCIA). Después de esto se cortan los cerebros en secciones menores de 1 cm de grosor y se post-fijan durante 3 días en paraformaldehído al 10% en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4. Pasado este tiempo, los bloques de tejidos fueron puestos en una solución de bicromato de potasio al 3 % durante 5 días en oscuridad (Woolley CS & McEwen BS, 1994). La medida es

al menos a 50 μm desde el soma de las neuronas. Se eligieron 5 segmentos de 10 μm de longitud y en el mismo plano de visión. Para el conteo necesitamos el juego constante con el micrómetro del microscopio epifluorescente (OLYMPUS BX41, Tokyo, JAPÓN) para obtener un fino ajuste de la imagen, las imágenes se obtienen a 100 X con su consecuente aceite de inmersión requerido. Sólo se contó a aquellas espinas dendríticas que se diferenciaban de la rama principal.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados usando el programa informático SPSS 15, estimando la media de los valores, la desviación estándar, el error estándar de la media, así como las diferencias estadísticas entre los grupos de ratones normales *WT* y *Fmr1-KO*; controles y tratados, a través de los instrumentos estadísticos para muestras no relacionadas: t de Student (para analizar dos grupos no relacionados) y el análisis de la varianza ANOVA (genotipo, tratamiento y análisis de varianza de medidas repetidas) seguido por la corrección con el post test de Bonferroni. Se establece como diferencia significativa cuando * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

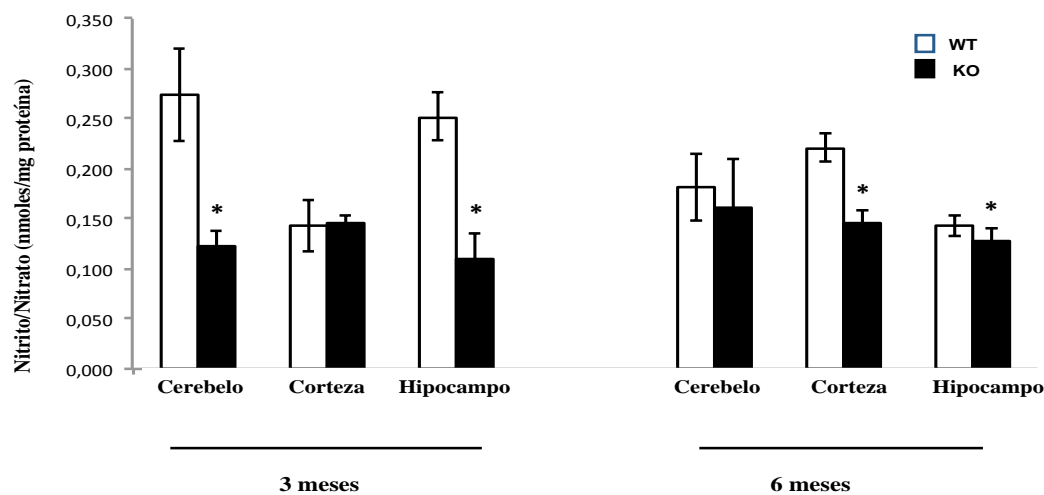
RESULTADOS



ESTRÉS OXIDATIVO Y METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO

1. LOS NIVELES BASALES DE NITRITOS/NITRATOS ESTAN REDUCIDOS EN RATONES FMR1-KO.

La figura 22 muestra el análisis de la concentración de nitritos/nitratos, que es una medida indirecta del óxido nítrico (NO), analizado mediante el uso del kit comercial (ABCAM, Cambridge, UK) que utiliza la colorimetría resultante de la reacción del óxido nítrico con el reactivo de *Griess*. La concentración se mide en diferentes áreas cerebrales, tales como hipocampo, corteza prefrontal y cerebelo. Un total de 6 ratones de cada grupo y genotipo, en función de su edad (3 y 6 meses). Los resultados muestran que la producción de nitritos/nitratos en cada área cerebral estudiada e independientemente de la edad, es más baja en los ratones *Fmr1*-KO en comparación con WT-control. La producción de NO es significativamente baja en el cerebelo e hipocampo de los ratones *Fmr1*-KO de 3 meses en comparación con los ratones WT-control, en esta edad no se detecta diferencias en la corteza. Mientras, la producción de NO se reduce significativamente en corteza e hipocampo de ratones *Fmr1*-KO de 6 meses de edad comparado con ratones WT-control, sin embargo en cerebelo no hay diferencias significativas. Las mayores diferencias significativas se muestran en los ratones de 3 meses de edad.



* $P < 0,05$ T test no pareado WT vs. *Fmr1*-KO

Figura 22. Comparación de la concentración nitritos/nitratos en la fracción citosólica de diferentes áreas cerebrales (cerebelo, corteza e hipocampo) de ratones nulos para la proteína FMRP (*Fmr1*-KO)(n=6) y ratones wild-type (WT) (n=6) de diferentes edades (3 y 6 meses). Los datos están descritos como media de los valores \pm desviación estándar (* $P < 0,05$ T-test *Fmr1*-KO versus WT)

2. LA 3-NITROTIROSINA ESTÁ ELEVADA EN LAS PROTEÍNAS DEL CEREBRO

El NO es una señal molecular muy importante para la señalización en procesos fisiológicos normales dentro del sistema nervioso. El radical superóxido y NO son moléculas que se unen de manera espontánea para formar peroxinitrito (ONOO⁻). El peroxinitrito y los derivados intermedios de peroxinitritos de manera libre pueden unirse a la cadena lateral de los residuos de tirosinas de las proteínas para formar 3-nitrotirosina, un derivado nitrificado de la tirosina. La detección por *western-blot* de las proteínas que tienen en su estructura a 3-nitrotirosina se ha usado como marcador de proceso de daño oxidativo y sobreproducción de NO.

En la figura 23 se muestra el patrón de proteínas nitradas observadas en *western-blot* con anticuerpos específicos contra 3-nitrotirosina en diferentes áreas cerebrales (corteza prefrontal, cerebelo e hipocampo). La inmunoreactividad de las diferentes bandas indican que hay un incremento estadísticamente significativo de la nitroxilación endógena del aminoácido tirosina en las proteínas de todas las áreas cerebrales de Fmr1-KO cuando son comparada con las áreas cerebrales mencionadas de ratones WT-control en dos etapas adultas diferentes (3 y 6 meses de edad) (*P<0.05 Fmr1-KO vs WT-control)

c

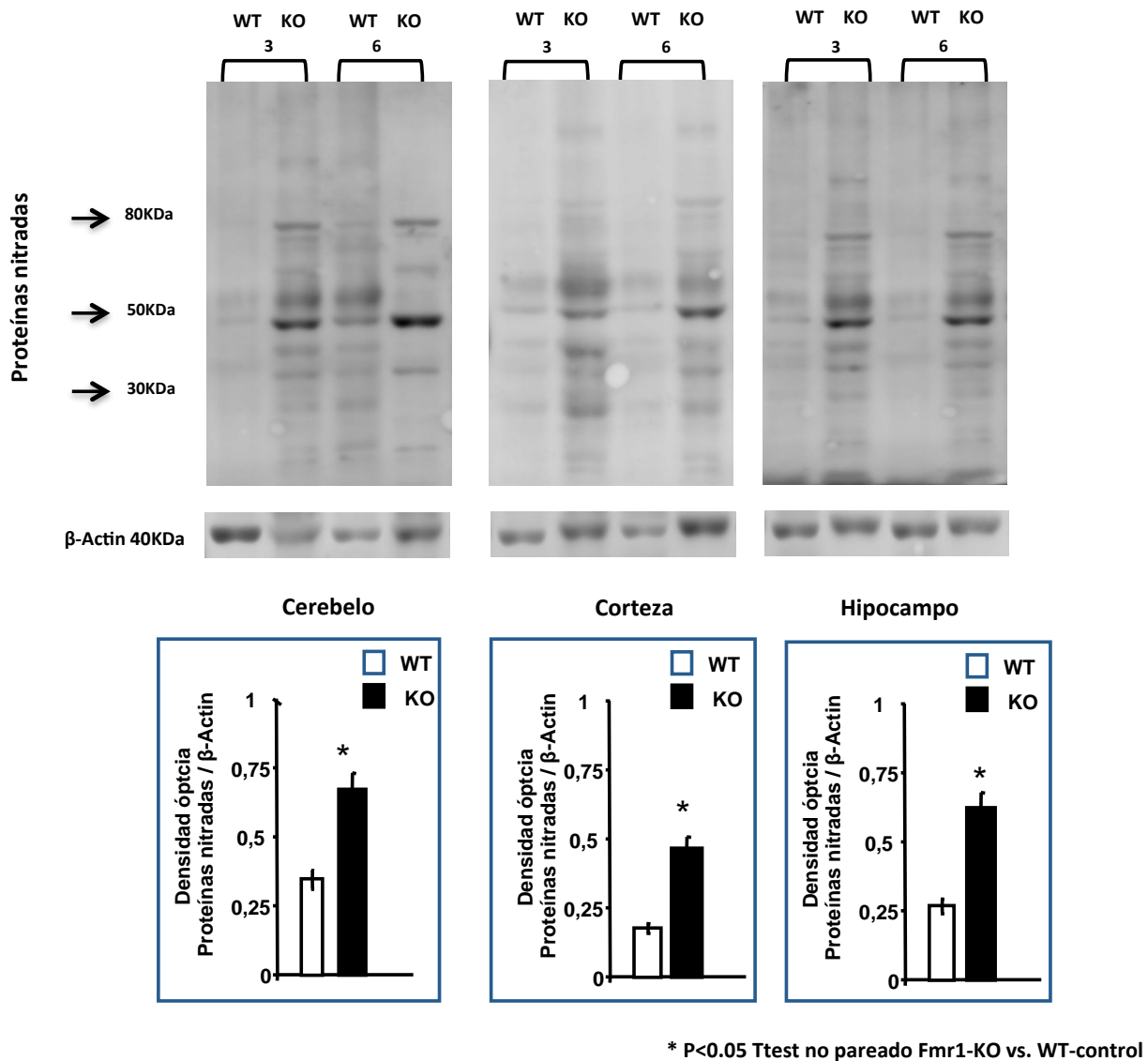


Figura 23. Análisis por western-blot de las proteínas nitrosiladas de la fracción citosólica de deferentes áreas cerebrales (corteza prefrontal, cerebelo e hipocampo) de ratones Fmr1-KO y wild-type (WT)-control. El peso molecular (KDa) se indica en la izquierda. Las fotografías son las representativas de seis experimentos independientes; los datos de la densidad óptica están normalizados con los resultados obtenido de la β-actina y se representan como la media de los resultados ± error estándar de seis experimentos independientes (T-test no pareado *P<0.05 Fmr1-KO versus WT-control).

3. LOS NIVELES DE LAS PROTEÍNAS nNOS E iNOS SON DIVERGENTES EN EL CEREBRO

Para investigar el papel de la molécula NO en la fisiopatología del SXF se analizó la expresión en áreas cerebrales, las diferentes isoformas de NOS (nNOS-NOS1, iNOS-NOS2 y eNOS-NOS3). Estas tres isoformas de NOS se estudiaron mediante técnicas de inmunomarcaje (para medir la expresión a nivel de proteína) y PCR a tiempo real (para medir la expresión a nivel de mensajero de RNA).

En la figura 24 se analiza los niveles de las diferentes isoformas en distintas áreas cerebrales en animales de diferentes edades (3 y 6 meses) y diferente genotipo Fmr1-KO y WT-control. En la fig 24 A se muestra que el contenido de nNOS decrece de manera estadísticamente significativa (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control) en las tres áreas cerebrales de ratones, siendo el decrecimiento más evidente en la corteza prefrontal.

Mientras en la figura 24 B la isoforma iNOS es significativamente alta (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control) su expresión en las tres regiones de estudio de los ratones Fmr1-KO cuando son comparados con los WT-control de la misma edad.

En cambio y para finalizar en la figura 24 C se observa que el contenido de la proteína eNOS no muestra diferencia significativas en las áreas cerebrales estudiadas y en las diferentes edades cuando se comparan Fmr1-KO con WT-control.

4. ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS SUBUNIDADES DE LA NOS EN EL CEREBRO

Para caracterizar la expresión de las diferentes subunidades de NOS se analizaron los niveles de expresión mRNA de las tres subunidades en las tres áreas de estudio y en el cerebro completo.

En la figura 25 se muestran los resultados de los experimentos de PCR a tiempo real de cada proteína normalizado con los niveles de mRNA para la proteína constitutiva GADPH tanto para las tres áreas cerebrales y el cerebro completo de ratones Fmr1-KO y WT de 3 y 6 meses de edad.

Las figuras 25 A (3 meses) y 25 B (6 meses) demuestran que hay una disminución significativa en los niveles de expresión de mRNA de nNOS en el cerebro completo así como en las tres áreas seleccionadas, cuando se compara muestras de Fmr1-KO con muestras de WT-control de ambas edades (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control), siendo particularmente pronunciado en el cerebelo de ratones de 3 meses de edad (figura R13A).

Los niveles de mRNA de iNOS, en cambio se encuentran significativamente incrementados en el cerebro completo y en las tres áreas anteriormente mencionadas cuando comparamos ratones de 3 y 6 meses de edad tanto Fmr1-KO como WT-control(* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control), tal como se muestran los datos de la figura 25 C (3 meses) y figura 25 D (6 meses). La diferencia menos evidente fue en el hipocampo de ratones de 6 meses cuando se comparan ratones Fmr1-KO con WT-control (figura 25 D).

Con respecto a la expresión de eNOS no se han encontrado cambios significativos tanto para las distintas regiones y el cerebro completo ni en las diferentes edades cuando se comparan ratones Fmr1-KO y WT-control (figura 25 E y figura 25 F).

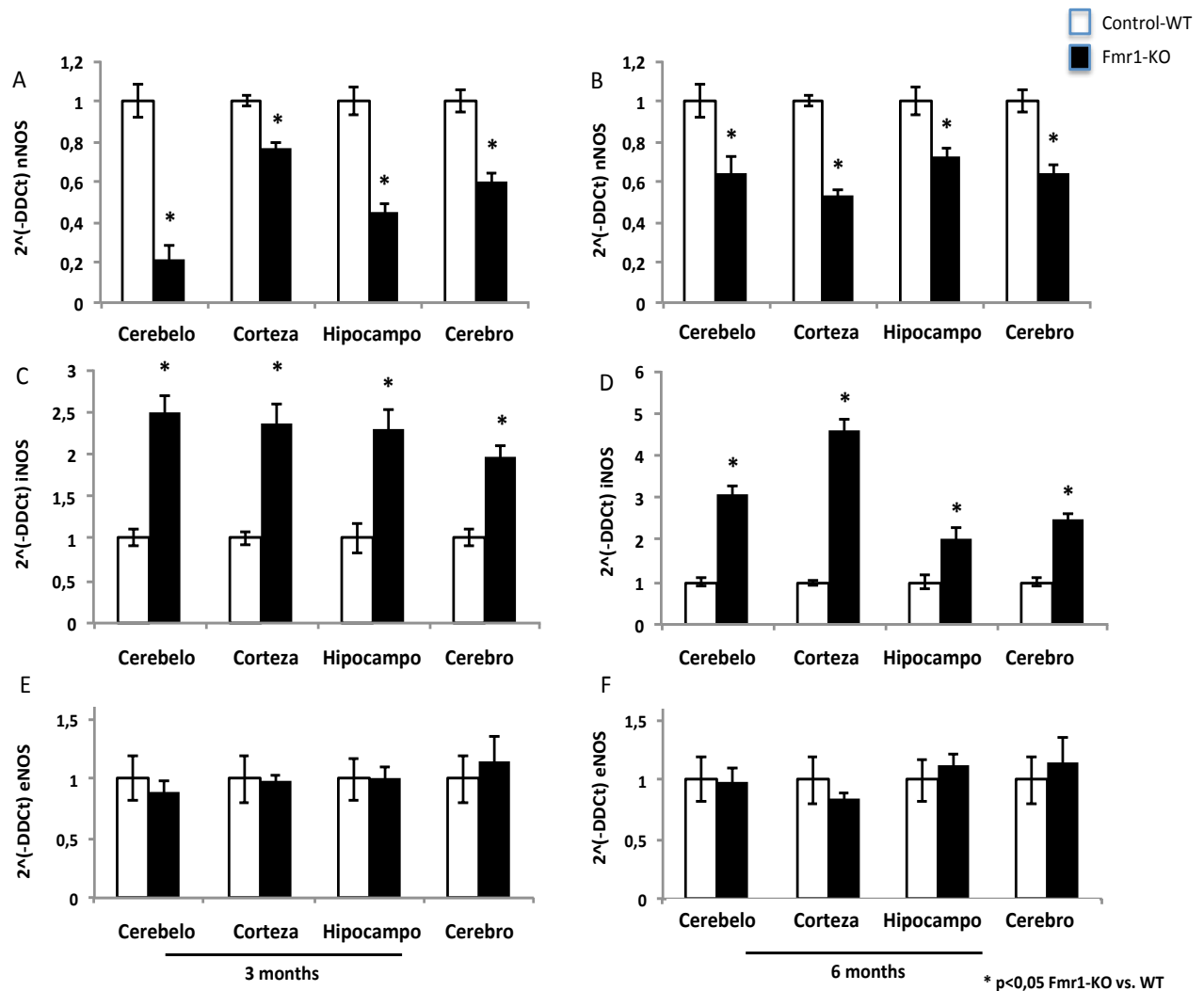


Figura 25. Niveles de expresión del mRNA determinados por PCR a tiempo real de las tres isoformas de NOS (A, B, C, D, E y F). Las figuras A y B muestran los niveles relativos de expresión ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) de nNOS, las figuras C y D los niveles relativos de iNOS mientras que las figuras E y F para eNOS. Las barras de las gráficas indican los niveles de mRNA normalizado por el nivel de mRNA de GADPH tanto en las tres áreas cerebrales de estudio como en el cerebro completo (brain). Se comparó entre ratones Fmr1-KO y WT-control a dos edades diferentes (3 y 6 meses) (* $P < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control).

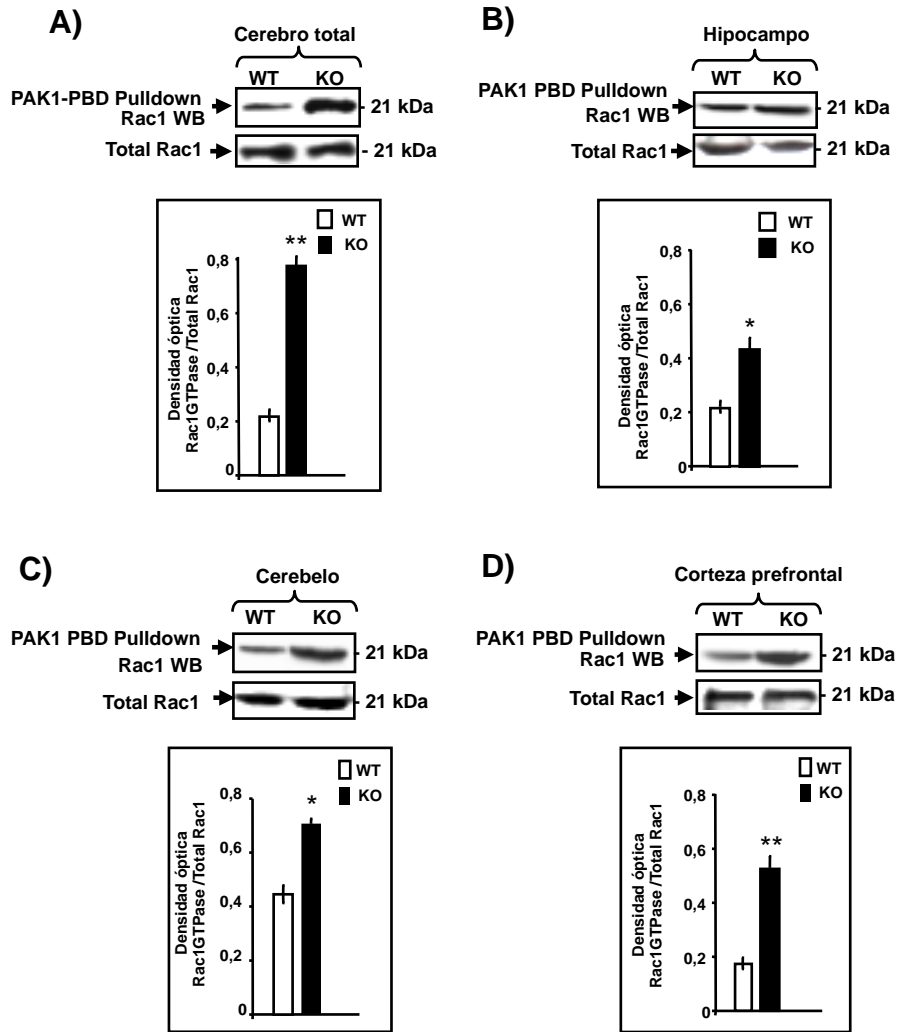
RAC1 EN EL SÍNDROME X FRÁGIL.

1. ACTIVACIÓN DE RAC1

Para mejorar el conocimiento del efecto de las señales intracelular mediada por las pequeñas moléculas GTPasa, en las alteraciones fisiopatológicas observadas del SXF, se estudió la activación de la proteína Rac1 en extractos de cerebro total, hipocampo, cerebelo y corteza prefrontal.

La activación de Rac1-GTPasa fue estudiada mediante la inmunoprecipitación de la forma activa de proteína Rac1-GTPasa. El dominio PAK1-PBD adherido a bolas de agarosa fue usado para que las proteínas Rac1 en su forma activa se unieran específicamente a ellas (debido a que PAK1-PBD se une a la forma de la proteína unida al nucleótido trifosfatado GTP) y se consigue que la proteína activa inmunoprecipite. Se analizó que ocurre en los inmunoprecipitados de homogenados de cerebro completo y las tres principales áreas estudiadas en el SXF.

La Figura 26 muestra los resultados de diferentes *western-blot* con 30 μ g de extractos inmunoprecitados de cerebro completo (A), hipocampo (B), cerebelo (C) y con la corteza prefrontal (D). Los animales Fmr1-KO exhibieron una alta diferencia significativa de activación de Rac 1 cuando son comparados con su WT-control correspondiente. La mayor diferencia se encuentran en extracto de cerebro completo, donde hay una activación hasta 4 veces mayor en KO que en WT, mientras que la menor diferencia está en el hipocampo; aun así en todos los casos se percibe diferencias significativas entre Fmr1 KO y WT-control (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT; ** $p < 0.01$ Fmr1-KO versus WT).



* p<0.05 comparan Fmr1-KO vs WT
 ** p<0.01 comparan Fmr1-KO vs WT

Figura 26. La activación de Rac1-GTPasa fue medida en extracto de cerebro completo (A), hipocampo (B), cerebelo (C) y corteza prefrontal (D) de ratones WT-control (n=6) y Fmr1-KO (n=6) de 4 meses de edad, a los cuales se le obtuvieron homogenado completo de cerebro o de diferentes áreas diseccionadas. A 80µg de extractos de proteínas se le añadió 30µl de PAK1-PBD conjugado a bolas de sepharosa GST para provocar la inmunoprecipitación de la forma activa de Rac1. Al inmunoprecipitado se le realiza un *western-blot* y los resultados mostrados son normalizados con la cantidad de Rac1 total. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. La cuantificación de las bandas fue llevada a cabo por el software Image J (desarrollado por el National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) y expresada por la media de intensidad óptica para tres experimentos independientes ±SEM (mean ± SEM) y normalizados con la densidad óptica para el total de Rac1-GTPasa del mismo blot. La significación estadística de los valores de cuantificación fue estudiada usando el test de Student no pareado. Valores *P < 0.05 y **P<0.01 fueron considerados significante [Fmr1-KO grupo vs. WT control grupo].

2. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO Y CORTEZA

La proteína Rac1-GTPasa fue analizada tanto en el hipocampo como en la corteza, mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas sobre tejido de ratones Fmr1-KO y ratones WT.

En la figura 27 mostramos la inmunohistoquímica de dos áreas cerebrales distintas, el giro dentado del hipocampo (lugar importante de formación de nuevas neuronas) y la corteza. La figura nos muestra evidencia de señal positiva de Rac 1-GTPasa en ambas áreas cerebrales, no hay diferencias aparentes en la inmunodetección de esta GTPasa cuando son observadas las mismas áreas en los animales WT-control y Fmr1-KO.

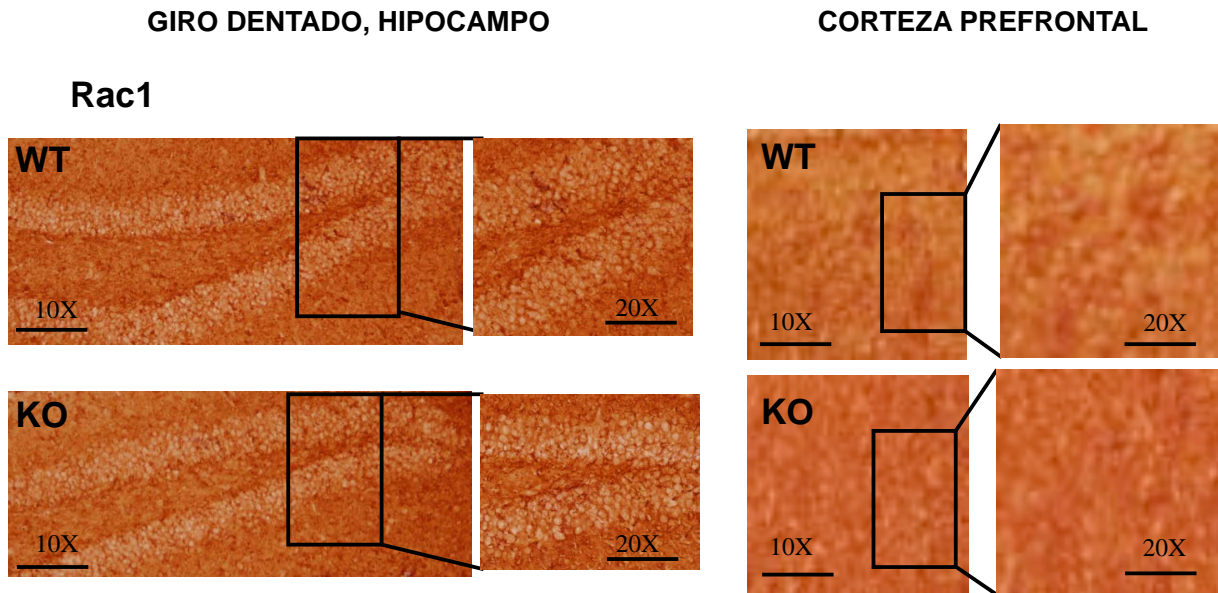


Figura 27. Inmunodetección de Rac1, Rho-GDI y TIAM1 en dos áreas del cerebro: giro dentado del hipocampo y la corteza. El panel representa la detección de la proteína Rac1 por inmunohistoquímica en las áreas cerebrales de ratones de 4 meses de edad control-WT (n=6) y Fmr1-KO (n=6). La señal positiva de cada proteína es mostrada como una señal marrón que marca las células. La inmunohistoquímica de Rac1 no muestra diferencias significativas entre WT-control y Fmr1-KO. Para cada proteína y área de estudio, imágenes representativas en 2 diferente magnificación fueron tomadas: 10X en la izquierda del panel y 20 X en la derecha del panel.

3. MEDIDA DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA ERK

La proteína Rac1 activa está implicada en la activación de diferentes rutas de señalización intracelular, y sirve de efector de algunas moléculas importantes del metabolismo celular. Una de las rutas más importantes sobre la que actúa Rac1-GTPasa es la protagonizada por las proteínas MAP kinasas (ERK-1/2, p38 y JUNK), que son una serie de proteínas de señalización intracelular que van a activar a distintos elementos celulares para ejercer su acción. Los procesos de activación de las proteínas MAP kinasas tienen que ver y están relacionados con procesos de fosforilación de ciertos residuos.

En estos resultados (figura 28) se muestran como en ratones Fmr1-KO hay una mayor activación de la proteína ERK-1/2 (pERK-1/2), siendo esta diferencia significativa respecto a lo que ocurre en ratones WT. Estos resultados son verificados tanto en *western-blot* como en estudios por inmunohistoquímica de hipocampo. Estos últimos ensayos revelan un aumento de la señal detectada en ratones Fmr1-KO comparado con controles sanos, cuando se usa anticuerpos específicos para detectar la fosforilación de las proteínas ERK y por tanto la activación.

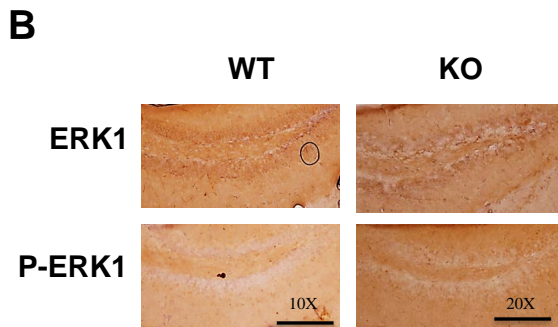
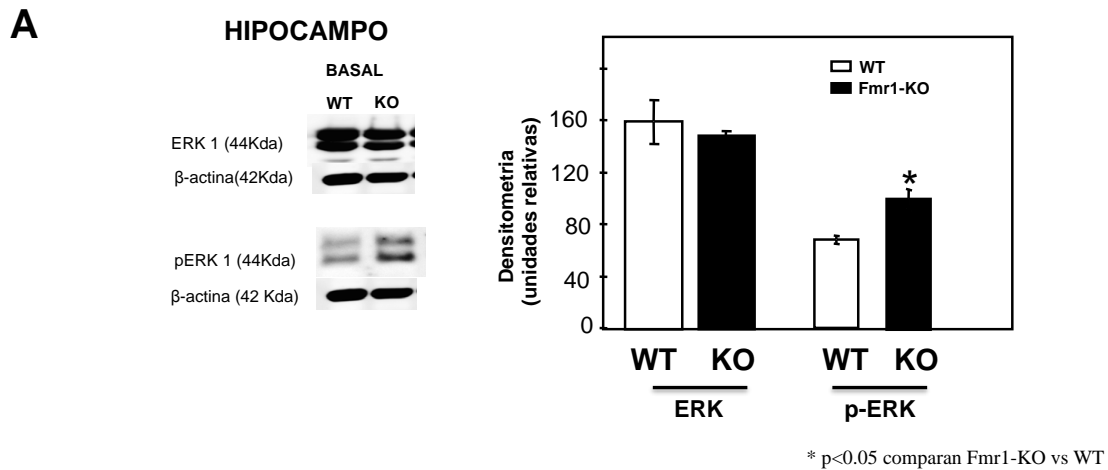


Figura 28. Activación de ERK-1/2.

A) *Western-blot* de extractos de proteínas (45 mg) en SDS-PAGE, transferido a membrana de PVDF e incubado con anticuerpo específico anti-fosfo-ERK1/2 resuelto por medio de quimioluminiscencia mejorada con luminol. Para verificar incluso las proteínas de carga, las transferencias fueron posteriormente deshidratadas e incubadas con anticuerpos anti-beta actina como proteína de referencia. La cuantificación de las bandas fue llevada a cabo por el software Image J (desarrollado por el National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) y expresada por la intensidad óptica para tres independientes blots \pm SEM (mean \pm SEM) (* p<0.05 comparan Fmr1-KO vs WT por ANOVA).

B) Estudios de cortes de hipocampo por inmunohistoquímica para detectar la fosforilación de las proteínas ERK-1/2 revelado con DAB, revelan un aumento de la señal detectada en ratones Fmr1-KO comparado con controles silvestres. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

4. MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE RAC1

El RNA mensajero y por lo tanto la expresión génica de la proteína Rac1 fue analizado mediante el uso de la PCR a tiempo real con el intercalante *SYBER Green*. Para la proteína se analizó el mRNA extraído desde cerebros completos y las tres áreas de estudio (cerebelo, corteza prefrontal e hipocampo). Se utilizaron 10 ratones Fmr1-KO y 10 ratones WT-control en este estudio, a los cuales se les extrajo el cerebro y las áreas cerebrales correspondientes se diseccionaron en frío, siguiendo las indicaciones de posición del atlas del cerebro de ratón de Paxinos.

Para Rac1 (A) los resultados fueron relativizados con el dato obtenido para el gen de referencia (*housekeeping*) que en este caso fue β -actina. En ninguna de las zonas analizadas se encontraron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT).

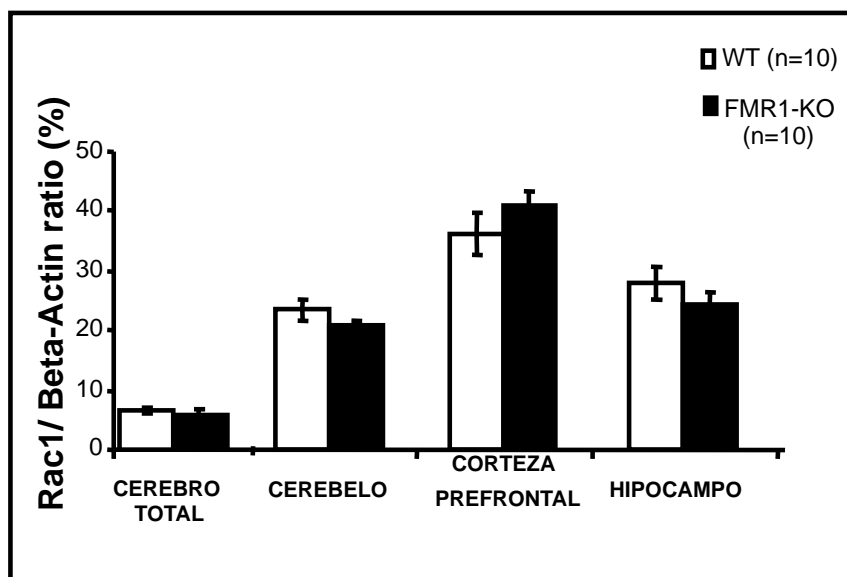


Figura 29. Expresión del gen Rac1 en el cerebro total y áreas específicas del cerebro (cerebelo, corteza prefrontal e hipocampo) de ratones wild type (WT)-control (n=10) y ratones nulo para Fmr1 (Fmr1-KO) (n=10). Las regiones se diseccionaron siguiendo al atlas de Paxinos y el RNA total se extrajo según se describe en el material y método (método de fenol-cloroformo y purificación en columna). Los resultados nos muestran que los niveles de mRNA de Rac1 no están afectados por la ausencia de FMRP en las distintas áreas de cerebros de animales con el SXF. Los datos de expresión están relativizados con los valores de un gen constitutivo que en este caso es la β -actina (Mean \pm SEM n=10 cada grupo). El análisis estadístico que se llevó a cabo fue Ttest no pareado. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significantes. * $p < 0.05$, fmr1-KO versus WT-control.

TRATAMIENTOS PARA EL SÍNDROME X FRÁGIL

TRATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE RAC1

1. MEDIDA DE LA DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS

El SXF se ha caracterizado como una sinaptopatología definida así por la presencia de anomalías en el número de espinas, dinamismo y morfología de las mismas, así como una regulación en los receptores glutamatergicos de grupo 1 (mGLUR 1 y 5) (Portera-Cailliau C. 2012 ; Till SM. y col., 2015).

Para medir la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, la densidad fue medida en las espinas apicales del estrato radial. El análisis cuantitativo fue llevado a cabo en tejidos marcados de negro y que poseen impregnaciones de Golgi que eran uniformes a lo largo de las secciones. Las neuronas estaban localizadas dentro de la región CA1 de la formación hipocámpal y como condición de que no hubiera ninguna región dendrítica sin marcaje a lo largo de la dendrita.

La medida es al menos a 50 μm desde el soma de las neuronas. Se eligieron 5 segmentos de 10 μm de longitud del mismo plano de visión. Para el conteo necesitamos el juego constante con el micrómetro del microscopio epifluorescente (OLYMPUS BX41, Tokyo, JAPÓN) para obtener un fino ajuste de la imagen, las imágenes se obtienen a 100 X con su consecuente aceite de inmersión requerido. Sólo se contó a aquellas espinas dendríticas que se diferenciaban de la rama principal.

La densidad de espinas fue calculada mediante la división del número de espinas en un segmento por la longitud de dicho segmento y fue expresado como el número de espinas dendrítica por 10 μm de dendrita. El valor de las densidades es la media de las espinas dendríticas de 5 fragmentos contabilizados por neurona así como la media de seis células neuronales por animal. Aunque de esta manera subestimamos el valor real de espinas dendríticas, ya que no se contabiliza todas las dendritas ni todas las neuronas, sería una estimación de la densidad.

La fuerte relación que se establece entre Rac 1-GTPasa en la formación y elongación de las espinas dendríticas a través de la polimerización de los filamentos de actina se ha descrito con anterioridad (Newey SE y col., 2005). En esta tesis doctoral hemos estudiado la densidad de espinas dendríticas a través de la tinción Golgi-Cox de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo de cerebros obtenidos desde un grupo de ratones WT-control (n=6) y ratones Fmr1 KO (n=6), en condiciones basales y bajo un tratamiento crónico con el inhibidor Rac1 (Z62954982). Como era de esperar, se muestra un incremento del 38 % en la densidad de espinas dendríticas detectadas en el ratón nulo Fmr1-KO comparado con el control (WT), así como se observa una normalización en los niveles de espinas dendríticas de los ratones Fmr1-KO después del tratamiento crónico con 2 mg/kg/día del inhibidor de Rac1. (A) (Basal: 11 ± 3 vs 18 ± 2 ; Tratamiento: 9 ± 3 vs 10 ± 2) (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT). En la figura 30B se muestran una imagen representativa de la tinción Golgi-Cox de espinas apicales, observándose el incremento de las espinas dendríticas de ratones Fmr1-KO bajo condiciones basales, sin aplicación de tratamiento alguno (Basal: 11 ± 3 vs 18 ± 2). Mientras que en la figura 30 C se muestra la normalización que se produce en la densidad de espinas dendríticas en los ratones Fmr1 KO después del tratamiento crónico con el inhibidor de la Rac 1 Z62954982 (Tratamiento: 9 ± 3 vs 10 ± 2).

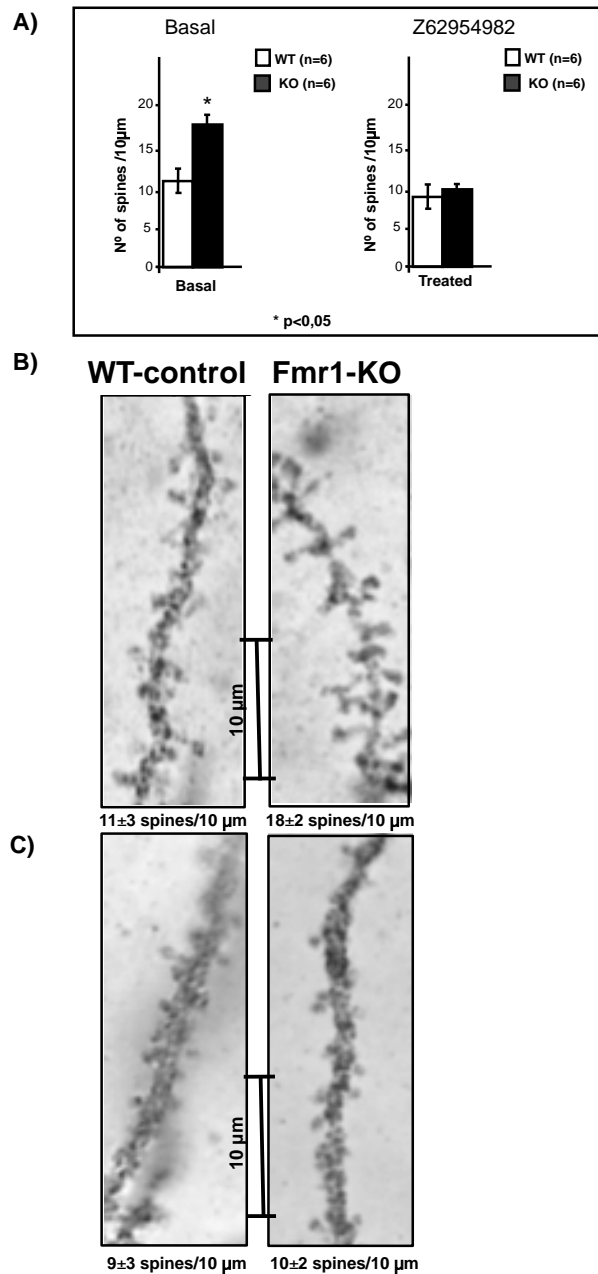


Figura 30. Cuantificación de espinas dendríticas de las zonas apicales de células piramidales de la región CA1 del hipocampo, la región cerebral se diseccionó siguiendo al atlas de ratón de Paxinos. (A) Densidad de espinas en las dendritas apicales fue significativamente alta en los ratones con genotipo Fmr1-KO y es normalizado por el tratamiento crónico de 2 mg/kg/día de Z62954982 (inhibidor específico de Rac1). (B) Imágenes representativas de dendritas apicales con la tinción de Golgi-Cox, se muestra una mayor densidad de espinas dendríticas en los ratones Fmr1-KO. La densidad de espinas dendríticas se expresa con el número de espinas en un segmento de 10µm de dendrita. (C) Imágenes representativa dendritas apicales con la tinción de Golgi-Cox donde se puede observar una normalización de las espinas dendríticas en los ratones Fmr1-KO después del tratamiento crónico con el inhibidor específico de Rac1. La medida de la espina dendrítica se muestran como su media y el error estándar de medida (mean ± SEM) a lo largo de la dendrita de Fmr1-KO (KO n=6) and control-WT (WT n=6). [*p < 0.05 Fmr1-KO versus WT-control], la comparación fue hecha entre 6 muestras experimentales de cada diferente ratón.

2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE RAC 1 EN EL COMPORTAMIENTO DEL RATÓN Fmr1-KO

Para identificar el efecto potencial de la inhibición de Rac1 en el comportamiento asociado al SXF, especialmente en la ansiedad y en el aprendizaje, se realizan diferentes pruebas comportamentales antes y después de la aplicación de un tratamiento crónico con un inhibidor de Rac1. Debido a estos estudios anteriormente mencionados planteamos el uso de un inhibidor de la Rac1, para ver si hay una mejoría en los parámetros comportamentales del ratón.

El inhibidor utilizado es InSolution™ Rac1 Inhibitor II, Z62954982 (Millipore) que es una benzamida selectiva que inhibe la activación de Rac1 al interferir la unión Rac1-Tiam1 (Ferri, N., y col. 2009.). Los ratones Fmr1-KO fueron tratados mediante inyecciones intraperitoneales con un inhibidor específico para Rac1 (Z62954982) después del tratamiento se sometieron a diferentes pruebas de comportamiento, específicamente laberinto en cruz elevado y reconocimiento de objeto.

En condiciones basales, los ratones Fmr1-KO muestran un comportamiento típico de este tipo de ratones donde característicamente hay una respuesta anormal a estímulos que pueden provocar ansiedad. Estos ratones en condiciones basales se mantienen significativamente más tiempo en el brazo abierto que los ratones WT-control (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT). El tratamiento con Rac1 reduce el tiempo que los ratones modelo de la enfermedad pasan en el brazo abierto del laberinto en cruz elevado por lo que normaliza la respuesta ansiosa del ratón Fmr1-KO (figura 31 A).

En cuanto a los resultados de la prueba de reconocimiento de objeto, en los ratones Fmr1-KO se observa que bajo condiciones basales un incremento significativo (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT) en el tiempo de exploración del nuevo objeto mientras que después del tratamiento crónico se ve reducido. Viéndose una mejora en el proceso cognitivo (figura 31 B).

Todos estos últimos datos sugieren que la inhibición de Rac1 por Z62954982 reverte las alteraciones observadas en la respuesta ansiosa y las alteraciones cognitivas asociadas a la ausencia de la proteína FMRP en los ratones nulos de Fmr1.

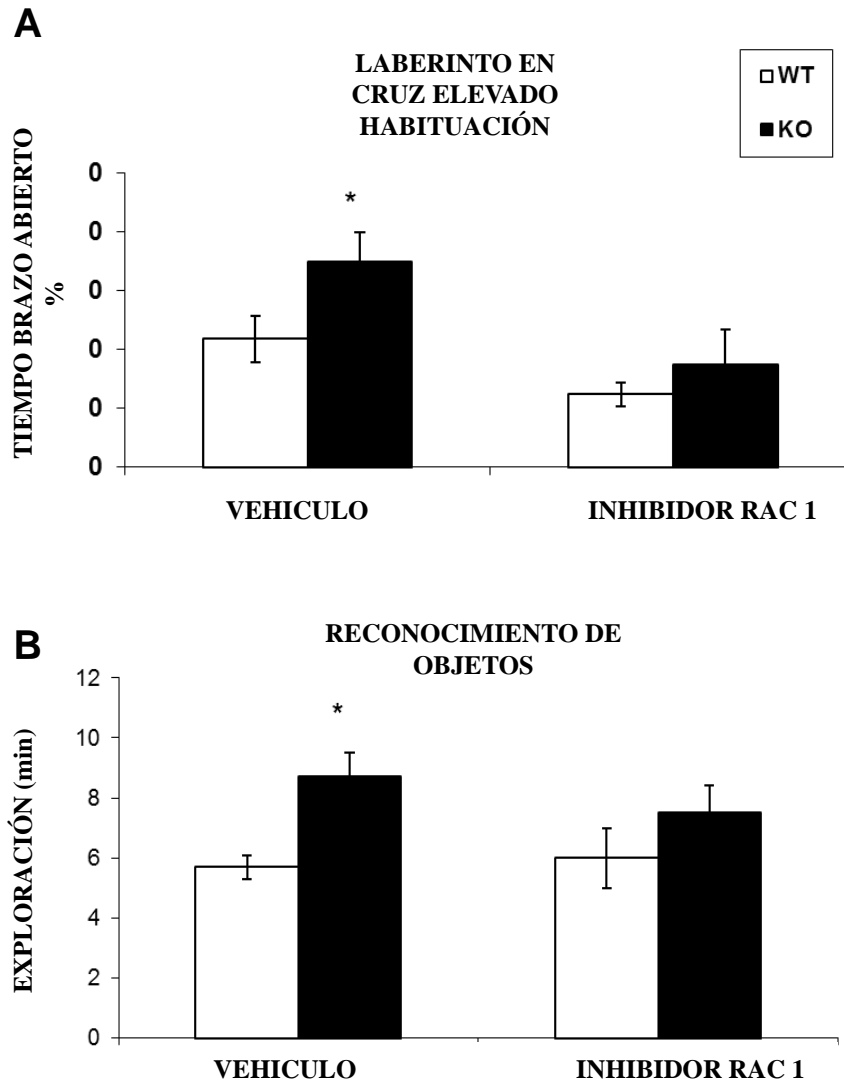


Figura 31. Tratamiento crónico con vehículo o 2 mg/kg/día de Z62954982, muestra un efecto positivo en el comportamiento por la inhibición de Rac1 en comparación con el vehículo.

A) Actividad exploratoria de los ratones en el laberinto en cruz elevado. Los ratones Fmr1-KO gastan más tiempo en el brazo abierto (parámetro de medida de ansiolisis) que los ratones WT-control, esta alteración se ve normalizada con el tratamiento con Z62954982.

B) La exploración de un objeto nuevo esta incrementado en los animales Fmr1-KO vehículos en comparación con lo observado en grupo WT-control, el tratamiento con 2 mg/kg/día Z62954982 normaliza este parámetro indicando una normalización cognitiva.

* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control. Comparación de los múltiples grupos fue realizada con el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una transformación de Bonferroni

TRATAMIENTO CRÓNICO CON ANTIOXIDANTES

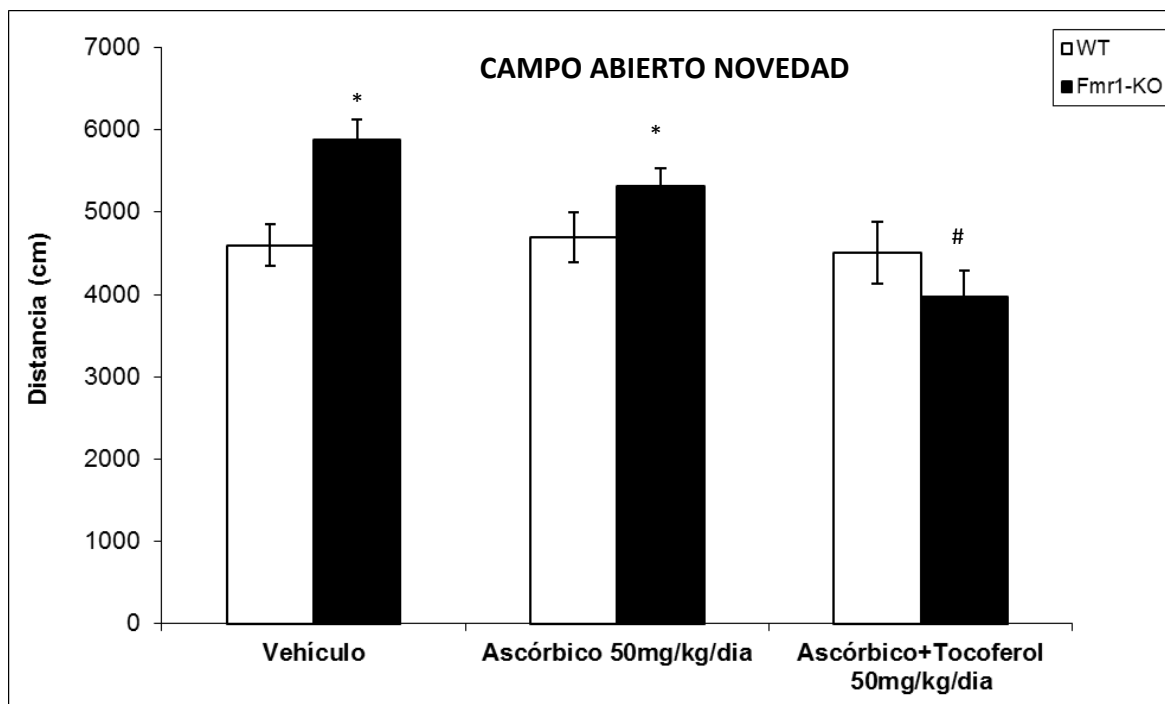
1. MEJORA EN LA HIPERACTIVIDAD CON ANTIOXIDANTES

Tal como se ha comentado en la introducción y ha sido extensamente estudiado en nuestros experimentos unos de los elementos de la fisiopatología del SXF es un estado de estrés oxidativo en el cerebro. Este exceso de ROS y RNS se suele combatir con la aplicación de tratamientos con antioxidantes.

Con el fin de observar y evaluar el efecto potencial en el comportamiento asociado al SXF, de la aplicación de un tratamiento oral con ácido ascórbico (vitamina C) y en paralelo la combinación de ácido ascórbico (vitamina C) + α -tocoferol (vitamina E), teniendo especial interés en la ansiedad y en el aprendizaje; se plantea un ensayo donde se van a llevar a cabo unas series de pruebas comportamentales antes y después del tratamiento crónico con los antioxidantes referidos.

En condiciones previas al tratamiento se observó que los ratones Fmr1-KO manifiestan un comportamiento característico de este tipo de ratones donde peculiarmente hay una respuesta anormal a estímulos que pueden provocar ansiedad.

Tras el tratamiento crónico con vehículo y con ácido ascórbico se observan diferencias significativas en distancia total recorrida entre WT y Fmr1-KO que indicaría hiperactividad locomotora del modelo del síndrome (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT). El tratamiento con la combinación de vitamina C y E normaliza la distancia recorrida por los ratones con la enfermedad respecto a su congéneres sanos en la prueba comportamental del campo abierto, por lo que normaliza la hiperactividad evidenciada en este modelo animal y que vemos puede estar directamente relacionada con el estrés oxidativo descrito en el ratón Fmr1-KO (figura 32) (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT). Además se demuestra eficacia del tratamiento, al detectarse diferencias significativas entre los ratones Fmr1-KO tratados con ambas vitaminas que reducen aproximadamente un 20% la distancia total recorrida con respecto a los ratones Fmr1-KO tratados con vehículo (# $p < 0.05$ Fmr1-KO versus Fmr1-KO vehículo).



*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT
#p< 0.05; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo

Figura 32. Distancia recorrida en 15 min en el primer día de la prueba del campo abierto (Novedad). Se muestra un efecto positivo del tratamiento con una combinación de antioxidantes en la normalización de la distancia recorrida en el campo abierto. Los datos son descritos como la media de la distancia recorrida en centímetros \pm SEM (*p<0.05 Fmr1-KO versus WT-control, #p< 0.05; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo).

2. MEJORA EN EL APRENDIZAJE CON LA COMBINACIÓN DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES

En la prueba de reconocimiento de objetos se puede estudiar la memoria a corto y largo plazo modificando el intervalo de tiempo entre la primera exposición a dos objetos idénticos y la siguiente exposición al mismo objeto familiar y otro objeto distinto. En esta prueba se evalúa el grado de exploración del objeto familiar frente al nuevo. El test de reconocimiento de objeto está basado en la tendencia natural de los roedores a explorar los objetos nuevos sobre el familiar.

En la figura 33 se muestra que en el tratamiento con el vehículo hay una diferencia significativa (**<p 0.01 Fmr1-KO versus WT-control) en el tiempo de exploración del nuevo

objeto, al igual que ocurre en el caso del tratamiento con ácido ascórbico donde las diferencias es algo menor pero también significativas (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control). Con el tratamiento combinado de ácido ascórbico con α -tocoferol se encuentra que las diferencias desaparecen y que por lo tanto el comportamiento del Fmr1-KO se normaliza al control-sano, y se observa diferencia significativa con el grupo experimental Fmr1-KO en vehículo (# $p < 0.05$ Fmr1-KO versus Fmr1-KO), lo que indicaría una mejoría en el aprendizaje.

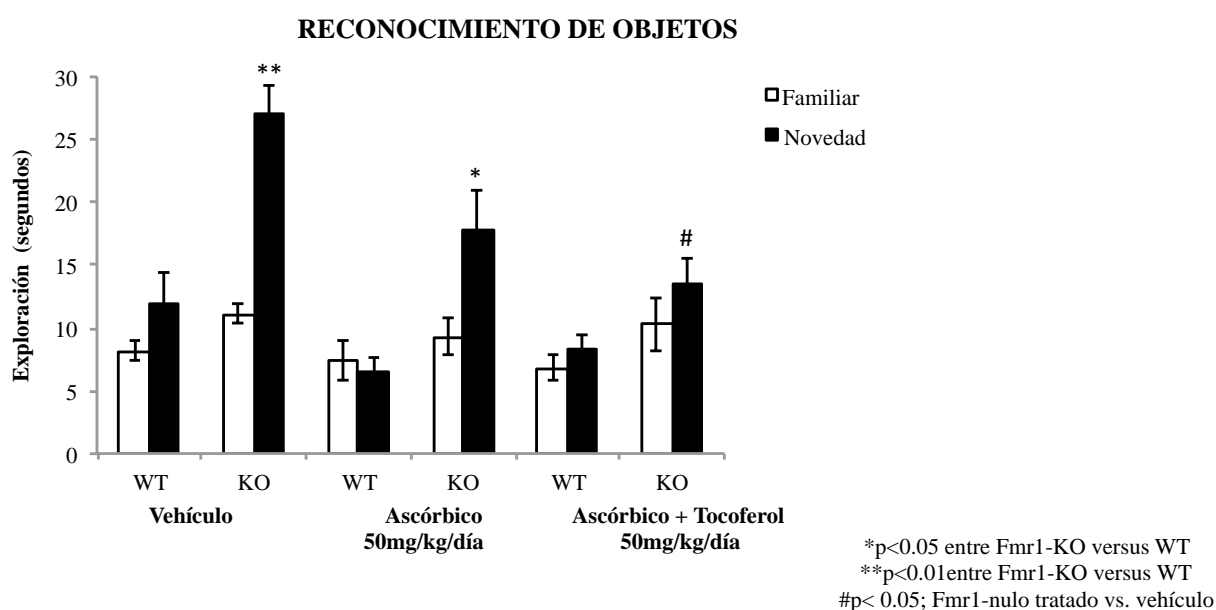


Figura 33. Tiempo de exploración de nuevos objetos. Se muestra un efecto positivo del tratamiento con la combinación de ácido ascórbico con α -tocoferol (50 mg/kg/día) en la normalización de la exploración del objeto nuevo en la prueba de reconocimiento de objeto. Los datos son descritos como la media del tiempo de exploración (en segundos) del objeto nuevo \pm SEM (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control; ** $p < 0.01$ Fmr1-KO versus WT-control, # $p < 0.05$; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo).

3. NORMALIZACIÓN DE LA RESPUESTA ANSIOSA CON LA COMBINACIÓN DE VITAMINAS ANTIOXIDANTES

La ansiedad tal como se ha hecho referencia en el material y métodos puede ser medida mediante el paradigma del laberinto en cruz elevado (*plus maze*), donde se observa que un

índice de la ansiedad manifestada es proporcional al tiempo que el animal permanece en el brazo cerrado del laberinto (Lister RG, 1987). Para determinar las diferencias entre genotipos en la respuesta ansiosa y como los tratamientos afectan a la misma, se midió el porcentaje de tiempo que el animal permanece en el brazo abierto.

En la figura 34 se muestra el porcentaje del tiempo que los ratones, tanto WT y Fmr1-KO, están en el brazo abierto del laberinto el día de habituación para cada tratamiento. El porcentaje de tiempo en el brazo abierto de los ratones Fmr1-nulos de los grupos naïve y vehículos es más alto en comparación con los animales WT-controles, reflejando la alteración de la respuesta ansiosa del ratón modelo del síndrome. Se ven diferencias significativas entre Fmr1-KO y WT-control tanto en el tratamiento con vehículo y en el tratamiento con vitamina C solamente (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT). Sin embargo se observa que el tratamiento combinado de ácido ascórbico y α -tocoferol normaliza el porcentaje de tiempo que los ratones Fmr1-KO están en el brazo abierto a niveles similares detectados en los ratones WT control-sano, ya que en este análisis no hay ninguna diferencia significativa, en cambio si se establecen diferencias significativas con el Fmr1-KO de vehículo (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus Fmr1-KO vehículo).

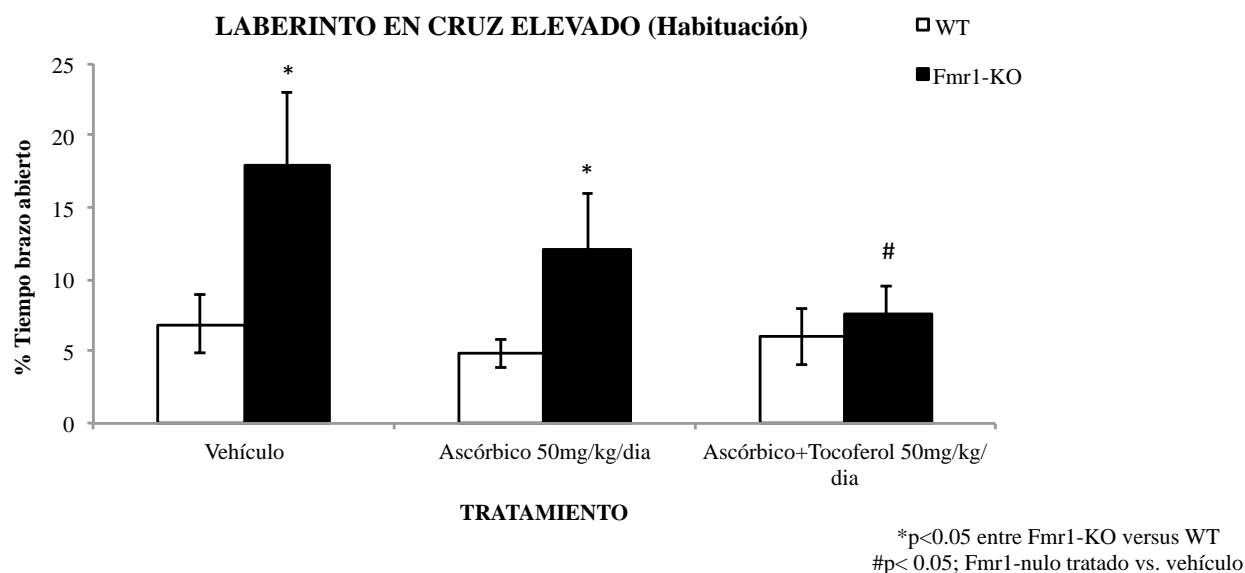
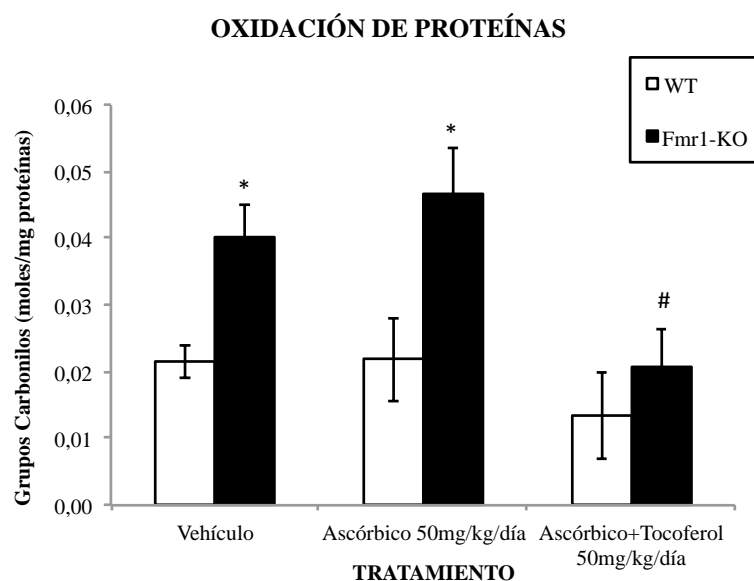


Figura 34. Distancia recorrida en el segundo día (habituación) de la prueba del laberinto en cruz (*plus maze*). Se muestra un efecto positivo de la combinación de ácido ascórbico y α -tocoferol en la normalización del porcentaje de tiempo que el animal está en el brazo abierto del laberinto. Los datos representan la media del porcentaje de permanencia por cada grupo de ratones y tratamiento \pm SEM. (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control, # $p < 0.05$; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo).

4. MEJORAS EN LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS TRAS LOS TRATAMIENTOS CON ANTIOXIDANTES

Se analizó el contenido de los grupos carbonilos (marcador de oxidación de proteínas) en cerebro normalizando los resultados según la concentración de proteínas totales y se expresó el contenido de grupos carbonilos en relación a los mg de proteínas totales. En la figura 35 se muestra como la aplicación del tratamiento con ácido ascórbico mantiene las diferencias significativas entre Fmr1-KO y WT-control (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT), al igual que pasa en el vehículo. Sin embargo el tratamiento combinado de ácido ascórbico y α -tocoferol, estabiliza la oxidación de proteínas a niveles observados para WT-control, siendo las diferencias significativas entre los ratones Fmr1-KO del tratamiento combinado y los ratones Fmr1-KO del vehículo (# $p < 0.05$; Fmr1-nulo tratado versus vehículo).



* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT
 # $p < 0.05$; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo.

Figura 35. Medida de la oxidación de proteínas en cerebro tras los tratamientos crónicos. La aplicación de un tratamiento crónico con los antioxidantes ácido ascórbico y α -tocoferol reducen la producción de grupos carbonilos en ratones Fmr1-KO. Contenido relativo de grupos carbonilos (nmol/mg de proteínas totales) en homogeneizado total de cerebro de ratones control (WT) y Fmr1-KO (Medias \pm SEM; $n=5$) (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT; # $p < 0.05$; Fmr1-nulo tratado versus vehículo).

Los niveles de TBARs constituyen un índice útil para medir la peroxidación de lípidos. En homogeneizado de cerebro (figura 36) de los grupos naïve y vehículo se observaron concentraciones significativamente elevadas de TBARs en los ratones *fmr1*-nulos comparados con los controles WT. La aplicación del tratamiento en caso de los grupos en vehículo muestra diferencias significativas en la producción de TBARs entre ratones nulos para *Fmr1* y ratones sanos (* $p < 0.05$ entre *Fmr1*-KO versus WT). Tanto el tratamiento con el antioxidante vitamina C sólo o en combinación con vitamina E, hace que se normalice los niveles de TBARs, mientras se evidencian diferencias significativas entre los ratones *Fmr1*-KO tratados y los ratones *Fmr1*-KO del vehículo lo que muestra un eficacia del tratamiento tanto de Vitamina C como de su combinación con vitamina E en la normalización de este biomarcador celular de oxidación.

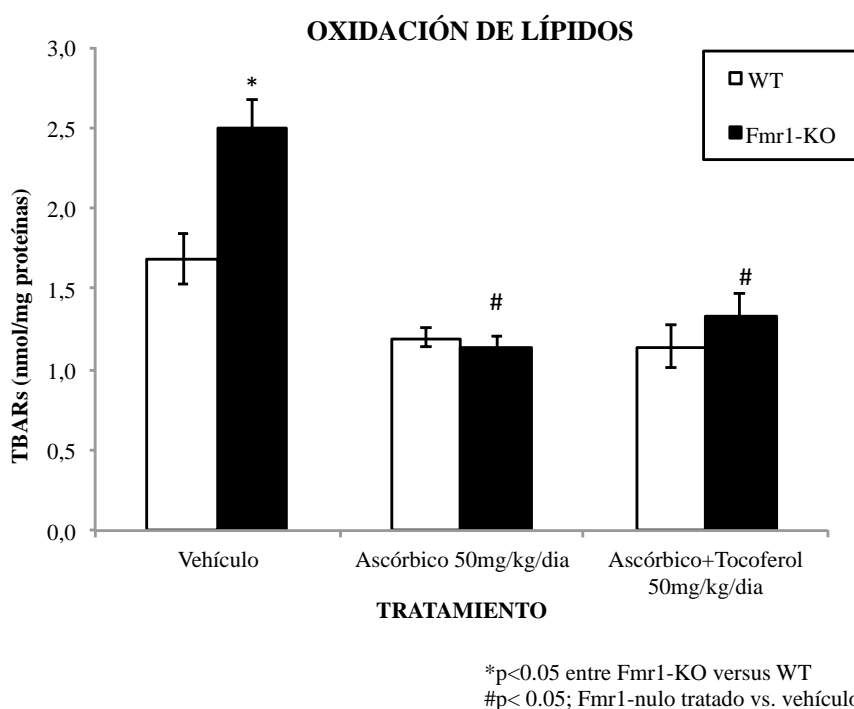


Figura 36. Concentración de TBARs (nmol/mg proteínas). La aplicación de dos tratamientos distintos con la vitamina C, su combinación con vitamina E reducen la producción de TBARs. Contenido relativo de grupos TBARs (nmol/mg de proteínas totales) en homogeneizado total de cerebro (WT) y *Fmr1*-nulos (Medias \pm SEM; $n=5$) (* $p < 0.05$ entre *Fmr1*-KO versus WT; # $p < 0.05$; *Fmr1*-nulo tratado versus vehículo)

TRATAMIENTO CRÓNICO CON APOCININA

1. NO HAY MODIFICACIÓN DEL PESO POR EL TRATAMIENTO CON APOCININA

Para ver el posible efecto de la apocinina que es un inhibidor de la enzima NADPH-oxidasa, en el peso del animal y por tanto en el bienestar del mismo, se realizó un estudio (figura 37 A) donde se aumenta la cantidad de apocinina suministrada (se aumenta 50 mg cada 30 días) a los ratones a lo largo de un tiempo de 120 días. Se observa que la variación del peso es mínima y no hay diferencia significativa entre Fmr1-KO y WT sanos.

De la misma manera, paralelamente se desarrolla otro experimento en el que se pretende ver la variación de los pesos a lo largo de 30 días de aplicación de las dosis de estudio (vehículo, 8 mg Apocinina y 32 mg Apocinina) (figura 37 B) en otro grupo de animales tanto Fmr1-KO como WT. Se muestra que tanto WT y Fmr1-KO en los tres grupos no varían sus pesos de manera importante y que en cada grupo de estudio se tiene una respuesta al tratamiento similar, lo que se demuestra en que la dinámica de la curva es similar tanto en WT como en el nulo para Fmr1.

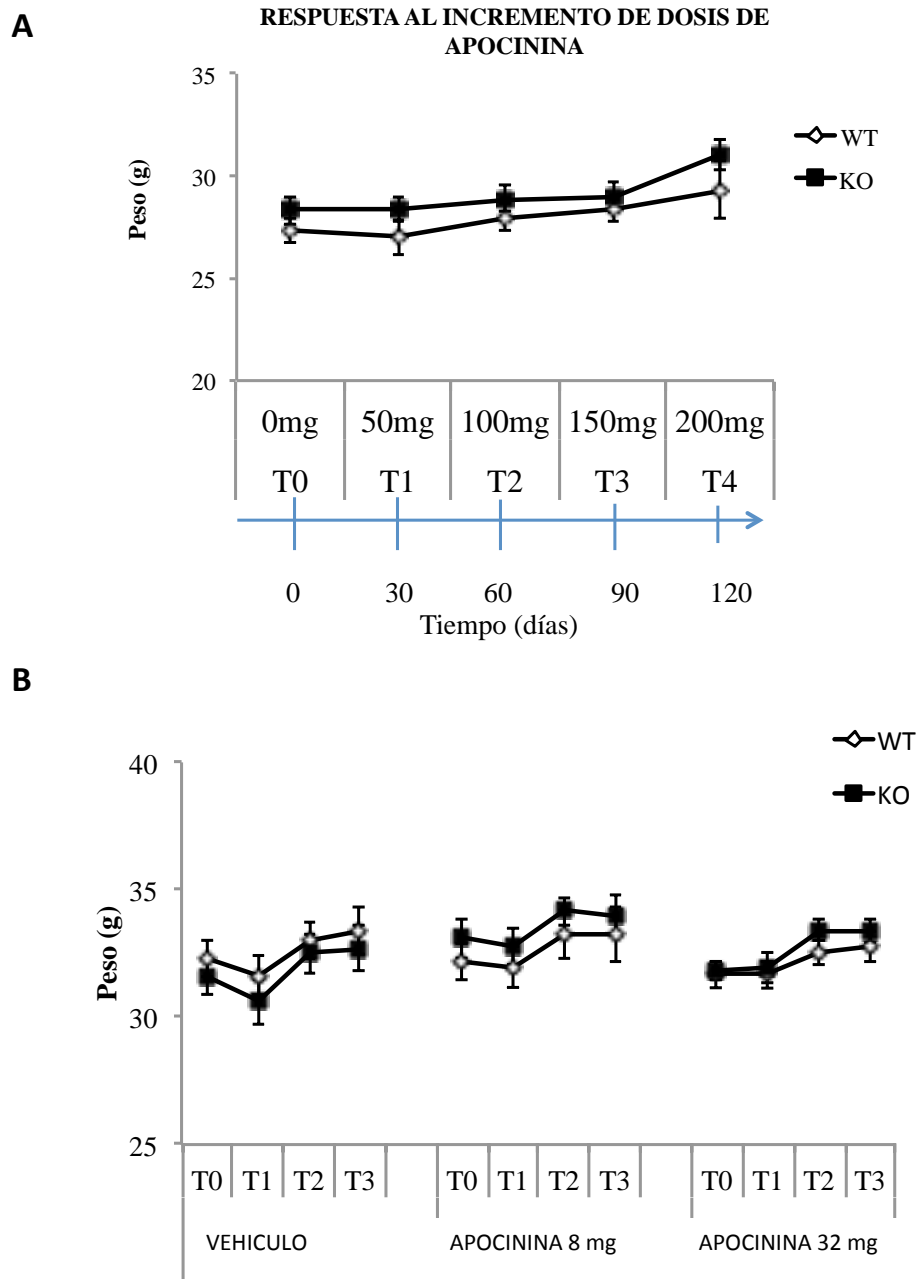


Figura 37: Evaluación de los pesos a lo largo de 120 días de tratamiento con distintas dosis de apocinina. En ninguno de los casos parece que la apocinina tenga un efecto en el peso. Fig. A evaluación del efecto en el peso del incremento en 50 mg de Apocinina cada 30 días durante un periodo de 120 días. Fig. evaluación del efecto en el peso de la aplicación de vehículo, 8 mg y 32 mg de apocinina durante un periodo de 30 días. Los datos mostrados son el peso medio del grupo de ratones \pm SEM (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT)

2. AUMENTO DEL PESO DE GRASA PERITONEAL TRÁS EL TRATAMIENTO CON APOCININA

En la figura 38 se muestra cuales son los pesos de diferentes órganos (cerebro figura A y testículos figura B) y de la grasa peritoneal (figura C) de los ratones tras el tratamiento crónico con apocinina. Se observa que el tratamiento no afecta al peso de los cerebros y que en el caso de los testículos se mantiene la diferencia de peso que hay entre los testículos de los ratones Fmr1-KO y sus congéneres sanos sin conseguirse la normalización del macroorquidismo. En testículos en todas las dosis se ve que hay diferencias significativas entre Fmr1-KO y WT (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT).

En cambio si hay un cierto aumento en la cantidad de grasa peritoneal en los ratones Fmr1-KO, reduciéndose las diferencias con los WT, después del tratamiento. En los ratones con el tratamiento vehículo se observó diferencias entre genotipos (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT).

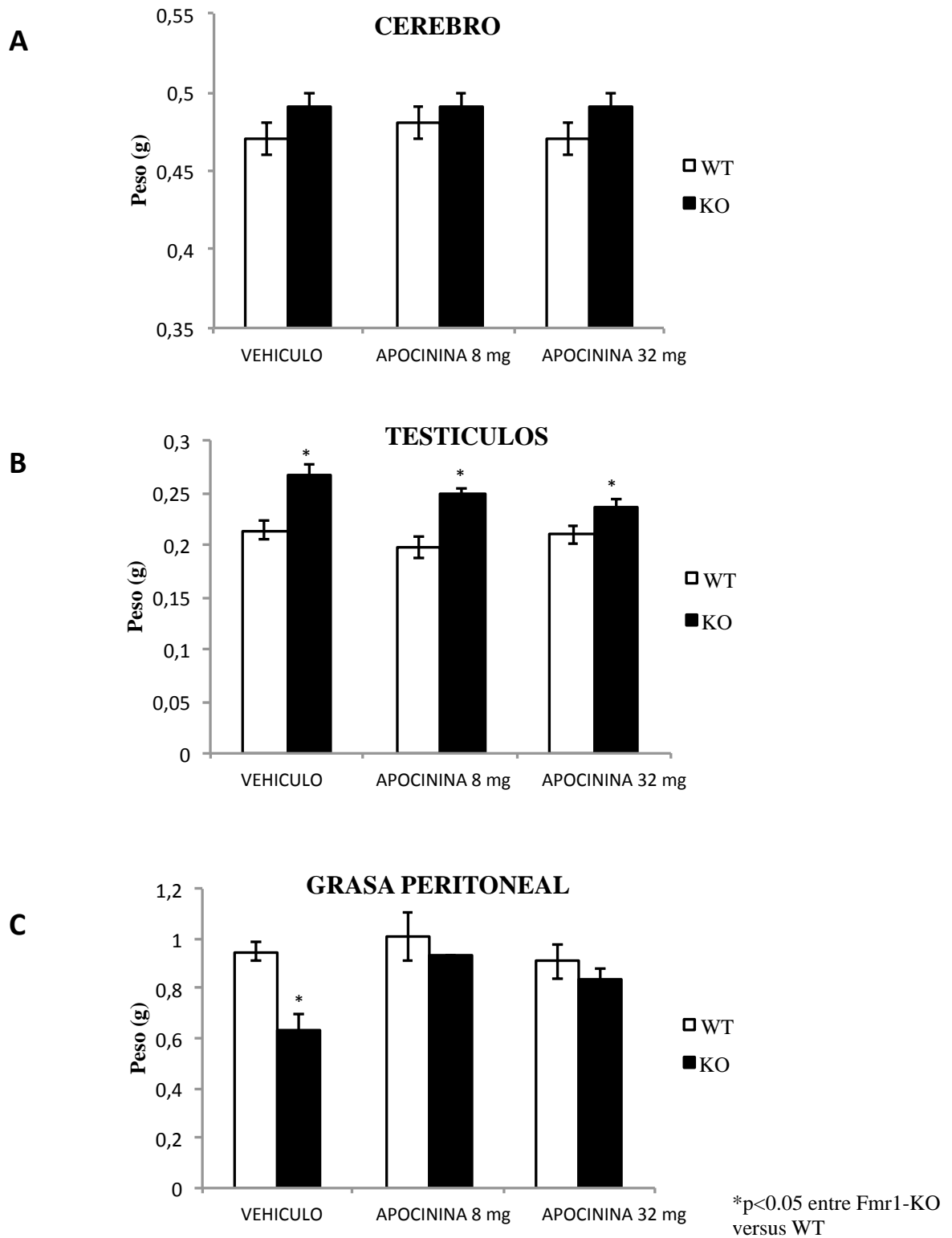


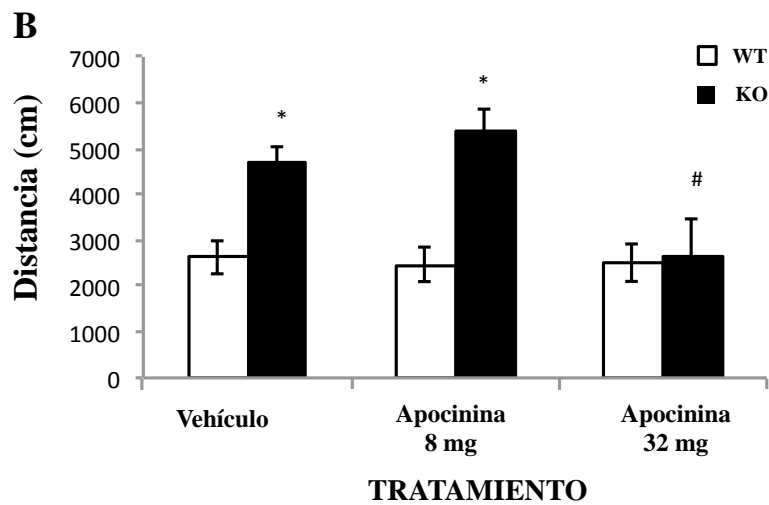
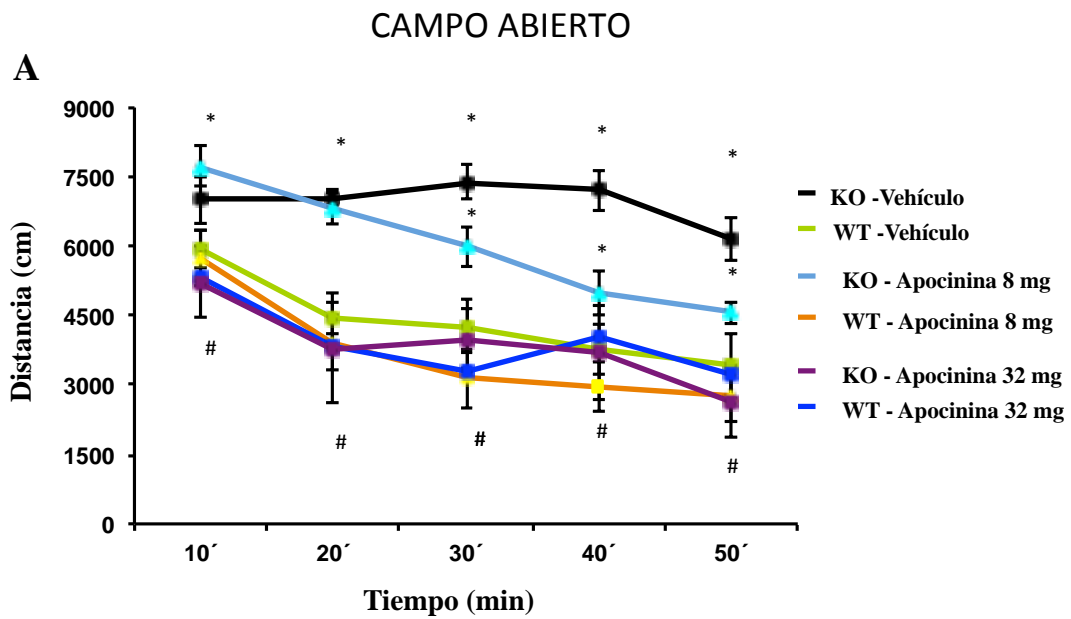
Figura 38. Pesos del cerebro (A), de los testículos (B) y grasa peritoneal (C) después del tratamiento con vehículo y apocininina (8 mg y 32 mg). En el cerebro (A) no se observa modificación del peso del mismo, en los testículos (B) se mantiene la diferencia del peso entre los grupos WT-control y Fmr1-KO propia del fenotipo SXF. En cuanto a la grasa peritoneal (C) se ve que hay normalización del peso de la misma. Los datos mostrados son el peso medio del grupo de ratones \pm SEM (*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT)

3. REDUCCIÓN DE LA HIPERACTIVIDAD EN RATONES FMR1-KO TRATADOS CON APOCICINA

En condiciones anteriores al tratamiento se observó que los ratones Fmr1-KO manifiestan un comportamiento representativo de este tipo de ratones donde peculiarmente hay una respuesta anormal en locomoción en campo abierto donde se ve que hay una mayor locomoción en los ratones nulos para la proteína FMRP.

Tras el tratamiento crónico se encuentran diferencias significativas de los Fmr1-KO en el tratamiento con 8 mg/kg/día respecto al vehículo (# $p < 0.05$; Fmr1-nulo tratado versus vehículo). El tratamiento con 32 mg/kg/día de apocinina (un inhibidor selectivo de la subunidad p47 de la NADPH oxidasa) hace que no haya diferencias significativas en la distancia recorrida por los ratones con la enfermedad, por lo que normaliza de algún modo la hiperactividad relacionada con el estrés oxidativo y el intrínseco excesivo comportamiento exploratorio del ratón Fmr1-KO (figura 39), al no encontrarse diferencias con lo mostrado para su congénere sano (WT).

Por otra parte, se encuentra que en el caso de la aplicación de vehículo y el tratamiento 8 mg/kg/día, el ratón Fmr1-KO recorre más distancia que el ratón control, siendo las diferencias significativas (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT). La misma tendencia se observa tanto en las distancias recorridas a lo largo de los intervalos de 10 minutos de los 50 min que dura el primer día del laberinto de campo abierto (figura 39 A), así como en los 15 minutos de la prueba en habituación al día siguiente del inicio de las pruebas (figura 39 B).



*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT
#p< 0.05; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo.

Figura 39. Distancia recorrida en la prueba del campo abierto. La distancia recorrida entre intervalos de 10 min (A) es mayor en los animales Fmr1-KO de los tratamientos vehículos y 8 mg/kg/día, mientras que en los animales que han sido tratados con 32 mg/kg/día no hay diferencias significativas entre los dos genotipos de animales, pero sí se reducen significativamente si comparamos con los Fmr1-KO de otros tratamientos. Lo mismo ocurre en lo observado en los 15 minutos de prueba del campo abierto al día siguiente, habituación (B). Los datos representan la media de la distancia recorrida en centímetro por cada grupo de ratones y tratamiento \pm SEM (*p<0.05 Fmr1-KO versus WT-control; #p< 0.05 Fmr1-nulo tratado versus vehículo).

4. NORMALIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ANSIOSO TRAS EL TRATAMIENTO CON APOCININA

La ansiedad es un estado que en roedores puede ser medido mediante el paradigma del laberinto en cruz elevado (*plus maze*) donde se observa que la ansiedad es proporcional al tiempo que el animal permanece en el brazo cerrado del laberinto (Lister RG, 1987), por lo que permanencia en el brazo abierto denota un estado ansioso menor o ansiolisis. A la hora de determinar las diferencias en la respuesta ansiosa entre genotipos y como los tratamientos afectan a la misma, se midió el porcentaje de tiempo que el animal permanece en el brazo abierto.

En la figura 40 se enseña el resultado de la prueba de comportamiento del laberinto cruz que se realizó post-tratamiento. En las gráficas se observa que hay diferencias significativas ($*p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control) entre los ratones Fmr1-KO y su correspondiente grupo WT-control en los tratamientos efectuados con vehículo y apocinina 8mg/kg/día, lo que está indicando que el tratamiento con estos componentes no provoca ninguna mejoría en la respuesta ansiosa del animal. Sin embargo cuando los animales Fmr1-KO son tratados diariamente de forma crónica con 32 mg/kg de apocinina si se encuentra mejoría en la respuesta ansiosa además no se hallan diferencias significativas con el grupo WT-control pero si con el grupo Fmr1-KO del tratamiento vehículo ($\#p < 0.05$ Fmr1-nulo tratado versus vehículo).

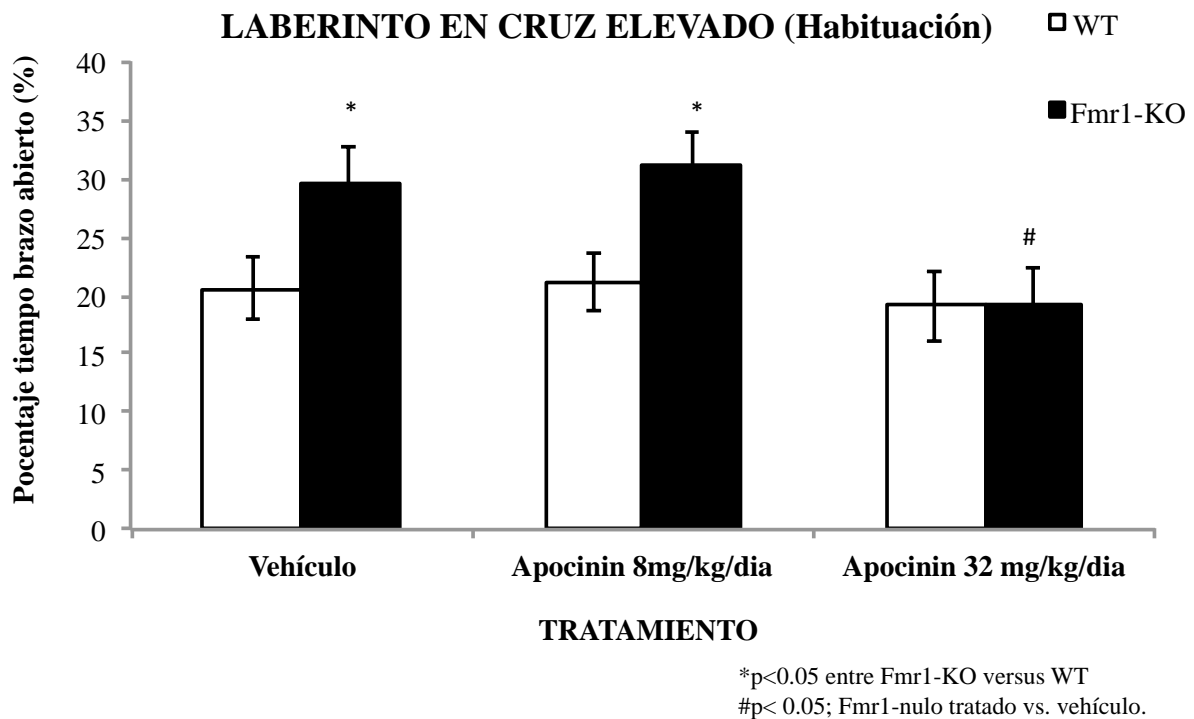


Figura 40. Distancia recorrida en el segundo día (habitación) de la prueba del laberinto en cruz (*plus maze*). Hay un efecto positivo de la combinación de 32 mg/kg/día en la normalización del porcentaje de tiempo en el brazo abierto del laberinto que ratón Fmr1-KO. Los datos son descritos como la media del porcentaje de permanencia por cada grupo de ratones y tratamiento \pm SEM. (*p<0.05 Fmr1-KO versus WT-control, #p< 0.05; Fmr1-nulo tratado vs. Vehículo).

5. MEJORAS DEL APRENDIZAJE TRAS EL TRATAMIENTO CON APOCININA

Diversas son las pruebas para medir el aprendizaje o la memoria del ratón. En la prueba de reconocimiento de objetos (figura 41 A) el investigador puede estudiar la memoria a corto y largo plazo, así que modificaciones en el intervalo de tiempo entre la primera exposición a dos objetos idénticos y la siguiente exposición con objetos distintos pueden ayudar en el estudio de estos dos tipos de memorias. En todo caso, se evalúa el grado de exploración del objeto familiar frente a otro nuevo. Este test de reconocimiento de objeto está basado en la tendencia natural de los roedores a explorar el objeto nuevo sobre el familiar.

Otra prueba que determina el aprendizaje es el test de miedo condicionado (figura 42 B), en esta prueba determinamos el aprendizaje después de someter al ratón a un entrenamiento con un estímulo negativo (golpe eléctrico en los pies) y un estímulo

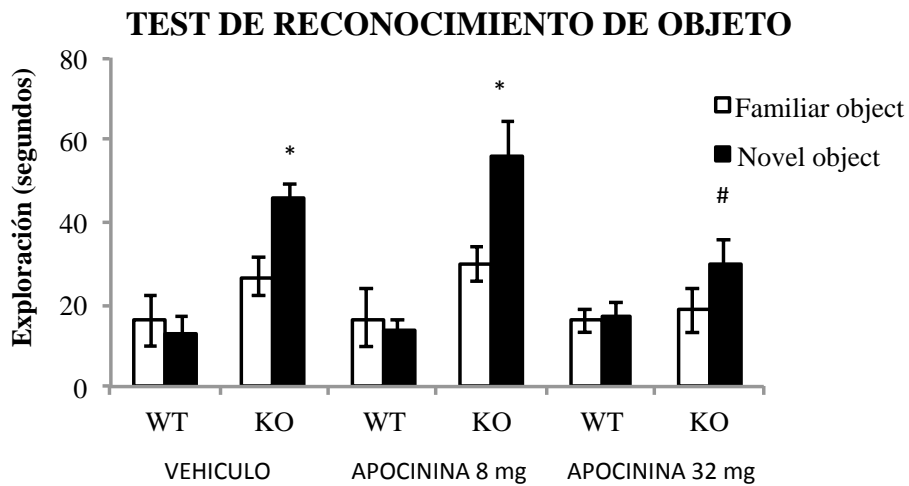
condicionado que es el sonido. El porcentaje del tiempo en el que el animal esta inmobilizado (*freezing*) una vez que se pone con el estímulo condicionado pasado un tiempo desde el entrenamiento, es proporcional a la capacidad de aprendizaje del animal. La ausencia de FMRP impide el condicionamiento o aprendizaje al miedo contextual inducido y el tratamiento crónico con apocinina mejora los déficits del aprendizaje que se observan en el ratón nulo para el gen *Fmr1*.

En la figura 41 A se muestra que en el caso de tratamiento con el vehículo hay diferencias significativas ($*p < 0.05$ *Fmr1*-KO versus WT-control), en el tiempo de exploración del nuevo objeto que es mayor en el grupo *Fmr1*-KO que en el grupo WT-control, al igual que ocurre en el caso del tratamiento con 8 mg/kg/día donde las diferencias son mayores siendo también significativas ($*p < 0.05$ *Fmr1*-KO versus WT-control).

En el tratamiento crónico con mayor cantidad de apocinina (32 mg/kg/día) se demuestra que las diferencias desaparecen y que por lo tanto el comportamiento *Fmr1*-KO se normaliza al mostrado por el control-sano, haciéndose notar esto como una mejoría en la memoria a corto plazo y en la ansiedad asociada a la aparición de un nuevo objeto. Además se observan diferencias significativas entre el grupo *Fmr1*-KO tratado con 32 mg/kg/día de apocinina respecto a lo observado en el tratamiento con el vehículo.

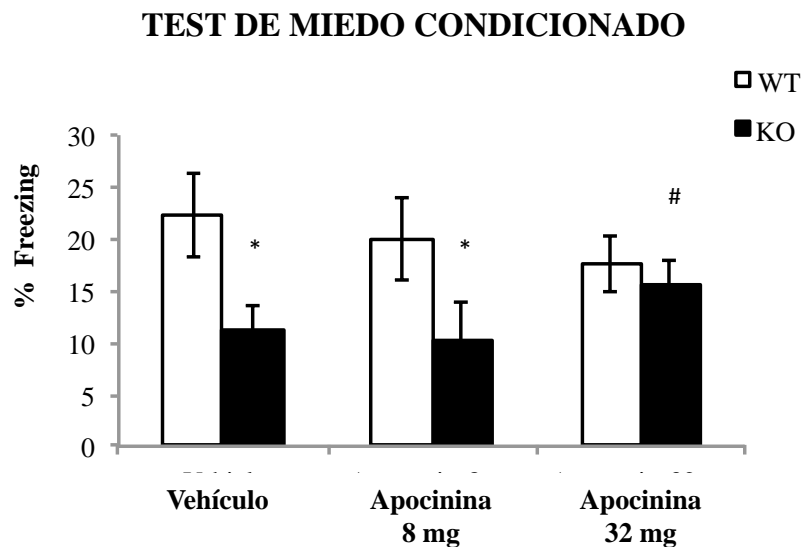
En la figura 41 B se observa que el tratamiento con 8 mg/kg/día hay diferencias significativas entre el comportamiento de los ratones *Fmr1*-KO y los ratones controles del grupo ($*p < 0.05$ *Fmr1*-KO versus WT-control), por consiguiente no hay mejoría en el aprendizaje con la aplicación de una dosis pequeña de apocinina. Sin embargo, los ratones nulos para la proteína FMRP que han sido tratados con la dosis mayor de apocinina 32 mg/kg/día tienen un comportamiento similar a lo mostrado por los ratones sanos de su grupo control, así como que muestran diferencias significativas con los ratones *Fmr1*-KO de vehículo ($\# p < 0.05$ *Fmr1*-KO tratado versus vehículo).

A



*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT
#p< 0.05; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo.

B



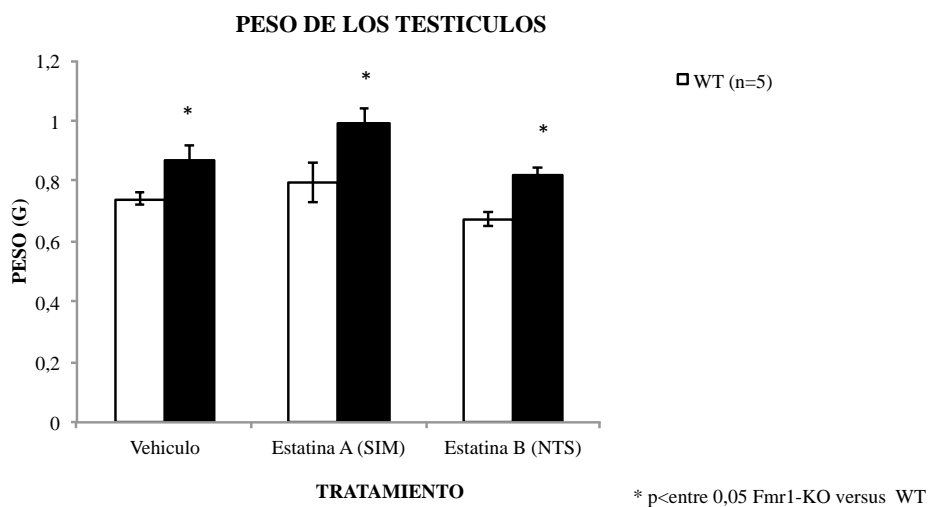
*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT
#p< 0.05; Fmr1-nulo tratado vs. vehículo.

Figura 41. Reconocimiento de objeto y miedo condicionado. A) Los animales tratados con una dosis alta de apocinina muestran una reducción en el tiempo que pasan explorando el objeto nuevo en referencia con los ratones Fmr1-KO vehículos (# p<0.05 Fmr1-KO tratado versus vehículo). (Media del tiempo de exploración del objeto \pm SEM; n=8-10). B) Los animales del grupo Fmr1-nulos tratados con 32 mg/kg/día muestran una disminución en la respuesta al miedo condicionado “freezing” en relación al grupo WT-control; así como diferencia a lo ocurrido en el caso de los Fmr1-KO de vehículos. Los varones representan la media del porcentaje del tiempo en *freezing* \pm SEM; n=8-10. (*p<0.05 Fmr1-KO versus WT-control; #p< 0.05 Fmr1-nulo tratado versus vehículo).

TRATAMIENTO AGUDO CON ESTATINAS

1. MANTENIMIENTO DEL MACROORQUIDISMO TRAS EL TRATAMIENTO AGUDO CON ESTATINAS

Una vez terminado el tratamiento agudo con dos estatinas (SIM y NTS), que serán referidas a lo largo de los resultados como estatina A (SIM) y estatina B (NTS) ya que ambas son partes de un estudio realizado en colaboración con la empresa NeuronBio y están bajo acuerdo de confidencialidad. Los ratones fueron sacrificados y sus testículos pesados para ver si se ha revertido el macroorquidismo que es una de las características fenotípicas de los ratones Fmr1-KO. Según se indica en la figura 42 tanto para los grupos de ratones a los que se le suministraron el vehículo, como las dos estatinas por separados se encontró que el peso de los testículos de Fmr1-KO tienen un peso significativamente mayor en que su WT (*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT).

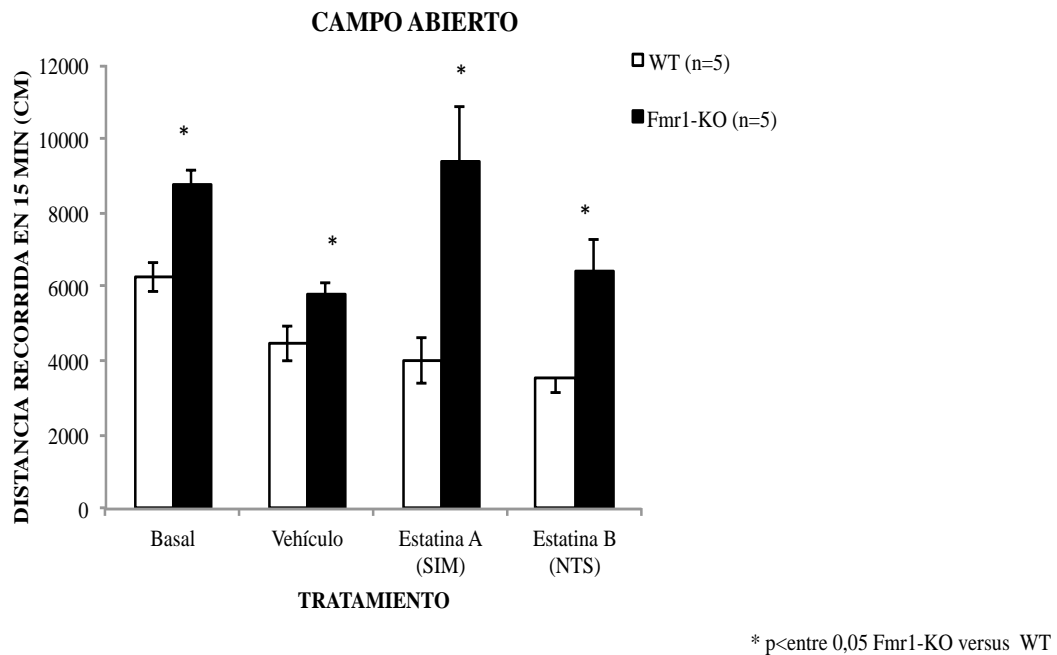


Tratamiento	WT (n=5)	Fmr1-KO (n=5)	SEM WT	SEM KO	P Value
Vehículo	0,741	0,868	0,021	0,053	0,037
Estatina A (SIM)	0,793	0,992	0,067	0,045	0,039
Estatina B (NTS)	0,673	0,823	0,022	0,018	0,01

Figura 42. Pesos de los testículos de los ratones tras el tratamiento agudo con estatinas no normaliza una de las alteraciones fenotípicas (macroorquidismo) descritas en modelo de ratón FMR1-KO. Se muestra el peso medio del grupo \pm SEM (Media del peso \pm SEM; n=5. (*p<0.05 entre Fmr1-KO versus WT)

2. NINGUNO DE LOS TRATAMIENTOS CON ESTATINAS MEJORA LA HIPERACTIVIDAD.

La hiperactividad es uno de las conductas que se ha encontrado asociada al SXF, está puede ser medida mediante la prueba del campo abierto que resulta ser una prueba donde se mide la distancia recorrida por el ratón durante 15 minutos en un laberinto campo abierto. En la figura 43 se expresan los resultados de los ratones una vez que han pasado el tratamiento agudo con estatinas y vehículo. En todos los casos, el comportamiento hiperactivo del ratón se mantiene sin que haya ninguna estabilización del comportamiento nulo con el que se da en ratones sanos. Se ve que hay diferencias significativas en la distancia recorrida por los ratones Fmr1-KO y sus correspondiente WT (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control).



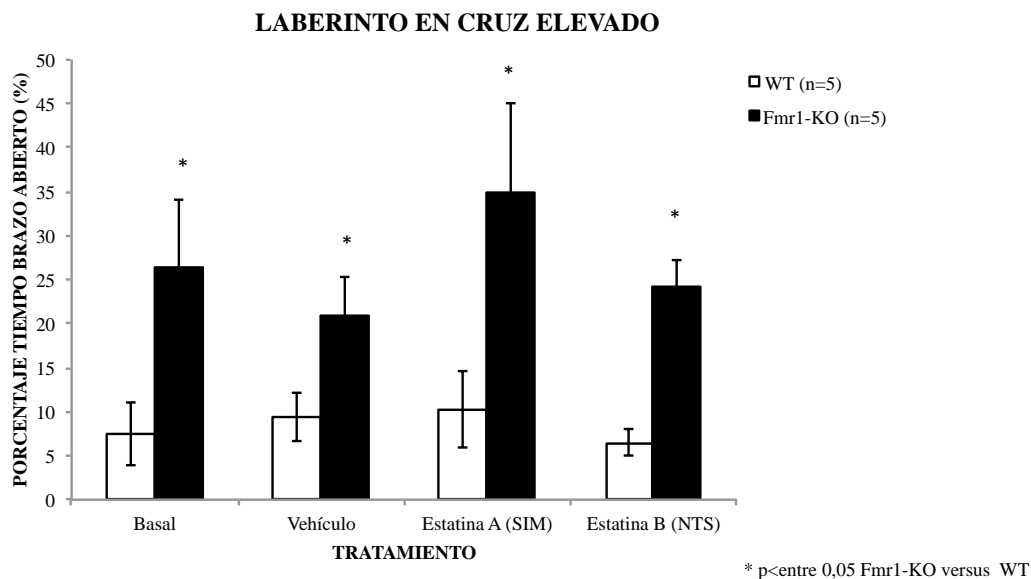
Tratamiento	WT (n=5)	Fmr1-KO (n=5)	SEM WT	SEM KO	P Value
Basal	6277	8759	402	407	0,002
Vehículo	4475	5824	477	302	0,042
Estatina A (SIM)	4028	9363	629	1500	0,005
Estatina B (NTS)	3540	6403	398	905	0,043

Figura 43. Distancia recorrida en el campo abierto durante 15 minutos tras el tratamiento agudo con estatinas no normaliza las alteraciones en la locomoción (hiperactividad) descritas en modelo de ratón FMR1-KO. Los datos son descrito como la media de la distancia recorrida en centímetro por cada grupo de ratones y tratamiento \pm SEM (n=5) (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control).

3. NINGUNO DE LOS TRATAMIENTOS CON ESTATINAS MEJORA LA ALTERACIÓN EN LA RESPUESTA ANSIOSA

Después del tratamiento agudo de ratones sanos y Fmr1-KO con estatinas, se le realizó unas series de pruebas comportamentales para saber si hay mejoras en el estado comportamental por la aplicación de estas moléculas.

La mejor prueba para diagnosticar el estado ansioso del ratón es el laberinto en cruz elevado (*plus maze*), tal como se ha ido evidenciado a lo largo de este trabajo de tesis. En la figura 44 se muestran los resultados en el laberinto en cruz después del tratamiento, advirtiéndose que no hay mejoría en ningunos de los tratamientos ya que en todos ellos aparecen diferencias significativas entre el ratón Fmr1-KO y WT (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT) sin llegar a estabilizarse en ningún caso el comportamiento del ratón nulo.



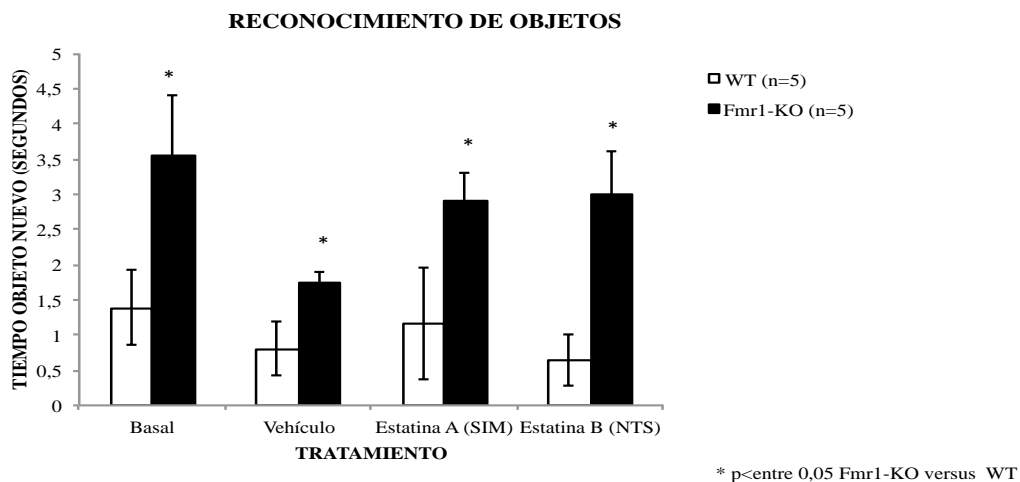
Tratamiento	WT (n=5)	Fmr1-KO (n=5)	SEM WT	SEM KO	P Value
Basal	7,4	26,3	3,6	7,7	0,04
Vehículo	9,3	20,81	2,73	4,57	0,042
Estatina A (SIM)	10,25	35	4,32	10	0,032
Estatina B (NTS)	6,4	24,1	1,5	3	0,002

Figura 44. Resultados del comportamiento en laberinto en cruz tras el tratamiento agudo con estatinas no normaliza las alteraciones en la respuesta ansiosa descritas en modelo de ratón FMR1-KO. Los resultados mostrados son la media del porcentaje del tiempo que los ratones en el brazo abierto (Media del porcentaje \pm SEM; n=5) (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT).

4. EL APRENDIZAJE NO MEJORA CON EL TRATAMIENTO AGUDO CON ESTATINAS

Los ratones Fmr1-KO, tal como se ha referido en la introducción de esta tesis doctoral, tienen graves problemas de aprendizaje. Este fenotipo concuerda con la deficiencia cognitiva que tienen los pacientes con SXF. Para analizar si hay mejoría en el aprendizaje tanto asociativo como no asociativo se desarrollan dos pruebas, la prueba del reconocimiento de objetos (figura 45) y la prueba del miedo condicionado (figura 46).

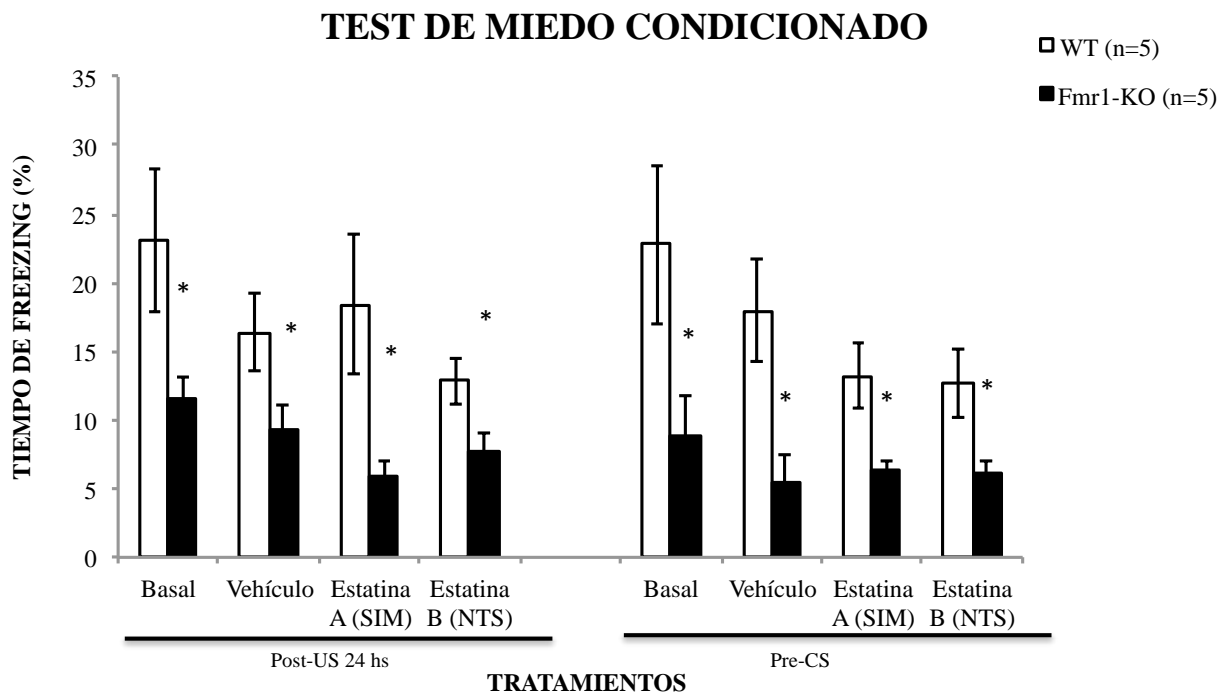
En la figura 45 se puede ver como en ninguno de los tratamientos con estatinas en el ratón Fmr1-KO hay mejoría en el comportamiento. Todos los ratones nulos para FMRP tienen diferencias significativas en el tiempo de permanencia en el objeto nuevo respecto a lo que muestran sus congéneres, los ratones WT-controles (* $p < 0.05$ entre Fmr1-KO versus WT).



Tratamiento	WT (n=5)	Fmr1-KO (n=5)	SEM WT	SEM KO	P Value
Basal	1,39	3,56	0,53	0,85	0,002
Vehículo	0,8	1,75	0,38	0,13	0,042
Estatina A (SIM)	1,17	2,9	0,8	0,4	0,005
Estatina B (NTS)	0,64	3	0,36	0,6	0,043

Figura 45. En la prueba de reconocimiento de objetos tras el tratamiento agudo con estatinas no normaliza las alteraciones en aprendizaje descritas en modelo de ratón FMR1-KO. Los resultados que se muestran son la media del tiempo de exploración por grupo y tratamiento (n=5) (* $p < 0.05$ Fmr1-KO versus WT-control).

Añadiéndose a todo lo indicado, en la figura 46 se muestra que el tiempo de inmovilización (*freezing*) de los ratones Fmr1-KO es siempre, independientemente del tratamiento aplicado, significativamente menor que en los ratones control-WT. Los ratones sin la proteína FMRP muestran deficiencia en la asociación tanto del estímulo incondicionado como condicionado lo que demuestra una deficiencia en el aprendizaje aversivo.



* p<entre 0,05 Fmr1-KO versus WT

Figura 46. En el análisis del aprendizaje por el test del miedo condicionado, tras el tratamiento agudo con estatinas no normaliza las alteraciones en aprendizaje del miedo condicionado en modelo de ratón FMR1-KO. Los resultados indican la media del porcentaje de tiempo de inmovilización “freezing” ± SEM (n=5) (*p<0.05 Fmr1-KO versus WT-control).

DISCUSIÓN



ESTRÉS OXIDATIVO Y METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN EL SÍNDROME X FRÁGIL.

Como hemos ido hablando a lo largo de esta tesis doctoral, las especies reactivas de oxígeno (ROS) están relacionadas con la etología de diferentes desordenes del neurodesarrollo, incluido el SXF. El cerebro tiene una alta tasa de consumo de oxígeno (casi el 20 % de lo que el corazón libera). Al mismo tiempo, se ha observado que en comparación con otros órganos (pulmones, hígado, etc) contiene relativamente bajos niveles de antioxidantes (tanto enzimáticos como no enzimáticos) y posee una alta cantidad de lípidos insaturados que son más susceptibles de oxidación en situaciones de estrés oxidativo (Abdel Moneim EA, 2012).

Aunque existen otras fuentes de ROS en la célula, se ha visto que las enzimas NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS) son aquellas que tienen un mayor protagonismo en el sistema nervioso, pues los radicales que generan funcionan fisiológicamente en transmisión rápida de mensajes entre células. Gran cantidad de evidencias sugieren que la activación de NADPH oxidasa y la expresión de NOS están directamente unidas a la generación de alta cantidad de radicales libres que afectarán a importantes componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas). El estrés oxidativo puede derivar en problemas de ansiedad, problemas de sueño (Corella C, 2006) y autismo, todos estas son características mostradas por pacientes con SXF (Bechara EG y col., 2009).

En esta tesis doctoral se ha demostrado que los ratones nulos para FMRP (Fmr1-KO) desarrollan un alteración en la homeostasis del óxido nítrico (NO) en adultos. NO es un mensajero molecular que participa en algunos mecanismos fisiopatológicos en el cerebro. Los primeros estudios llevados a cabo por nuestro grupo encontraron que en el ratón Fmr1-KO hay una alta cantidad de ROS, junto con activación de la enzima NADPH oxidasa, y un moderado incremento del estrés oxidativo en el cerebro de individuos jóvenes que sería una manifestación patológica del síndrome (el Bekay R y col., 2007).. Es más, varias formas de daño neuronal están frecuentemente asociadas con un incremento o una alta expresión *de novo* de iNOS (Leist M & Nicotera P, 1998)

La producción excesiva de NO ha sido identificada como una de las mayores causas de la patogénesis de numerosas enfermedades neurodegenerativas (Yuste JE y col., 2015) En base a diversos experimentos realizados sobre animales, el NO ha estado implicado en el mecanismo molecular de los ataques epilépticos, con un rango amplio de actuación que va desde ser mediador en las cascadas de excitotoxicidad, a la modulación del flujo sanguíneo en el cerebro durante los episodios epilépticos, y finalmente en la participación en el daño neuronal severo (Vanhatalo S & Riikonen S, 2000; Herberg LJ y col., 1995). El radical libre NO está muy bien estudiado como un mediador fisiológico en el cerebro donde juega un papel importante en el LTP, plasticidad sináptica y modificaciones en las redes neuronales (Edelman GM & Gally JA, 1992; Mongin AA y col., 2012; Lu y col., 2015). Así como la acumulación de NO actúa como elemento ansioso, ya que se ha visto que su síntesis, vía activación del receptor TRPV1 en rata, podría estar relacionada con el comportamiento ansioso que tienen las ratas en el laberinto en cruz elevado (Batista PA y col., 2015).

Durante el incremento patológico de la producción de NO, muchas de las moléculas NO sintetizadas darán lugar a peroxinitrito al asociarse con peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual es un potente radical libre ($H_2O_2 + NO_2^- \rightarrow ONOO^- + H_2O$) (Theard MA y col., 1995). Esta sustancia interfiere con el metabolismo energético de las mitocondrias e incluso podría provocar la muerte de las neuronas por necrosis o apoptosis (Vanhatalo S & Riikonen R, 2001). En un estudio llevado a cabo con ratas donde se le induce demencia vascular mediante hipertensión se ha mostrado como una combinación del inhibidor de la iNOS y un inhibidor de la NADPH oxidasa podría ser considerado como tratamiento potenciales de la demencia vascular, enfermedad que se caracteriza por tener relación con deficiencia en el aprendizaje y memoria (Sharma B & Singh N, 2013). Con nuestros resultados y los presentados por otros investigadores se puede proponer que la inhibición de la síntesis de NO provocado por el exceso de ROS producido por la NADPH-oxidasa como un posible mecanismo citoprotectivo que controlaría las consecuencias negativas del aumento de las moléculas oxidadas en la fisiología celular, lo cual se podría extrapolar al SXF, ya que se ha demostrado ampliamente la influencia del estrés oxidativo en la fisiopatología del síndrome.

La 3-nitrotirosina (resultado de la nitrificación de los residuos de tirosinas de una proteína) puede ser un marcador de estrés oxidativo y nitrogenado (Ischiropoulos, H, 1998). Se ha observado como los derivados de nitrógeno oxidado modifican las tirosinas (formando a 3-nitrotirosina) de ciertas proteínas relacionadas con las enfermedades arteriales tales como apolipoproteína A-1 (apoA-1), apolipoproteína B-100 (apoB-100) y fibrinógeno (Thomson L, 2015). Resulta interesante ver que el aumento de los niveles de las proteínas nitradas y 3-nitrotirosina han sido asociadas a una variedad de enfermedades neurodegenerativas así como la enfermedad de Parkinson (Ischiropoulos, H & Beckman, J.S, 2003). De la misma manera que una reducción en la producción de 3-nitrotirosina por magnolol, puede tener un efecto neuroprotectivo en ratas (Chen JH y col., 2014). En los resultados mostrados por esta tesis, se ven que los niveles de 3-nitrotirosina están significativamente elevados en homogenados de corteza, cerebelo e hipocampo de Fmr1-KO, tanto de 3 y 6 meses de edad, cuando se comparan con WT-control. Se considera que la presencia de 3-nitrotirosina es un posible marcador de la producción de ROS y nos sirve para confirmar los resultados obtenidos anteriormente; en concordancia con los resultados previos publicados por otros grupos que estudian del óxido nítrico (Yamaguchi M y col, 2015).

En las células de mamíferos, hay tres tipos de óxido nítrico sintasa (NOS) que son: óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS-NOS1), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS-NOS2) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS-NOS3) que son responsables de la producción de NO desde el amino ácido arginina (Martinez-Ruiz A y col., 2011). La acción patológica de nNOS fue descrita recientemente, en referencia a la enfermedad de Parkinson se demuestra el papel de NF- κ B en la inducción de la síntesis de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) durante la activación temprana de los astrocitos en el proceso de inflamación (Carbone DL y col., 2008). nNOS participa en numerosas formas de plasticidad incluyendo el aprendizaje asociado al hipocampo y memoria, plasticidad neuronal de la corteza y LTP de hipocampo y neocortical (Dachtler J y col., 2012). nNOS está predominante activa en el sistema nervioso central y periférico, donde la producción de NO es importante para la comunicación entre las células (Nelson EJ y col., 2003). nNOS produce de forma estable baja concentraciones de NO a largo plazo y son activadas por iones de calcio (Ca^{2+}) a través de la unión transitoria a proteínas ligadoras de calcio como la calmodulina. Los

resultados presentados aquí demuestran que hay niveles relativamente bajo de mRNA de nNOS en los ratones Fmr1-KO de 3 y 6 meses de edad en cerebelo, hipocampo y corteza prefrontal. Además, se sugiere que la expresión atenuada de nNOS probablemente da como resultado una baja regulación de la producción de NO en Fmr1-KO. En nuestro estudio la producción de NO fue significativamente baja en el ratón Fmr1-KO adulto en contraste con WT-control, en todas las áreas cerebrales estudiadas. Esta deficiencia probablemente resulta en una inadecuada producción de NO durante el desarrollo del sistema nervioso, nNOS se diferencia de iNOS porque la primera está finamente regulada por la calmodulina (CAM) activada por calcio, fosforilación específica de la proteína e interacción con receptores ionotrópico de membrana (Morita A y col., 2006). Esta regulación fina de los procesos mediados por NO tanto de formación como de reducción de los niveles, hacen que NO funcione como una señal molecular que puede regular procesos fisiológicos importantes tales como la plasticidad neuronal y la diferenciación de las células progenitoras en el sistema nervioso central (Peunova N & Enikolopov G, 1995).

La supresión de la expresión de los genes de nNOS ha sido atribuida a una alta cantidad de citoquinas liberadas durante la inflamación (Bandyopadhyay A y col., 1997). También se ha hecho referencia a que la cantidad de NO producido por iNOS puede ser dependiente de la cantidad de su sustrato, L-Arginina (L-Arg). L-Arg es el único sustrato nitrogenado endógeno de las distintas isoformas de NOS, y por lo tanto regula la producción de NO durante el desarrollo del sistema nervioso, así como a algunos estados de las enfermedad de esclerosis múltiple y la enfermedad de Parkinson (Lee J y col., 2003). Aún más, se ha sugerido que el NO derivado de nNOS mantiene reprimida a la enzima iNOS bajo condiciones normales, la regulación de nNOS es necesaria para facilitar la expresión de iNOS y por tanto la liberación transitoria de altas cantidades de NO que pueden ser requeridas en momentos puntuales en la fisiología normal del sistema nervioso (Bandyopadhyay A y col., 1997).

Investigaciones recientes han demostrado como los ratones que no expresan NOS1-nNOS (NOS1-KO) exhiben una alta actividad locomotora en un nuevo ambiente cuando son comparados con su WT-control, esta actividad fue medida en el laberinto de campo abierto. Hiperactividad locomotora comparable a la que se ha demostrado

ampliamente en el ratón Fmr1-KO. También muestran una baja latencia cuando son sometidos a un test modelo de evitación pasiva. Además los animales NOS1-KO muestran una actividad motora espontánea anormal durante la fase de oscuridad del día, lo que nos indica una falta de la actividad rítmica y problemas en el ciclo vigilia/sueño. Estos datos mostrados por el ratón NOS1-KO se mimetizan a cierto comportamiento del ADHD (Gao Y y col., 2015). Estas mismas alteraciones han sido ampliamente demostradas en ratones Fmr1-KO, donde se ve que manifiestan hiperactividad, déficit de atención y aprendizaje que podría estar relacionado con una reducción en la expresión de nNOS y en la producción basal óxido nítrico que se ha demostrado en este trabajo.

Muchas de las patologías cerebrales están acompañadas de un proceso inflamatorio durante la cual se produce NO (principalmente desde iNOS) y/o superóxido (O_2^-) más peróxido de hidrógeno, H_2O_2 (proveniente desde NADPH-oxidasa) (Mander P & Brown GC, 2005). La enzima iNOS juega un papel clave en la producción de NO seguida a la estimulación inflamatoria, esto tiene un importante rol en la regulación de la respuesta inmune y la producción de NO tiene un efecto virtual en la progresión de la inflamación (Guzik y col., 2003). La iNOS no se expresa de forma estable constitutiva en el cerebro, pero mediadores inflamatorios tales como LPS y citoquinas activan su expresión en la microglía y astrocitos, y puede ser que también lo hagan en neuronas (Brown GC & Neher JJ, 2010; Pinheiro LP y col., 2015). Ciertamente, esto concuerda con lo que se muestra en los resultados ya que se ha visto un incremento en la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa iNOS, en ratones Fmr1-KO comparada con lo mostrado en ratones WT jóvenes y adultos en las tres áreas cerebrales estudiadas.

Este trabajo doctoral demuestra la expresión anormal diferencial de nNOS e iNOS medida por PCR a tiempo real (RT-PCR) en el modelo animal de Fmr1-KO. Pero en este estudio no hemos encontrado ninguna diferencia apreciable en la isoforma eNOS. Esta isoforma produce NO principalmente en el tejido endotelial de los vasos sanguíneos, donde NO actúa como vasodilatador y favorece a la relajación endotelial de los músculos y tejido suave (Knott A.B y col., 2009). Estas funciones no se han descrito que estén alteradas en el ratón Fmr1-KO ni en los pacientes.

Los niveles de estrés nitrooxidativo son significativamente alto en personas con ID tal como Síndrome de Down y Síndrome de West (Carmeli E y col., 2012). Nuestros resultados muestran coherencia con lo que se publica anteriormente. Una publicación previa sugiere que nNOS está reducida en el hipocampo de ratones de Fmr1-KO p21 (21 días de edad) y se encuentra una deficiencia en la producción de NO lo que podría retrasar la maduración de las espinas dendríticas en el SXF (Xu Q y col., 2012). Se ha encontrado que los niveles neocorticales de la proteína nNOS están reducido severamente en la etapa embrionaria en SXF. Así la alteración en la regulación de nNOS en los circuitos cerebrales podrían contribuir a la disfunción cognitiva mostrada en el SXF (Kwan KY y col., 2012).

Para concluir hay que advertir que la regulación tanto de iNOS y nNOS podría jugar un papel fundamental en las rutas fisiopatológicas que contribuyen al SXF. La regulación específica de la expresión y actividad de iNOS, nNOS y NF- κ B se sugiere como fundamental en el proceso neurofisiológico. Muchas enfermedades mentales e inflamatorias están relacionadas a NF- κ B, sin embargo, restablecer el estado de óxido nítrico/nitrotirosina en el modelo de ratón de SXF podría proponerse como una posible vía para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el SXF. Expuesto lo cual, la expresión anormal de NOS observada en el cerebro de ratón Fmr1-KO, liderada por cambios en el metabolismo de NO, nitrificación de proteínas y activación de NF- κ B podría estar involucrada en la patogénesis del retraso intelectual en el SXF y podría representar una nueva diana terapéutica para esta enfermedad rara.

RAC 1 EN EL SÍNDROME X FRÁGIL.

TRATAMIENTO CON EL INHIBIDOR DE RAC1

Las propiedades funcionales de la proteína FMRP han sido extensamente estudiadas, pero el mecanismo de acción y las rutas bioquímicas o de señalización involucradas en la discapacidad intelectual están todavía bajo investigación en numerosos laboratorios. El principal descubrimiento en este apartado es que el cerebro de ratones Fmr1-KO y especialmente las áreas cerebrales estudiadas (corteza prefrontal, hipocampo y cerebelo) muestran una alta tasa de activación de la enzima Rac1-GTPasa comparando con lo observado en muestras de WT-control. La

sobreactivación de Rac1-GTPasa podría estar detrás del incremento en la densidad de espinas dendríticas detectado en el cerebro de ratones nulo.

Castets y colaboradores muestran como es el ensamblaje de algunos complejos que tienen dentro de su estructura a FMRP, donde hay modulación por Rac1 (Castets M y col., 2005). No obstante, hasta el día de hoy, ningún estudio ha enseñado como se establece estas interacciones en las neuronas y como las uniones están alteradas en el SXF. La unión de Rac1-GTPasa a ciertas proteínas podrían ser participé de las estructuras sinápticas, la morfología y la densidad de las espinas dendríticas, y conducir a una deficiencia en la plasticidad neuronal, base del discapacidad intelectual.

Tal como hemos ido diciendo a lo largo de esta tesis, el producto del gen *Fmr1* (FMRP) tiene una alta expresión en el cerebro. Es una proteína implicada en el transporte y regulación de la traducción de mRNAs, una gran cantidad de ellos importantes para la función sináptica (Jin & Warren y col., 2000). Feng y colaboradores lo explicaron, en animales, en 1997 (Feng y col., 1997); a pesar de que las primeras observaciones en humanos fueron llevadas a cabo por el grupo de Devys en fechas anteriores (Devys y col., 1993). En las neuronas la proteína FMRP no sólo está localizada en la región perinuclear sino que también se encuentran en dendritas y espinas dendríticas (Kaufmann WE y col., 2002).

El déficit en la regulación del citoesqueleto se cree que está implicado en la alteración en la morfología de las espinas dendríticas de los pacientes con discapacidad intelectual, junto a irregularidades en las estructuras de contacto entre células neuronales, . La desregulación del citoesqueleto de actina que afecta tanto a la forma como a la maduración, se cree que puede ser causante del discapacidad intelectual (Newey SE y col., 2005). En apoyo de esta idea muchos estudios dan evidencias de como alteraciones en las señales de la familia Rho GTPasa (reguladores claves del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos) contribuyen a la deficiencia mental, ya que se ha mostrado que Rac1-GTPasa juega un papel tanto el desarrollo y morfología de las dendritas y de sus espinas (Govek EE y col., 2005).

Las regiones cerebrales estudiadas (cerebelo, corteza prefrontal e hipocampo) son en las que se han descrito un mayor número de alteraciones en el SXF. FMRP está ampliamente expresada en el cerebro, incluyendo cerebelo, hipocampo y corteza durante las primeras semana de nacimiento (Till SM y col., 2015). Por otra parte, ratones sin la proteína FMRP muestran una ruptura en la potenciación a largo plazo (LTP), dependiente de NMDAR, en el giro dentado del hipocampo (Ghilan M y col., 2015). De hecho, estudios en los mecanismos moleculares que subyacen a la problemática cognitiva del SXF han puesto su foco en la función de los receptores glutamatergicos (tanto metabotrópico como ionotrópico), y recientemente en la actuación de los receptores GABAérgicos en la función sináptica de varias regiones cerebrales (Bear y col., 2004). La plasticidad sináptica en relación con la potenciación/depresión a largo plazo está altamente afectada en cerebelo, corteza e hipocampo (Meredith RM & Mansvelder HD, 2010). En la corteza, la ausencia de FMRP resulta en una reducción de la potenciación a largo plazo (Wilson BM & Cox CL, 2007). Mientras que en el hipocampo y cerebelo de ratones *Fmr1-KO*, hay un aumento de la depresión a largo plazo asociada a los receptores metabotrópico de glutamato (mGluR) debido a un incremento de la internalización de los receptores AMPA (Nosyreva ED & Huber KM, 2006).

En los resultados de este trabajo mostramos como Rac1 tiene mayor activación en extractos de ratones *Fmr1 KO* en comparación con ratones WT-control. Vemos que es en los extractos de corteza prefrontal donde hay más proteína unida a GTP, forma activa de la proteína. Un efecto de la hiperactividad de Rac1 podría ser la alteración en la liberación de neurotransmisores en ratones *knock-out* para *Fmr1*, provocando un cambio en la homeostasis de neurotransmisión. Los ratones *Fmr1-KO* poseen cambios en los niveles de neurotransmisores (Gruss M & Braun K, 2004); habiendo asociaciones, descritas en publicaciones previas, donde se observa relación de la liberación de neurotransmisores con Rac1-GTPasa y como Rac1-GTPasa forma complejos con FMRP (Bardoni B & Mandel JL, 2002).

Las GTPasas de la familia Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42) son muy importantes para el desarrollo cognitivo normal, tal como se ha demostrado por la ubicuidad de Rac1 y de Rac3-GTPasa neuronal así como su implicación en la formación de las espinas dendríticas (Newey SE y col., 2005). Trabajos recientes han evidenciado el papel

central de proteínas Rac en el desarrollo de las interneuronas inhibitorias GABAérgicas, elementos moduladores muy importantes en los circuitos cerebrales. Disfunción en neuronas de la corteza e hipocampo son observadas en diversas enfermedades neurológicas, bien caracterizadas con deficiencias cognitivas (Corbetta S y col., 2008). Estudios previos muestran una alteración significativa de la inhibición GABAérgica en diferentes áreas cerebrales del ratón Fmr1-KO, sugiriéndose de esta manera una posible relación de las anomalías de Rac1-GTPasa con los problemas comportamentales mediado por la reducción del neurotransmisor GABA observada en el modelo de ratón de SXF (Curia G y col., 2009).

Modelos de ratón nulos para la proteína Rac3 han mostrado un comportamiento hiperactivo cuando se le muestran un nuevo estímulo, medido en el test de reconocimiento de objeto (Corbetta S y col., 2008). Lo mismo ocurre en animales Fmr1-KO, se puede pensar que la proteína Rac1 podría estar implicada en la patología del SXF. En un estudio reciente, se ha descrito que drogas psicoactivas efectivamente restauran el trastorno cognitivo en los ratones Fmr1-KO a través del sistema Ras-PI3K/PKA (Lim CS y col., 2014). Sugiriendo que dosis muy bien estudiadas y combinadas de drogas psicoactivas podría tratar de forma efectiva el SXF.

En concordancia con nuestros datos se ha descrito que la ruta de señalización de Rac1 está implicada en el aprendizaje (Haditsch U y col., 2009), también como en algunas formas de desordenes cognitivos y síndromes de discapacidad intelectual asociado al cromosoma X (Ramakers GJ y col., 2012; von Bohlen Und Halbach O, 2010). Además, otros investigadores muestran que la activación de Rac1 es elevada en los ratones de Fmr1-KO sugiriendo que la proteína FMRP podría tener una función de regulador negativo de Rac1, resultados que se ajustan con lo observado para Rac1 en ratones Fmr1-KO. Por lo tanto FMRP mantiene los niveles óptimos de Rac1 y facilita la reorganización del citoesqueleto, haciendo que las espinas dendríticas tengan una morfología normal que permite una plasticidad neuronal adecuada (Bongmba OY y col., 2011).

Diversos trabajos con inhibidores de Rac1, ayudan al conocimiento de la actuación de esta GTPasa en el tráfico proteico de las neuronas. El uso del inhibidor NSC23766 provoca un aumento de las proteínas sAMPArs (proteínas relacionadas con el tráfico de los receptores AMPA) además no afecta a la morfología neuronal (Gao Y y col.,

2004). La activación de Rac1 es requerida para el tráfico constitutivo de receptores glutamérgicos de tipo AMPA, dándonos una posible base fisiopatológica para el aumento de la internealización de AMPA en el SXF. Además, la actividad de Rac1 está relacionada con la fisiología del tejido conectivo (van Lent PL y col., 2005), explicando la aparición de los síntomas periféricos, tales como articulaciones hiperextensivas o prolapso en la valvula mitral que exhiben los pacientes con Síndrome X Frágil (Davids JR et al, 1990).

Es interesante hacer mención que TIAM1 (proteína activadora de Rac1) interactúa con el receptor de NMDA, así como regula la formación de espinas dendríticas dependiente del receptor glutamérgico de tipo NMDA. Su actuación en la formación y crecimiento del árbol de espinas dendríticas es a través de su función activadora de Rac1, importante para la remodelación del citoesqueleto de actina en dendritas y el desarrollo de las espinas dendríticas (Tolias KF y col., 2005). La creación de ratas nulas para TIAM1 mediante RNA de interferencia provoca una reducción en la arborización y densidad de las espinas dendríticas (Toilas KF y col., 2005; Toilas KF y col., 2007). Esta relación entre TIAM1 y la formación de espinas dendríticas dependiente del receptor de NMDA podría explicar en parte las anomalías observadas en el receptor del glutamato y la morfología inmadura de las espinas dendríticas descritas en el Síndrome X Frágil.

Otro papel de la ruta TIAM1/Rac1 fue recientemente descrito, ya que se ha visto que juegan un papel crítico en la regulación por parte de los receptores de NMDAR de los precursores celulares de oligodendrocitos (OPCs) activando la migración neuronal en el desarrollo del sistema nervioso central (CNS). La activación de los receptores NMDAR da lugar a una cascada de activación de TIAM1/Rac1/ERK que median en el efecto de la migración de OPCs. Definiéndose, por consiguiente, un mecanismo molecular por el cual el receptor controla el crecimiento y morfología del árbol dendrítico y de las espinas (Xiao L y col., 2013). Tal como se muestra en nuestros resultados, los ratones Fmr1- KO tienen una mayor cantidad de proteína ERK-1 fosforilada, forma activa de la proteína, respecto a lo encontrado en ratones sanos-control. Estos resultados se relacionan perfectamente con lo mostrado para Rac1-GTPasa. Estableciéndose la relación entre la activación de Rac1 y la fosforilación

detectada en la proteína ERK, que sería un componente de la cascada de traducción de señales mediada por proteínas de la familia MAPkinasas.

De hecho, diversos estudios establecen que la relación entre Rac1 y ERK regulan al citoesqueleto de las células y a todas las estructuras relacionadas con él. Un estudio sobre fibroblastos embrionarios de ratón carente de la proteína Rac1, enseña como estas células nulas muestran una formación incorrecta de los lamelopodios (estructuras similares a las espinas dendríticas), así como la adhesión focal. La delección de Rac1 en estas células concretas provocan una reducción en la fosforilación de moléculas de señalización incluyendo entre ellas a ERK (Guo F y col., 2006). Además se ha visto que la aplicación de melatonina tiene un efecto anti-migratorio mediante el bloqueo de la activación de Rac1/ERK (Yang L y col. 2014) anteriormente se había demostrado que los tratamientos crónicos con melatonina en el modelo FMR1-KO y en los pacientes son capaces de mejorar la sintomatología propia del Síndrome X frágil (Romero Zerbo Y et al 2009; Wirojanna et al 2009).

Otras publicaciones han demostrado que el tratamiento tanto *in vivo* como *in vitro* con NSC23766, un compuesto inhibidor específico de la proteína Rac1, parece mejorar la morfología de las espinas dendríticas, disminuyendo el número de espinas inmaduras así como mostrando una acción positiva en la memoria de extinción y el LTP alterado por altos niveles de Rac1 (Gao Y y col., 2004 ; Sananbenesi F y col., 2007; Bongmba OY y col., 2011). Esto nos ayuda a comprender como la inhibición específica de Rac1 en el SXF reestructura la forma de las espinas dendríticas y su arborización, tal como hemos mostrado en los resultados de esta tesis doctoral, y podría estar detrás de la mejora demostrada en comportamiento del ratón Fmr1-KO.

Dada la importancia de esta diana terapéutica se ha publicado un estudio pormenorizado sobre los diferentes inhibidores de la Rac1. La estrategia inicial de búsqueda de los inhibidores se basó en la información que daba la estructura de la proteína funcional y su interacción con las proteínas GEFs, en los últimos años se han desarrollados moléculas que interfieren en la señal que genera Rac1 (moléculas efectoras) en lugar de actuar directamente sobre Rac1 (Tejada-Simón MV, 2015).

Al menos se han sido descrito 4 moléculas que poseen función de inhibidor de Rac1:

1. NSC23766,(N6-)-2-((4-(Diethylamino)-1-methylbutylamino)-6-methyl-4-pyrimidinyl-2-methyl-4,6-quinolinediamine trihydro-chloride) que es una pequeña molécula que actúa como inhibidor específico de Rac1. Altamente soluble y muy permeable para la membrana, interfieren con ciertas Rac1-GEFs (especialmente con TIAM1). Utilizado en un estudio para ver la relación de Rac1 en la apoptosis celular por arsénico, observándose que también tiene relación Rac1 en la remodelación del citoesqueleto de actina en la muerte celular programada (Liu X y col., 2015 {Liu, 2015 #475})
2. EHop-016. EHop-016 es un inhibidor muy reciente que tiene mayor potencia que el anterior (Dharmawardhane S y col., 2013 {Dharmawardhane, 2013 #471}) Trabajos con este inhibidor han puesto en relieve la importancia de Rac1 en la migración celular y metástasis en el cáncer de pecho, se ha observado que el uso de EHop-016 reduce el crecimiento del tumor por inhibición de la migración celular (Humphries-Bickley T y col., 2015 {Humphries-Bickley, 2015 #477})
3. AZA1. Es un inhibidor permeable que suprimen la regulación de Rac1-GTP y Cdc42-GTP (Zins K y col., 2013 {Zins, 2013 #472})
4. Z62954982 (isoxazolyl-benzamide) es un componente que inhibe la activación de Rac1 por interferencia entre la interacción de Rac1-TIAM1. Hemos elegido este componente en esta tesis doctoral ya que no existe efectos entre los elementos celulares Cdc42, RhoA y Pak1 (Ferri N y col., 2009 {Ferri, 2009 #415}), permitiéndonos ver el efecto específico sobre TIAM1 y Rac1 en el modelo animal.

A pesar de los pocos estudios comportamentales desarrollados para ver el efecto de la inhibición de Rac1 y la activación de rutas de señalización, se ha podido saber que la inhibición de Rac1 (con inhibidores específicos contra la enzima) tiene influencia en la cognición, regula el miedo que esta asociado a la amígdala. Además la regulación de Rac1, es esencial para la memoria al miedo contextual relacionada con la zona CA1 del hipocampo (Wu P y col., 2014). En nuestros experimentos el tratamiento con

el inhibidor específico de Rac1 (Z62954982) normaliza las alteraciones observadas en las espinas dendríticas y mejora el comportamiento de los ratones Fmr1-KO, normalizándose a lo observado en WT, en las pruebas del reconocimiento de objeto; estos resultados están en consonancia con los publicados por otros laboratorios y apoyan la idea de que Rac1 tiene efecto en el aprendizaje, a través de la modificación de los filamentos de actina y la secreción de neurotransmisores. Otra publicación muestra resultados similares a lo observado por nosotros, ya que en ella se muestra que el tratamiento con inhibidor de Rac1 después del daño provocado por la isquemia cerebral mejor la memoria dependiente del hipocampo y las habilidades cognitivas espaciales, apoyando aún más la hipótesis de la implicación de Rac1 en la cognición y dando consistencia a los resultados expuestos en esta tesis doctoral (Raz L y col., 2010). Un trabajo previo indica que el déficit de Karlin, un factor de intercambio Rho GDP/GTP para Rac1, influye en la respuesta ansiosa, aprendizaje y la respuesta de la corstierona en el stress (Mandela P y col., 2014); alteraciones funcionales similares han sido extensamente estudiadas en los ratones nulos de FMRP y mostradas también en este trabajo de tesis por lo que ayuda a seguir argumentando el papel de Rac1 como diana para mejorar el aprendizaje y comportamiento del SXF.

Es conocido que Rac1 está implicada en el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa, promoviendo la producción de ROS. La producción de radicales libres dependiente de NADPH oxidasa está regulada por la activación de Rac1, ya que es un constituyente del propio complejo proteico (Carrizzo A y col., 2014), por lo que su hiperactivación en ratones Fmr1-KO está relacionada con el exceso de ROS que se encuentra en estos ratones. Podríamos establecer que la alta actividad de Rac1-GTPasa está relacionada con el exacerbado estrés oxidativo encontrado en cerebros de ratones de Fmr1-KO. Resultados previos indican que hay excesiva translocación a la membrana de Rac1-GTPasa en ratones con SXF, esta proteína es un regulador muy importante del complejo NADPH oxidasa que a su vez es un importante productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) (el Bekay R y col., 2007). La activación de la ruta de Rac1 daría lugar a un aumento del estrés oxidativo, otros trabajos previos que analizan con técnicas metabolómicas el cerebro del ratón SXF, han descrito un exceso de metabolitos relacionados con el estrés oxidativo. Esto apoya la relevancia de esta ruta como una interesante diana terapéutica (Davidovic L y col., 2011) a través de la eliminación de ROS o interfiriendo en la activación de la NADPH oxidasa (de Diego-

Otero Y y col., 2009) para intentar normalizar la neurosecreción que dará lugar a un estado de excitotoxicidad y también a alteraciones en la memoria y aprendizaje (Doussau F y col., 2000). Estos estudios evidencian la importancia de los elementos reguladores de la NADPH oxidasa, como la ruta de Rac1-GTPasa en la fisiopatología de Síndrome X Frágil.

La activación de NADPH-oxidasa por Rac1 está ampliamente estudiada se ha demostrado que la ruta Rac1/NADPH está implicada en numerosas patologías cerebrales, tales como el daño producido por la isquemia, alteraciones cognitivas, hemorragia subaracnoidea, patologías neuropsiquiátricas donde se puede demostrar un daño oxidativo en las neuronas. Teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro grupo que demuestran la implicación del estrés oxidativo en el SXF (el Bekay R y col., 2007) con estos nuevos resultados podemos indicar que la alta producción de ROS podría deberse a la alta activación de Rac1..

Recientemente se ha propuesto que la superóxido dismutasa (Sod 1) controla la señales celulares a través de pequeñas proteínas GTPasas. Regula la expresión de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RHO GEF16, RAL GEF RGL1), proteínas activadoras GTPasas (ARFGAP ADAP2, RAS GAP RASAL1, RGS4) y a inhibidor de la disociación de Rho (RHO GDI2) de manera dosis-dependiente (Laukkanen MO y col., 2015). La ausencia de FMRP da como resultado una disminución en la expresión de Sod1. El metabolismo de los ratones nulos para FMRP es muy sensible al estrés oxidativo, la desregulación de la expresión de Sod1 podría explicar algunas de las características del SXF, tal como la ansiedad, problemas de sueño y autismo (Bechara EG y col., 2009) Además, los receptores de epinefrina regulan cierta parte del desarrollo de las espinas dendríticas mediante la fosforilación y activación de TIAM1, proteína activadora de Rac1, lo que promueve la remodelación del citoesqueleto por interferir en la formación de filamentos de actina proceso requerido para la morfogénesis de las espinas dendríticas (Tolias KF y col., 2005). Todos nuestros los resultados complementan resultados previos de otros grupos indicando la importante contribución de la activación de Rac1 en el SXF, y sugieren que en ausencia de la proteína FMRP podría ser una buena diana de tratamiento experimental regulando la Rac1, consiguiendo revertir parte de las marcadas características de los ratones con SXF (Fmr1-KO). Estos procesos podrían

explicar la relación entre la cantidad de espinas dendríticas, la alteración de la plasticidad sináptica y el problema cognitivo del SXF, siendo la modulación de la vía Rac1/TIAM1 una posible diana para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas farmacológicas para el SXF.

TRATAMIENTO CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y UNA COMBINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y α -TOCOFEROL

Una característica común del SXF es la presencia de niveles alterados de los aminoácidos excitatorios, y una expresión anormal de los genes implicados en la estabilidad del equilibrio oxidativo (Brown GC et al, 2001; Miyashiro KY y col., 2003; Gruss M & Braun K, 2004). Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de estrés oxidativo en los cerebros y testículos de los animales modelo del SXF, observándose un incremento en los niveles de peroxidación lipídica, oxidación de los grupos carbonilos de proteínas y del glutatión oxidado, a la par que una disminución en la cantidad de glutatión reducido. Todo ello viene acompañado, además, de un aumento de la actividad NADPH oxidasa, enzima responsable de generar especies reactivas de oxígeno, y de un aumento, a nivel de membrana, del número de subunidades del complejo NADPH oxidasa, aumento paralelo a su disminución en el citoplasma (el Bekay R y col., 2007). Asimismo, se detectaron variaciones significativas en los niveles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, como es el caso de componentes de la NADPH oxidasa, por ejemplo, Rac 1-GTPasa, tal como se indica en este trabajo.

Las alteraciones del equilibrio oxidativo son de consecuencia dramática para el correcto funcionamiento cerebral. El estrés oxidativo podría alterar la plasticidad presináptica, provocando daños que pueden perdurar en el tiempo. Las perturbaciones en las neuronas de determinadas zonas del cerebro (hipocampo, amígdala y corteza) afectan a la respuesta emocional, así como al aprendizaje y la memoria. Es conocido que el estrés oxidativo puede afectar a la cognición y resulta ser un factor de riesgo en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la ataxia de Friedrich y algunas formas de demencia; riesgo que puede reducirse mediante el uso del α -tocoferol, o vitamina E (Fillenbaum GG et al, 2005 ; Buznikov GA y col., 2008). La

vitamina E también es eficaz en la mejora de síntomas en los afectados por la ataxia de Friedrich, una enfermedad neurodegenerativa de origen genético y cuya sintomatología se asocia al daño que provocan los radicales libres en el cerebro. Los datos mostrados anteriormente, en su conjunto, han sido la base para el ensayo de posibles tratamientos terapéuticos experimentales en el modelo murino *Fmr1*-nulo. Así, los tratamientos que fueron suministrados a los ratones nulos para FMRP han sido la administración crónica de antioxidantes (vitamina C, y la combinación de vitamina C con vitamina E), apocinina (inhibidor específico de la subunidad p47 del complejo NADPH-oxidasa), Z62954982 (inhibidor específico de la Rac 1-GTPasa), así como la administración aguda estatinas (inhibidoras de la 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) que a su vez inhiben unión de la Rac1 a la NADPH-oxidasa en la membrana). Tras los tratamientos se realizó una exhaustiva evaluación comportamental (campo abierto, reconocimiento de objetos, laberinto en cruz elevada y prueba de miedo condicionado) y bioquímica. Cabe destacar que estos ensayos farmacológicos no habían sido aplicados previamente en el SXF. En los resultados de la presente tesis doctoral describimos que el tratamiento crónico con el ácido ascórbico (vitamina C) en combinación con el α -tocoferol (vitamina E) es capaz de revertir eficazmente ciertas anomalías del comportamiento observadas en los ratones *Fmr1*-KO. La combinación de la vitamina C con la vitamina E, resulta ciertamente eficaz en el tratamiento de los ratones nulos para FMRP, reduciendo la hiperactividad en campo abierto, afectando a la distancia recorrida por el ratón *Fmr1*-KO hasta asemejarla a la recorrida por el ratón sano. La actividad antioxidante de estas vitaminas les confiere una propiedad terapéutica evidente, no sólo se circunscribe a la vitamina C y E en este sentido, se ha demostrado, en estudios sobre ratas estresadas por natación, que el tratamiento con vitamina B1 (tiamina), también de propiedades antioxidantes, actúa como neuroprotector y da lugar a mejores resultados de ejecución en la prueba, así como en otras pruebas que requieren de respuesta emocional y de aprendizaje y capacidad cognitiva (E. Dief A y col., 2015). Igualmente, la aplicación de vitamina D mejora la capacidad cognitiva, habiéndose descrito en ratas una mejora del aprendizaje espacial analizado en el laberinto de Morris (a mayores concentraciones de vitamina D mayor es la mejora) con reducción del tiempo y distancia recorrida para llegar a la plataforma (Latimer CS y col., 2014). La capacidad neuroprotectora y reparadora de

fármacos antioxidantes es bien patente, a día de hoy, en diferentes neuropatologías, a nivel neurológico o psiquiátrico (Huang TT et al 2015, Newton DF et al 2015) y abarcan un espectro amplio de patologías, como es el caso de los trastornos de hiperactividad y déficit de atención, cuyos síntomas son reducidos con el tratamiento de compuestos como el ácido graso omega-3 (Bloch MH & Qawasmi A, 2011) y la N-acetilcisteína NAC (Garcia RJ y col., 2013), éste último también utilizado, por ejemplo, en esquizofrenia (Zavodnick AD & Ali R, 2014).

De acuerdo a lo citado, hemos observado cómo esta misma combinación de antioxidantes (vitaminas C y E) mejora el déficit del aprendizaje mostrado por los ratones nulos Fmr1-KO en la prueba del reconocimiento de objetos (tarea dependiente mayoritariamente de hipocampo), reduciendo el tiempo que pasan explorando el objeto nuevo, y mostrando una mejor discriminación del objeto familiar respecto al nuevo. Desrumaux y col. (2005) muestran que la deficiencia de vitamina E en ratones incrementa la generación de ROS dando lugar a un comportamiento de tipo ansioso (Desrumaux C y col., 2005). En nuestro caso, y dado el perfil basal con ansiolisis del ratón modelo de SXF (Romero-Zerbo Y y col., 2009), la combinación de ácido ascórbico con tocoferol actúa aminorando la alteración de respuesta emocional, reduciendo el patrón ansiolítico del animal Fmr1-KO, hasta normalizarlos. Estos resultados concuerdan por lo expuesto en trabajos anteriores donde, de una parte, se describe cómo el tratamiento con melatonina, un antioxidante endógeno que se sintetiza en la glándula pineal con alta capacidad de eliminación de ROS, normaliza la respuesta ansiosa en los ratones Fmr1-KO (Romero-Zebro Y y col., 2009) y, de otra, la aplicación de α -tocoferol (Vitamina E) a ratones Fmr1-KO mejoraría la respuesta emocional de los ratones Fmr1-KO (de Diego Otero Y y col., 2009)

Nuestros resultados bioquímicos también muestran que la combinación de la vitamina C con la vitamina E normaliza los elevados niveles de oxidación de proteínas y peroxidación lipídica en los animales Fmr1-KO, especialmente en el cerebro. Tanto la oxidación de proteínas como los niveles de TBAR (indicativos de la peroxidación de lípidos) se ven reducidas a niveles similares a los encontrados en ratones sanos, si bien la primera, únicamente tiene lugar con el tratamiento de la mezcla de vitaminas

(C+E), ya que el tratamiento con vitamina C por si solo no revierte la situación de oxidación proteica en el ratón Fmr1-KO.

Como hemos indicado con anterioridad, otros resultados de nuestro grupo indican que el tratamiento con α -tocoferol reduce la actividad de RAC1-GTPasa en el cerebro (de Diego Otero Y y col., 2009), proteína altamente activada en el cerebro de ratones Fmr1-KO. Por tanto, una de las vías de actuación del tratamiento podría ir dirigida a determinadas modificaciones en la actividad de la RAC1-GTPasa que podrían tener como consecuencia una disminución en el acople de las distintas subunidades del complejo NADPH oxidasa. En ese sentido, se ha descrito que la vitamina E, además de actuar directamente sobre los radicales libres neutralizándolos, también modifica la actividad de RAC1-GTPasa modulando a su vez la actividad del complejo NADPH oxidasa y reduciendo así la formación de ROS (Calvisi DF y col., 2004).

Con independencia del posible efecto directo, inducido por la vitamina E sobre RAC1 o sobre las enzimas relacionadas con la oxidación (NADPH-oxidasa), el conjunto de efectos antioxidantes de la vitamina E y vitamina C en cerebro podría constituir una pauta terapéutica general frente al estrés oxidativo que beneficiaría, particularmente, a procesamiento de la señalización la funcionalidad del SNC facilitando mejoras a nivel locomotor, emocional y cognitivo. Al igual que lo descrito a nivel cognitivo, la administración de otras vitaminas, merced a sus propiedades antioxidantes, se ha usado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la enfermedad de Parkinson, donde la administración de vitamina D protege contra la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, inhibiendo a la oxido nítrico sintasa iNOS (Banerjee A et al, 2015).

La vitamina C por si sola reduce los niveles de TBARs, además de inducir cierta reducción en la hiperactividad del ratón Fmr1-KO. No obstante, los mejores resultados a nivel comportamental se obtienen con la combinación de vitaminas (ácido ascórbico y α -tocoferol), con reducción de la hiperactividad, mejora en el aprendizaje y reducción significativa de la ansiedad todo ello sumado a la mejora en los parámetros bioquímicos. Observamos en todas las situaciones que la capacidad antioxidante es mayor en la combinación de vitaminas C y E. Estos datos, en su

conjunto, sugieren que el tratamiento con vitamina C y E es mejor que el tratamiento individual de vitamina C o vitamina E por separado para alcanzar el beneficio terapéutico óptimo, basado en una terapia antioxidante. Esta muy bien documentado que estas dos vitaminas tienen un efecto sinérgico, pues actúan con un mecanismo de auto regulación para conseguir actividad funcional de los dos compuestos en situaciones fisiológicas donde aumenta el requerimiento de actividad antioxidante.

TRATAMIENTO CON APOCININA.

Como hemos observado, de las dos pautas terapéuticas diarias de administración crónica de apocinina empleadas, (8mg/kg y 32mg/kg), únicamente fue efectiva la dosis de 32mg/kg, mejorando en el ratón modelo de SXF usado, el aprendizaje, la hiperactividad y la respuesta en ansiedad. En aquellos ratones a los que se le suministró la dosis menor, el comportamiento típico de la enfermedad no revirtió en relación a ninguna de las pruebas comportamentales realizadas.

Como hemos estado observando el complejo NADPH oxidasa es un importante productor de ROS, y por lo tanto una proteína con alta implicación en el estrés oxidativo de las células. La NADPH oxidasa es un complejo proteico formado por diferentes subunidades, su activación ocurre a través de un complejo proceso de interacciones entre proteínas que comienza con la fosforilación de la subunidad p47^{phox}, lo que provoca que esta se una al componente b558 y sirva de anclaje de las demás subunidades citosólicas a la membrana. Una vez unidas todas las subunidades la NADPH oxidasa en la membrana, el complejo proteico se encuentra activo, por lo que puede producir superóxido como producto final de la transferencia de protones a través de la membrana (Bedard K & Krause KH, 2007; Smit HF y col., 2001). Por ello, la capacidad de la apocinina viene determinada por tratarse de un inhibidor selectivo de la actividad NADPH oxidasa lo que reduce la producción de ROS, como se ha descrito en neutrófilos humanos, donde inhibe principalmente la translocación de la subunidad p47^{phox} (Stolk J y col., 1994).

Para testar la tolerancia de la apocinina, se prueba como afecta en el peso el incremento de dosis a lo largo de 120 días hasta una dosis de 200 mg/kg/día y como le

afectaría al peso las dosis que se utiliza en el tratamiento crónico (8 mg/kg/día y 32 mg/kg/día) encontrándose que no se produce ninguna variación en el peso de los animales, además de no producir mortalidad de los mismos. Por esto, se puede decir que la apocinina es bien tolerada por los ratones de nuestra cepa (FVB) y que no produce variaciones significativas en el peso en los ratones. Se ha demostrado que en ratones C57BL/6J de 4 semanas de edad a los que se le proporciona una dieta alta en grasa, el tratamiento de apocinina en agua no provoca variación en el peso cuando son comparados con ratones vehículo que también están con esta dieta alta en grasa (Meng R y col., 2011).

En el peso de los testículos, para valorar la condición de macroorquidismo, se mantiene en los ratones Fmr1-KO tratados con apocinina por lo que esta característica fenotípica del SXF no se revierte. Sin embargo el peso de la grasa peritoneal se recupera con el tratamiento. El ratón Fmr1-KO tienen un mayor crecimiento y obesidad que puede ser revertida con tratamientos donde la diana terapéutica es el receptor mGluR5 (mediante compuestos antagonistas de este receptor) (Levenga J et al, 2010).

En relación a los niveles de hiperactividad mostrados por los animales con SXF, únicamente el tratamiento de 32 mg/kg/día de apocinina se reduce la locomoción. El tratamiento con apocinina por tanto muestra un efecto de atenuación de la locomoción (hiperactividad) en consonancia con lo observado en otros modelos de hiperlocomoción, véase, por citar algún ejemplo, su efecto en ratas con hiperactividad inducida por medio de metanfetaminas (Miller DK et al, 2014), o bien, la reducción de locomoción medida en campo abierto que es capaz de generarse en ratas con la condición de estrés oxidativo mediante hipoxia intermitente a largo plazo (Liang D y col., 2015).

En estudios recientes, el estrés oxidativo se muestra que esta asociado con la ansiedad en diferentes modelos de animales (Gingrich JA, 2005; Hovatta L y col., 2005; Berry A y col., 2007). Igualmente, ejerce un peso similar en el desarrollo de respuestas de ansiedad en diferentes neuropatologías psiquiátricas (Smaga I y col., 2015). En este sentido, nuestros resultados se suman a los ampliamente descritos por diferentes

estudios, al demostrar que el tratamiento con 32 mg/kg/día de apocinina revierte de forma significativas determinadas características del ratón Fmr1-KO.

En el SXF una de las características más evidente es el retraso en el aprendizaje, con la idea de que si el tratamiento con apocinina mejora algunas de las características de la enfermedad se realizó la prueba del reconocimiento de objeto; donde se evalúa el tiempo de permanencia en un objeto nuevo. A nivel cognitivo, la apocinina se ha descrito útil para mejorar los déficits de aprendizaje en modelos de lesión cerebral traumática, donde concurre estrés oxidativo, revirtiendo los déficits cuando se emplearan concentraciones elevadas de la misma, no así a dosis menores (Lima FD y col., 2008; Ferreira APO y col., 2013). Estos datos concuerdan con lo que se ofrece en los resultados de esta tesis doctoral donde se ve que, en pruebas de aprendizaje, los ratones Fmr1-KO que han sido tratados con la dosis diaria de 32 mg/kg de apocinina tienen una normalización de los parámetros analizados. Además de los resultados obtenidos en la prueba de reconocimiento de objetos, también se logró una mejora de repuesta conductual en la prueba del miedo condicionado, ya que el ratón Fmr1-KO después del tratamiento con 32 mg/kg/día experimenta un restablecimiento en la inmovilización inducida por el miedo (*freezing*).

Existen numerosos estudios sobre el uso de la apocinina para el tratamiento de la neurodegeneración causada por estrés oxidativo mediado por NADPH oxidasa. Así, se ha descrito, entre otros, para la enfermedad de Alzheimer, donde se ha mostrado como un buen tratamiento contra las angiopatías cerebrales originadas por depósitos de péptidos β -amiloides (Han BH y col., 2015), la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), donde se ha probado que la apocinina reduce los niveles de citoquinas inflamatorias y la producción de ROS asociada a la enfermedad (Choi BY y col., 2015), y también en la enfermedad de Parkinson, el tratamiento con apocinina mejora los valores de estrés oxidativo derivado de la acción de la NADPH oxidasa productora de superóxido en el sistema dopaminérgico afectado (Hernandes MS y col., 2013).

TRATAMIENTO CON ESTATINAS

El tratamiento agudo con los dos compuestos catalogados como estatinas (SIM y NST) que tendrían una actividad significativa en la reducción del colesterol y también en la reducción de la activación de Rac1, no ha demostrado eficacia en la normalización de los parámetros de comportamiento alterados en el modelo de ratón del Síndrome X frágil. De hecho, en las pruebas de comportamientos realizadas después de los tratamientos agudos, en ningún caso el tratamiento con estatinas muestra que los ratones Fmr1-KO reciban algún beneficio por la aplicación del inhibidor de la síntesis de mavalonato (intermediario en la síntesis del colesterol). También se observa que no se produce restablecimiento del macroorquidismo, ya que en los ratones Fmr1-KO tratados se observa un mayor peso de los testículos.

El uso de compuestos que reducen los niveles de colesterol se había propuesto como una diana terapéutica para el SXF, merced a mejoras sobre deficiencias características del SXF en tratamiento con estatinas, llegándose a detectar una reducción en las crisis audiogénicas así como en la síntesis proteica (Osterweil EK y col., 2013). Igualmente, se han descrito efectos beneficiosos con la Lovastatina (una molécula familia de las estatinas aislada desde una cepa de *Aspergillus terreus*) en un ensayo clínico piloto no controlado de 15 pacientes (niños de 10 años) a los que se le suministró una dosis de 20 mg/día de Lovastatina durante las 4 semanas de tratamiento y una dosis de 40 mg por las 8 semanas siguientes (Caku A y col., 2014).

Otros estudios han mostrado el efecto de las estatinas en el enfermedades neurológicas tales como el Alzheimer, donde, en ratones que mimetizan la enfermedad, la simvastatina redujo el proceso de desmineilización en la espina dorsal hasta un 50%, pero no así en el cerebro (Stein A y col., 2015), si bien, el tratamiento con esta misma estatina provocó un incremento del factor trófico neuronal BDNF en el hipocampo y corteza y una mejora en la memoria y aprendizaje (Roy A y col., 2015). También se ha descrito su efecto en procesos adictivos, como el relacionado con la adicción a la nicotina. La nicotina reduce las habilidades en el aprendizaje por múltiples vías, entre la que se encuentra la activación de NADPH oxidasa. En este

sentido, se ha observado que grupos de ratas co-tratadas con nicotina y la estatina “atorvastina” mejoran el aprendizaje el laberinto en Y respecto a los grupos tratados con nicotina (Syam DS y col., 2015). Por otro lado, se ha demostrado su efecto beneficioso independiente de los niveles de colesterol en pacientes con diabetes tipo 2, donde son capaces de producir una mejora cognitiva, de la memoria y de las funciones ejecutivas (Heymann AD y col., 2015).

Sin embargo, y por otra parte, se ha considerado que la aplicación de compuestos inhibidores de HMG-CoA reductasa, que reducen significativamente el colesterol, no se sustenta en parámetros medidos en pacientes, ya que un estudio de 500 pacientes con el SXF demostró que tenía lugar una reducción significativa de los niveles de colesterol, por lo que se propone que podría resultar contraproducente la utilización de estatinas en el tratamiento del SXF (Berry-Kravis E et al, 2015).

En algunos casos se ha demostrado claramente el efecto terapéutico del tratamiento con simvastatina a nivel cerebral, como en la enfermedad de Alzheimer donde la disminución, debida al envejecimiento, de la síntesis del colesterol dentro de las neuronas pueden contribuir a la neurodegeneración (Burgos SA y col., 2012, Karasinska and Hayden, 2011; Liu y col., 2010; Valenza y col., 2010 Suzuki y col., 2010). Por todo ello, era esperable una mejora de algunos parámetros tras el tratamiento con estatinas, sin embargo, con los datos en nuestro modelo, no podríamos sino concluir que los ratones afectados del SXF, el tratamiento con estatinas (tanto comercial, SIM, como sintetizada *de novo*, NTS) no parecería una herramienta terapéutica en la lucha contra esta enfermedad. Son necesarios más estudios en este sentido, habida cuenta de los estudios previos citados, y quizás el uso de estatinas precise de su uso combinado con otros agentes para ser más eficaz y recomendable. En este sentido, la reducción asociada de la coenzima Q10 que tiene lugar en los tratamientos con estatinas, y cuyo efecto, negativo para la cognición (Martin SB y col., 2011) está aún por conocerse en profundidad en los ensayos en pacientes (Banach M et al 2015), puede ser indicativa de la necesidad de su uso junto a suplementos antioxidantes para mejorar su efectividad en tratamientos a largo plazo.

CONCLUSIONES



1. Aumento del estrés nitrosativo en el hipocampo, cerebelo y corteza de ratones nulos para la proteína FMRP que provoca una nitrosilación de proteínas.
2. Los animales Fmr1-KO muestran diferencias de expresión, tanto a nivel de mRNA como de proteínas, en regiones implicadas en tareas cognitivas como la corteza prefrontal, cerebelo y el hipocampo de las enzimas sintetizadoras de NO: iNOS y nNOS. Se detecta una disminución de nNOS y un aumento de iNOS en animales adultos.
3. En el ratón fmr1-KO, modelo de estudio del Síndrome X Frágil, se encuentra una mayor activación de la proteína Rac1-GTPasa.
4. Los ratones carentes de la proteína FMRP que han sido tratados crónicamente con un inhibidor de Rac1 mejoran la densidad de las espinas dendríticas lo que da lugar a una mejora en el comportamiento relacionado con el aprendizaje y la ansiedad.
5. Los tratamientos crónicos principalmente con la combinación de vitamina C con vitamina E revierten anomalías comportamentales como la hiperactividad, la ansiolisis y los déficits en aprendizaje y memoria. Estos antioxidantes revierten ciertos parámetros asociados al estrés oxidativo en cerebro, por lo que se consideran que son sustancias beneficiosas en el modelo animal del síndrome y debería de ser ensayado en los enfermos afectados por Síndrome X frágil.

6. El tratamiento crónico con el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina, revierte las anomalías comportamentales relacionadas con la hiperactividad, ansiolisis y el aprendizaje de los ratones nulos de FMRP. Este compuesto es bien tolerado por los ratones y tendría que ser considerado para futuros ensayos terapéuticos de pacientes con Síndrome X Frágil.

7. Los tratamientos agudos con dos inhibidores de la HMG-CoA reductasa (SIM y NTS) no revierten el estrés oxidativo ni los déficits comportamentales en este modelo animal, sugiriendo una nula relevancia terapéutica de esta sustancia en el tratamiento agudo del Síndrome X Frágil.

BIBLIOGRAFÍA



- Abdel Moneim AE. Evaluating the potential role of pomegranate peel in aluminum-induced oxidative stress and histopathological alterations in brain of female rats. *Biol Trace Elem Res.* 2012;150(1-3):328-36.
- Abitbol M, Menini C, Delezoide AL, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet.* 1993;4(2):147-53.
- Adam O, Laufs U. Rac1-mediated effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(8):1238-50.
- Ahdab-Barmada M, Moossy J, Nemoto EM, Lin MR. Hyperoxia produces neuronal necrosis in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1986;45(3):233-46.
- Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1056:218-33.
- Albenzi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse.* 2000;35(2):151-9.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, y col. Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet.* 1999;83(4):322-5.
- Andreatza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, y col. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord.* 2008;111(2-3):135-44.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN, Starkov AA. Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry (Mosc).* 2015;80(5):517-31.
- Antar LN, Afroz R, Dichtenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci.* 2004;24(11):2648-55.
- Ashley CT, Jr., Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science.* 1993;262(5133):563-6.
- Atkinson J, Epanand RF, Epanand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(5):739-64.
- Atkinson J, Harroun T, Wassall SR, Stillwell W, Katsaras J. The location and behavior of alpha-tocopherol in membranes. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(5):641-51.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973;52(3):741-4.
- Bagni C, Oostra BA. Fragile X syndrome: From protein function to therapy. *Am J Med Genet A.* 2013;161(11):2809-21.

- Bagni C, Tassone F, Neri G, Hagerman R. Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4314-22.
- Bailey DB, Jr., Raspa M, Bishop E, Olmsted M, Mallya UG, Berry-Kravis E. Medication utilization for targeted symptoms in children and adults with fragile X syndrome: US survey. *J Dev Behav Pediatr.* 2012;33(1):62-9.
- Bailey DB, Jr., Raspa M, Olmsted M, Holiday DB. Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: findings from a national parent survey. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(16):2060-9.
- Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoe P, Luteijn T, Hoogeveen AT, y col. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res.* 2000;258(1):162-70.
- Bandyopadhyay A, Chakder S, Rattan S. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am J Physiol.* 1997;272(6 Pt 1):C1790-7.
- Bardoni B, Mandel JL. Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(3):284-93.
- Bardoni B, Willemsen R, Weiler IJ, Schenck A, Severijnen LA, Hindelang C, y col. NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneuroosomes. *Exp Cell Res.* 2003;289(1):95-107.
- Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron.* 2008;60(2):201-214.
- Basuta K, Schneider A, Gane L, Polussa J, Woodruff B, Pretto D, Hagerman R, Tassone F. High functioning male with fragile X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Am J Med Genet A.* 2015.167A(9):2154-2161.
- Batista PA, Fogaca MV, Guimaraes FS. The endocannabinoid, endovanilloid and nitrgergic systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors. *Behav Brain Res.* 2015.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 2004;27(7):370-377.
- Bechara EG, Didiot MC, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, y col. A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol.* 2009;7(1):e16.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.
- Berry A, Capone F, Giorgio M, Pelicci PG, de Kloet ER, Alleeva E, y col. Deletion of the life span determinant p66Shc prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice. *Exp Gerontol.* 2007;42(1-2):37-45.

- Berry-Kravis E, Potanos K. Psychopharmacology in fragile X syndrome--present and future. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(1):42-8.
- Berry-Kravis E, Raspa M, Loggin-Hester L, Bishop E, Holiday D, Bailey DB. Seizures in fragile X syndrome: characteristics and comorbid diagnoses. *Am J Intellect Dev Disabil.* 2010;115(6):461-72.
- Berry-Kravis E, Sumis A, Hervey C, Nelson M, Porges SW, Weng N, y col. Open-label treatment trial of lithium to target the underlying defect in fragile X syndrome. *J Dev Behav Pediatr.* 2008;29(4):293-302.
- Berry-Kravis E. Epilepsy in fragile X syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 2002;44(11):724-8.
- Berry-Kravis EM, Hessel D, Rathmell B, Zarevics P, Cherubini M, Walton-Bowen K, y col. Effects of STX209 (arbaclofen) on neurobehavioral function in children and adults with fragile X syndrome: a randomized, controlled, phase 2 trial. *Sci Transl Med.* 2012;4(152):152ra27.
- Bilousova TV, Dansie L, Ngo M, Aye J, Charles JR, Ethell DW, y col. Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J Med Genet.* 2009;46(2):94-102.
- Bloch MH, Qawasmi A. Omega-3 fatty acid supplementation for the treatment of children with attention-deficit/hyperactivity disorder symptomatology: systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2011;50(10):991-1000.
- Boccia ML, Roberts JE. Behavior and autonomic nervous system function assessed via heart period measures: the case of hyperarousal in boys with fragile X syndrome. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 2000;32(1):5-10.
- Bongmba OY, Martinez LA, Elhardt ME, Butler K, Tejada-Simon MV. Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. *Brain Res.* 2011;1399:79-95.
- Brackett DM, Qing F, Amieux PS, Sellers DL, Horner PJ, Morris DR. FMR1 transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. *PLoS One.* 2013;8(3):e58296.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;156(2-3):234-58.
- Brouwer JR, Mientjies EJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, Severijnen LA, Van der Linde HC, y col. Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Exp Cell Res.* 2007;313(2):244-53.
- Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.* 2010;41(2-3):242-7.

- Buffington SA, Huang W, Costa-Mattioli M. Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci.* 2014;37:17-38.
- Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr.* 1990;10:357-82.
- Bushey D, Tononi G, Cirelli C. The *Drosophila* fragile X mental retardation gene regulates sleep need. *J Neurosci.* 2009;29(7):1948-61.
- Busquets-Garcia A, Gomis-Gonzalez M, Guegan T, Agustin-Pavon C, Pastor A, Mato S, y col. Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat Med.* 2013;19(5):603-7.
- Buznikov GA, Nikitina LA, Seidler FJ, Slotkin TA, Bezuglov VV, Milosevic I, y col. Amyloid precursor protein 96-110 and beta-amyloid 1-42 elicit developmental anomalies in sea urchin embryos and larvae that are alleviated by neurotransmitter analogs for acetylcholine, serotonin and cannabinoids. *Neurotoxicol Teratol.* 2008;30(6):503-9.
- Caku A, Pellerin D, Bouvier P, Riou E, Corbin F. Effect of lovastatin on behavior in children and adults with fragile X syndrome: an open-label study. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(11):2834-42.
- Calvisi DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF- α transgenic mouse model of liver cancer. *J Hepatol.* 2004;41(5):815-22.
- Carbone DL, Moreno JA, Tjalkens RB. Nuclear factor kappa-B mediates selective induction of neuronal nitric oxide synthase in astrocytes during low-level inflammatory stimulation with MPTP. *Brain Res.* 2008;1217:1-9.
- Carmeli E, Imam B, Bachar A, Merrick J. Inflammation and oxidative stress as biomarkers of premature aging in persons with intellectual disability. *Res Dev Disabil.* 2012;33(2):369-75.
- Carrizzo A, Forte M, Lembo M, Formisano L, Puca AA, Vecchione C. Rac-1 as a new therapeutic target in cerebro- and cardio-vascular diseases. *Curr Drug Targets.* 2014;15(13):1231-46.
- Castets M, Schaeffer C, Bechara E, Schenck A, Khandjian EW, Luche S, y col. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 2005;14(6):835-44.
- Chang S, Bray SM, Li Z, Zarnescu DC, He C, Jin P, y col. Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in *Drosophila*. *Nat Chem Biol.* 2008;4(4):256-63.
- Cheever A, Ceman S. Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *RNA.* 2009;15(3):362-6.
- Chelly J, Mandel JL. Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 2001;2(9):669-80.
- Chen JH, Kuo HC, Lee KF, Tsai TH. Magnolol protects neurons against ischemia injury via the downregulation of p38/MAPK, CHOP and nitrotyrosine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;279(3):294-302.

- Chez MG, Burton Q, Dowling T, Chang M, Khanna P, Kramer C. Memantine as adjunctive therapy in children diagnosed with autistic spectrum disorders: an observation of initial clinical response and maintenance tolerability. *J Child Neurol*. 2007;22(5):574-9.
- Choi BY, Kim JH, Kho AR, Kim IY, Lee SH, Lee BE, y col. Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *J Neuroinflammation*. 2015;12:104.
- Choi CH, Schoenfeld BP, Bell AJ, Hinchey P, Kollaros M, Gertner MJ, y col. Pharmacological reversal of synaptic plasticity deficits in the mouse model of fragile X syndrome by group II mGluR antagonist or lithium treatment. *Brain Res*. 2011;1380:106-19.
- Chuang SC, Zhao W, Bauchwitz R, Yan Q, Bianchi R, Wong RK. Prolonged epileptiform discharges induced by altered group I metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal slices of a fragile X mouse model. *J Neurosci*. 2005;25(35):8048-55.
- Cianchetti C, Sannio-Fancello G, Fratta AL, Manconi F, Orano A, Pischedda MP, y col. Neuropsychological, psychiatric, and physical manifestations in 149 members from 18 fragile X families. *Am J Med Genet*. 1991;40(2):234-43.
- Cirelli C. Sleep disruption, oxidative stress, and aging: new insights from fruit flies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):13901-2.
- Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet*. 1999;22(1):98-101.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, y col. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5401-4.
- Contractor A, Klyachko VA, Portera-Cailliau C. Altered Neuronal and Circuit Excitability in Fragile X Syndrome. *Neuron*. 2015;87(4):699-715.
- Cook D, Sanchez-Carbente Mdel R, Lachance C, Radzioch D, Tremblay S, Khandjian EW, y col. Fragile X related protein 1 clusters with ribosomes and messenger RNAs at a subset of dendritic spines in the mouse hippocampus. *PLoS One*. 2011;6(10):e26120.
- Corbetta S, D'Adamo P, Gualdoni S, Braschi C, Berardi N, de Curtis I. Hyperactivity and novelty-induced hyperreactivity in mice lacking Rac3. *Behav Brain Res*. 2008;186(2):246-55.
- Cordeiro L, Abucayan F, Hagerman R, Tassone F, Hessel D. Anxiety disorders in fragile X premutation carriers: Preliminary characterization of probands and non-probands. *Intractable Rare Dis Res*. 2015;4(3):123-30.
- Cordeiro L, Ballinger E, Hagerman R, Hessel D. Clinical assessment of DSM-IV anxiety disorders in fragile X syndrome: prevalence and characterization. *J Neurodev Disord*. 2011;3(1):57-67.

- Cornish K, Sudhalter V, Turk J. Attention and language in fragile X. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(1):11-6.
- Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Scott E, Leslie M, y col. Prevalence of the fragile X syndrome in African-Americans. *Am J Med Genet.* 2002;110(3):226-33.
- Crawford DC, Zhang F, Wilson B, Warren ST, Sherman SL. Fragile X CGG repeat structures among African-Americans: identification of a novel factor responsible for repeat instability. *Hum Mol Genet.* 2000;9(12):1759-69.
- Curia G, Papouin T, Seguela P, Avoli M. Downregulation of tonic GABAergic inhibition in a mouse model of fragile X syndrome. *Cereb Cortex.* 2009;19(7):1515-20.
- D'Hulst C, Heulens I, Brouwer JR, Willemsen R, De Geest N, Reeve SP, y col. Expression of the GABAergic system in animal models for fragile X syndrome and fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain Res.* 2009;1253:176-83.
- Dachtler J, Hardingham NR, Fox K. The role of nitric oxide synthase in cortical plasticity is sex specific. *J Neurosci.* 2012;32(43):14994-9.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169-76.
- Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell.* 2001;107(4):489-99.
- Davidovic L, Navratil V, Bonaccorso CM, Catania MV, Bardoni B, Dumas ME. A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the fragile X syndrome mouse model. *Genome Res.* 2011;21(12):2190-202.
- Davidovic L, Tremblay S, Gravel M, De Koninck P, Khandjian EW. [The fragile X syndrome: one protein missing and 1001 disoriented mRNAs]. *Med Sci (Paris).* 2006;22(1):41-6.
- Davids JR, Hagerman RJ, Eilert RE. Orthopaedic aspects of fragile-X syndrome. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72(6):889-96.
- Davydov BI, Drobyshev VI, Ushakov IB, Fedorov VP. [Morphological analysis of the reaction of the animal brain to short-term hyperoxia]. *Kosm Biol Aviakosm Med.* 1988;22(2):56-62.
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, y col. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* 1993;3(1):31-5.
- de Diego-Otero Y, Romero-Zerbo Y, el Bekay R, Decara J, Sanchez L, Rodriguez-de Fonseca F, y col. Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34(4):1011-26.
- De Rubeis S, Fernandez E, Buzzi A, Di Marino D, Bagni C. Molecular and cellular aspects of mental retardation in the Fragile X syndrome: from gene mutation/s to spine dysmorphogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2012;970:517-51.

- de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, y col. Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am J Hum Genet.* 1996;58(5):1025-32.
- De Vries DD, Went LN, Bruyn GW, Scholte HR, Hofstra RM, Bolhuis PA, y col. Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. *Am J Hum Genet.* 1996;58(4):703-11.
- de Vrij FM, Levenga J, van der Linde HC, Koekkoek SK, De Zeeuw CI, Nelson DL, y col. Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice. *Neurobiol Dis.* 2008;31(1):127-32.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324 (Pt 1):1-18.
- del Pozo MA, Price LS, Alderson NB, Ren XD, Schwartz MA. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* 2000;19(9):2008-14.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet.* 1993;4(4):335-40.
- Dhariwal KR, Hartzell WO, Levine M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(4):712-6.
- Dharmawardhane S, Hernandez E, Vlaar C. Development of EHop-016: a small molecule inhibitor of Rac. *Enzymes.* 2013;33 Pt A:117-46.
- Ding Q, Sethna F, Wang H. Behavioral analysis of male and female Fmr1 knockout mice on C57BL/6 background. *Behav Brain Res.* 2014;271:72-8.
- Dolan BM, Duron SG, Campbell DA, Vollrath B, Shankaranarayana Rao BS, Ko HY, y col. Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(14):5671-6.
- Dolen G, Osterweil E, Rao BS, Smith GB, Auerbach BD, Chattarji S, y col. Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron.* 2007;56(6):955-62.
- Doussau F, Gasman S, Humeau Y, Vitiello F, Popoff M, Boquet P, y col. A Rho-related GTPase is involved in Ca(2+)-dependent neurotransmitter exocytosis. *J Biol Chem.* 2000;275(11):7764-70.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
- Dyer-Friedman J, Glaser B, Hessel D, Johnston C, Huffman LC, Taylor A, y col. Genetic and environmental influences on the cognitive outcomes of children with fragile X syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002;41(3):237-44.
- Dysken MW, Guarino PD, Vertrees JE, Asthana S, Sano M, Llorente M, y col. Vitamin E and memantine in Alzheimer's disease: clinical trial methods and baseline data. *Alzheimers Dement.* 2014;10(1):36-44.

- E Dief A, M Samy D, I Dowedar F. Impact of exercise and vitamin b1 intake on hippocampal brain-derived neurotrophic factor and spatial memory performance in a rat model of stress. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61(1):1-7.
- Eadie BD, Cushman J, Kannagara TS, Fanselow MS, Christie BR. NMDA receptor hypofunction in the dentate gyrus and impaired context discrimination in adult Fmr1 knockout mice. *Hippocampus*. 2012;22(2):241-54.
- Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Battersby MN, y col. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*. 2010;65(3):373-84.
- Edelman GM, Gally JA. Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):11651-2.
- Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, y col. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet*. 1994;8(1):88-94.
- Eichler EE, Nelson DL. Genetic variation and evolutionary stability of the FMR1 CGG repeat in six closed human populations. *Am J Med Genet*. 1996;64(1):220-5.
- el Bekay R, Romero-Zerbo Y, Decara J, Sanchez-Salido L, Del Arco-Herrera I, Rodriguez-de Fonseca F, y col. Enhanced markers of oxidative stress, altered antioxidants and NADPH-oxidase activation in brains from Fragile X mental retardation 1-deficient mice, a pathological model for Fragile X syndrome. *Eur J Neurosci*. 2007;26(11):3169-80.
- El Idrissi A, Neuwirth LS, L'Amoreaux W. Taurine regulation of short term synaptic plasticity in fragile X mice. *J Biomed Sci*. 2010;17 Suppl 1:S15.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(1):39-46.
- Engels B, van 't Padje S, Blondin L, Severijnen LA, Oostra BA, Willemsen R. Characterization of Fxr1 in *Danio rerio*; a simple vertebrate model to study costamere development. *J Exp Biol*. 2004;207(Pt 19):3329-38.
- Erickson CA, Mullett JE, McDougale CJ. Open-label memantine in fragile X syndrome. *J Autism Dev Disord*. 2009;39(12):1629-35.
- Erickson CA, Weng N, Weiler IJ, Greenough WT, Stigler KA, Wink LK, y col. Open-label riluzole in fragile X syndrome. *Brain Res*. 2011;1380:264-70.
- Erickson CA, Wink LK, Ray B, Early MC, Stiegelmeier E, Mathieu-Frasier L, y col. Impact of acamprosate on behavior and brain-derived neurotrophic factor: an open-label study in youth with fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;228(1):75-84.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-421.

- Fan H, Booker JK, McCandless SE, Shashi V, Fleming A, Farber RA. Mosaicism for an FMR1 gene deletion in a fragile X female. *Am J Med Genet A*. 2005;136(2):214-217.
- Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell*. 1997;1(1):109-118.
- Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci*. 1997;17(5):1539-47.
- Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ, Tassone F. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J Mol Diagn*. 2009;11(4):306-10.
- Ferreira AP, Rodrigues FS, Della-Pace ID, Mota BC, Oliveira SM, Velho Gewehr Cde C, y col. The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage. *Neurochem Int*. 2013;63(6):583-93.
- Ferri N, Corsini A, Bottino P, Clerici F, Contini A. Virtual screening approach for the identification of new Rac1 inhibitors. *J Med Chem*. 2009;52(14):4087-90.
- Ferron L, Nieto-Rostro M, Cassidy JS, Dolphin AC. Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat Commun*. 2014;5:3628.
- Fillenbaum GG, Kuchibhatla MN, Hanlon JT, Artz MB, Pieper CF, Schmader KE, y col. Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E. *Ann Pharmacother*. 2005;39(12):2009-14.
- Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell*. 1994;78(1):23-33.
- Forman HJ, Torres M, Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem*. 2002;234-235(1-2):49-62.
- Frankland PW, Wang Y, Rosner B, Shimizu T, Balleine BW, Dykens EM, y col. Sensorimotor gating abnormalities in young males with fragile X syndrome and Fmr1-knockout mice. *Mol Psychiatry*. 2004;9(4):417-25.
- Franklin AV, King MK, Palomo V, Martinez A, McMahon LL, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors reverse deficits in long-term potentiation and cognition in fragile X mice. *Biol Psychiatry*. 2014;75(3):198-206.
- Freund LS, Reiss AL, Abrams MT. Psychiatric disorders associated with fragile X in the young female. *Pediatrics*. 1993;91(2):321-9.
- Freund LS, Reiss AL. Cognitive profiles associated with the fra(X) syndrome in males and females. *Am J Med Genet*. 1991;38(4):542-7.

- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, y col. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 1991;67(6):1047-58.
- Galvez R, Gopal AR, Greenough WT. Somatosensory cortical barrel dendritic abnormalities in a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Brain Res*. 2003;971(1):83-9.
- Galvez R, Greenough WT. Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005;135(2):155-60.
- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:428010.
- Gao Y, Dickerson JB, Guo F, Zheng J, Zheng Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(20):7618-23.
- García Arocena D, de Diego Y, Oostra BA, Willemsen R, Mirta Rodriguez M. A fragile X case with an amplification/deletion mosaic pattern. *Hum Genet*. 2000 Mar;106(3):366-9. PubMed PMID: 10798369.
- Garcia RJ, Francis L, Dawood M, Lai ZW, Faraone SV, Perl A. Attention deficit and hyperactivity disorder scores are elevated and respond to N-acetylcysteine treatment in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013;65(5):1313-8.
- Genest J, McPherson R, Frohlich J, Anderson T, Campbell N, Carpentier A, y col. 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can J Cardiol*. 2009;25(10):567-79.
- Gessert S, Bugner V, Tecza A, Pinker M, Kuhl M. FMR1/FXR1 and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development. *Dev Biol*. 2010;341(1):222-35.
- Ghilan M, Hryciw BN, Brocardo PS, Bostrom CA, Gil-Mohapel J, Christie BR. Enhanced corticosteroid signaling alters synaptic plasticity in the dentate gyrus in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurobiol Dis*. 2015;77:26-34.
- Gingrich JA. Oxidative stress is the new stress. *Nat Med*. 2005;11(12):1281-2.
- Godfraind JM, Reyniers E, De Boulle K, D'Hooge R, De Deyn PP, Bakker CE, y col. Long-term potentiation in the hippocampus of fragile X knockout mice. *Am J Med Genet*. 1996;64(2):246-51.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*. 2005;19(1):1-49.
- Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, y col. High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Neural Transm*. 2005;112(5):649-60.

- Gray SL, Anderson ML, Crane PK, Breitner JC, McCormick W, Bowen JD, y col. Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(2):291-5.
- Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ. Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13):7101-6.
- Gross C, Hoffmann A, Bassell GJ, Berry-Kravis EM. Therapeutic Strategies in Fragile X Syndrome: From Bench to Bedside and Back. *Neurotherapeutics.* 2015.
- Grossman AW, Elisseou NM, McKinney BC, Greenough WT. Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res.* 2006;1084(1):158-64.
- Gruss M, Braun K. Age- and region-specific imbalances of basal amino acids and monoamine metabolism in limbic regions of female Fmr1 knock-out mice. *Neurochem Int.* 2004;45(1):81-8.
- Guo F, Debidda M, Yang L, Williams DA, Zheng Y. Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem.* 2006;281(27):18652-9.
- Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54(4):469-87.
- Gysin R, Kraftsik R, Sandell J, Bovet P, Chappuis C, Conus P, y col. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: convergent genetic and functional evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(42):16621-6.
- Haditsch U, Leone DP, Farinelli M, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Mansuy IM, y col. A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci.* 2009;41(4):409-19.
- Hagerman PJ. The fragile X prevalence paradox. *J Med Genet.* 2008;45(8):498-9.
- Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Kaufmann WE, Ono MY, Tartaglia N, Lachiewicz A, y col. Advances in the treatment of fragile X syndrome. *Pediatrics.* 2009;123(1):378-90.
- Hagerman RJ, Hagerman PJ. Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behavior relationships. *Mol Genet Metab.* 2001;74(1-2):89-97.
- Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, Carpenter I, Staley LW, O'Connor RA, y col. High functioning fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR-1 mutation associated with protein expression. *Am J Med Genet.* 1994;51(4):298-308.
- Hagerman RJ, Miller LJ, McGrath-Clarke J, Riley K, Goldson E, Harris SW, y col. Influence of stimulants on electrodermal studies in Fragile X syndrome. *Microsc Res Tech.* 2002;57(3):168-73.

- Hall SS, Burns DD, Lightbody AA, Reiss AL. Longitudinal changes in intellectual development in children with Fragile X syndrome. *J Abnorm Child Psychol.* 2008;36(6):927-39.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006;97(6):1634-58.
- Hamilton SM, Green JR, Veeraragavan S, Yuva L, McCoy A, Wu Y, y col. Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders. *Behav Neurosci.* 2014;128(2):103-9.
- Han BH, Zhou ML, Johnson AW, Singh I, Liao F, Vellimana AK, y col. Contribution of reactive oxygen species to cerebral amyloid angiopathy, vasomotor dysfunction, and microhemorrhage in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(8):E881-90.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1984;327(1):1-5.
- Hansen SN, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J. Does vitamin C deficiency affect cognitive development and function? *Nutrients.* 2014;6(9):3818-46.
- Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 2002;33(6):774-97.
- Hatton DD, Hooper SR, Bailey DB, Skinner ML, Sullivan KM, Wheeler A. Problem behavior in boys with fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 2002;108(2):105-16.
- Heard TT, Ramgopal S, Picker J, Lincoln SA, Rotenberg A, Kothare SV. EEG abnormalities and seizures in genetically diagnosed Fragile X syndrome. *Int J Dev Neurosci.* 2014;38:155-60.
- Henderson C, Wijetunge L, Kinoshita MN, Shumway M, Hammond RS, Postma FR, y col. Reversal of disease-related pathologies in the fragile X mouse model by selective activation of GABAB receptors with arbaclofen. *Sci Transl Med.* 2012;4(152):152ra28.
- Heo JH, Hyon L, Lee KM. The possible role of antioxidant vitamin C in Alzheimer's disease treatment and prevention. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2013;28(2):120-5.
- Herberg LJ, Grottick A, Rose IC. Nitric oxide synthesis, epileptic seizures and kindling. *Psychopharmacology (Berl).* 1995;119(1):115-23.
- Hernandez MS, Cafe-Mendes CC, Britto LR. NADPH oxidase and the degeneration of dopaminergic neurons in parkinsonian mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:157857.
- Hessel D, Glaser B, Dyer-Friedman J, Blasey C, Hastie T, Gunnar M, y col. Cortisol and behavior in fragile X syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2002;27(7):855-72.
- Hessel D, Tassone F, Cordeiro L, Koldewyn K, McCormick C, Green C, y col. Brief report: aggression and stereotypic behavior in males with fragile X

- syndrome--moderating secondary genes in a "single gene" disorder. *J Autism Dev Disord.* 2008;38(1):184-9.
- Heulens I, D'Hulst C, Van Dam D, De Deyn PP, Kooy RF. Pharmacological treatment of fragile X syndrome with GABAergic drugs in a knockout mouse model. *Behav Brain Res.* 2012;229(1):244-9.
 - Heymann AD, Ravona-Springer R, Moshier EL, Godbold J, Beeri MS. Statin Use is Associated with Better Cognitive Function in Elderly with Type 2 Diabetes. *J Alzheimers Dis.* 2015;47(1):55-9.
 - Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993;11(9):1026-30.
 - Hinds H, Craig IW, Chen ZY, Kraakman ME, Schuurman RK, Hendriks RW. Carrier detection in X-linked immunodeficiencies. II: An X inactivation assay based on differential methylation of a line-1 repeat at the DXS255 locus. *Immunodeficiency.* 1993;4(1-4):213-5.
 - Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, y col. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet.* 1993;3(1):36-43.
 - Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1991;41(3):289-94.
 - Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, y col. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature.* 2005;438(7068):662-6.
 - Hu H, Qin Y, Bochorishvili G, Zhu Y, van Aelst L, Zhu JJ. Ras signaling mechanisms underlying impaired GluR1-dependent plasticity associated with fragile X syndrome. *J Neurosci.* 2008;28(31):7847-62.
 - Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7746-50.
 - Humphries-Bickley T, Castillo-Pichardo L, Corujo-Carro F, Duconge J, Hernandez-O'Farrill E, Vlaar C, y col. Pharmacokinetics of Rac inhibitor EHop-016 in mice by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;981-982:19-26.
 - Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(7):1648-58.
 - Incorpora G, Sorge G, Sorge A, Pavone L. Epilepsy in fragile X syndrome. *Brain Dev.* 2002;24(8):766-9.
 - Irwin SA, Idupulapati M, Gilbert ME, Harris JB, Chakravarti AB, Rogers EJ, y col. Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal

- neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *Am J Med Genet.* 2002;111(2):140-6.
- Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest.* 2003;111(2):163-9.
 - Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 1998;356(1):1-11.
 - James SJ, Rose S, Melnyk S, Jernigan S, Blossom S, Pavliv O, y col. Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. *FASEB J.* 2009;23(8):2374-83.
 - Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(6):901-8.
 - Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.* 2008;15(3):473-93.
 - Kanellopoulos AK, Semelidou O, Kotini AG, Anezaki M, Skoulakis EM. Learning and memory deficits consequent to reduction of the fragile X mental retardation protein result from metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of cAMP signaling in *Drosophila*. *J Neurosci.* 2012;32(38):13111-24.
 - Kao DI, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(35):15601-6.
 - Kaufmann WE, Cohen S, Sun HT, Ho G. Molecular phenotype of Fragile X syndrome: FMRP, FXRPs, and protein targets. *Microsc Res Tech.* 2002;57(3):135-44.
 - Kazdoba TM, Leach PT, Silverman JL, Crawley JN. Modeling fragile X syndrome in the *Fmr1* knockout mouse. *Intractable Rare Dis Res.* 2014;3(4):118-33.
 - Kemper MB, Hagerman RJ, Altshul-Stark D. Cognitive profiles of boys with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1988;30(1-2):191-200.
 - Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Cote F, Devys D, y col. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet.* 1995;4(5):783-9.
 - Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B. Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(36):13357-62.
 - Klees RF, De Marco PC, Salaszyk RM, Ahuja D, Hogg M, Antoniotti S, y col. Apocynin derivatives interrupt intracellular signaling resulting in decreased migration in breast cancer cells. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(2):87246.

- Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(3):541-54.
- Kooy RF, D'Hooge R, Reyniers E, Bakker CE, Nagels G, De Boule K, y col. Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1996;64(2):241-5.
- Kramvis I, Mansvelder HD, Loos M, Meredith R. Hyperactivity, perseveration and increased responding during attentional rule acquisition in the Fragile X mouse model. *Front Behav Neurosci*. 2013;7:172.
- Krawczun MS, Jenkins EC, Brown WT. Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum Genet*. 1985;69(3):209-11.
- Kumari D, Usdin K. Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha -Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. *J Biol Chem*. 2001;276(6):4357-64.
- Kumari D, Usdin K. The distribution of repressive histone modifications on silenced FMR1 alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 2010;19(23):4634-42.
- Kwan KY, Lam MM, Johnson MB, Dube U, Shim S, Rasin MR, y col. Species-dependent posttranscriptional regulation of NOS1 by FMRP in the developing cerebral cortex. *Cell*. 2012;149(4):899-911.
- Latimer CS, Brewer LD, Searcy JL, Chen KC, Popovic J, Kraner SD, y col. Vitamin D prevents cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):E4359-66.
- Laukkanen MO, Cammarota F, Esposito T, Salvatore M, Castellone MD. Extracellular superoxide dismutase regulates the expression of small gtpase regulatory proteins GEFs, GAPs, and GDI. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121441.
- Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklisch P, Arai A, Gall CM. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci*. 2000;20(1):8-21.
- Lauterborn JC, Truong GS, Baudry M, Bi X, Lynch G, Gall CM. Chronic elevation of brain-derived neurotrophic factor by ampakines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(1):297-305.
- Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Jr., Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4843-8.
- Leigh MJ, Nguyen DV, Mu Y, Winarni TI, Schneider A, Chechi T, y col. A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J Dev Behav Pediatr*. 2013;34(3):147-55.
- Leist M, Nicotera P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res*. 1998;239(2):183-201.

- Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(3):117-34.
- Levenga J, de Vrij FM, Oostra BA, Willemsen R. Potential therapeutic interventions for fragile X syndrome. *Trends Mol Med.* 2010;16(11):516-27.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(9):790-6.
- Li J, Pelletier MR, Perez Velazquez JL, Carlen PL. Reduced cortical synaptic plasticity and GluR1 expression associated with fragile X mental retardation protein deficiency. *Mol Cell Neurosci.* 2002;19(2):138-51.
- Li MQ, Zhang WW, Chen T, Liu L. [Protective effects of levetiracetam and simvastatin on pilocarpine-induced epilepsy in rat models]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2015;46(2):201-4.
- Liang D, Li G, Liao X, Yu D, Wu J, Zhang M. Developmental loss of parvalbumin-positive cells in the prefrontal cortex and psychiatric anxiety after intermittent hypoxia exposures in neonatal rats might be mediated by NADPH oxidase-2. *Behav Brain Res.* 2015;296:134-40.
- Lim R, Acharya R, Delpachitra P, Hobson S, Sobey CG, Drummond GR, y col. Activin and NADPH-oxidase in preeclampsia: insights from in vitro and murine studies. *Am J Obstet Gynecol.* 2014.
- Lima FD, Souza MA, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Martignoni FV, y col. Na⁺,K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav Brain Res.* 2008;193(2):306-10.
- Linder B, Plottner O, Kroiss M, Hartmann E, Laggerbauer B, Meister G, y col. Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Hum Mol Genet.* 2008;17(20):3236-46.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 1987;92(2):180-5.
- Liu W, Jiang F, Bi X, Zhang YQ. Drosophila FMRP participates in the DNA damage response by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis. *Hum Mol Genet.* 2012;21(21):4655-68.
- Liu X, Gao Y, An Y, Fu X, Li Y, Sun D, y col. Neuroglobin Plays a Protective Role in Arsenite-Induced Cytotoxicity by Inhibition of Cdc42 and Rac1GTPases in Rat Cerebellar Granule Neurons. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(4):1613-27.
- Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* 1996;730(1-2):32-9.
- Louhivuori V, Arvio M, Soronen P, Oksanen V, Paunio T, Castren ML. The Val66Met polymorphism in the BDNF gene is associated with epilepsy in fragile X syndrome. *Epilepsy Res.* 2009;85(1):114-7.

- Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet.* 1969;21(3):231-44.
- Lull ME, Levesque S, Surace MJ, Block ML. Chronic apocynin treatment attenuates beta amyloid plaque size and microglial number in hAPP(751)(SL) mice. *PLoS One.* 2011;6(5):e20153.
- Mack NA, Whalley HJ, Castillo-Lluva S, Malliri A. The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell Cycle.* 2011;10(10):1571-81.
- Maes B, Fryns JP, Van Walleggem M, Van den Berghe H. Cognitive functioning and information processing of adult mentally retarded men with fragile-X syndrome. *Am J Med Genet.* 1994;50(2):190-200.
- Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004;44(1):5-21.
- Mandela P, Yan Y, LaRese T, Eipper BA, Mains RE. Elimination of Kalrn expression in POMC cells reduces anxiety-like behavior and contextual fear learning. *Horm Behav.* 2014;66(2):430-8.
- Mander P, Brown GC. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2005;2:20.
- Manna SK, Babajan B, Raghavendra PB, Raviprakash N, Sureshkumar C. Inhibiting TRAF2-mediated activation of NF-kappaB facilitates induction of AP-1. *J Biol Chem.* 2010;285(15):11617-27.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008;275(15):3959-70.
- Martin JP, Bell J. A Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage. *J Neurol Psychiatry.* 1943;6(3-4):154-7.
- Martinez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(1):17-29.
- McBride SM, Bell AJ, Jongens TA. Behavior in a Drosophila model of fragile X. *Results Probl Cell Differ.* 2012;54:83-117.
- McBride SM, Choi CH, Wang Y, Liebelt D, Braunstein E, Ferreiro D, y col. Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a Drosophila model of fragile X syndrome. *Neuron.* 2005;45(5):753-64.
- McBride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D, Watson K, y col. Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron.* 1999;24(4):967-77.
- McKinney BC, Grossman AW, Elisseou NM, Greenough WT. Dendritic spine abnormalities in the occipital cortex of C57BL/6 Fmr1 knockout mice. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;136B(1):98-102.
- McLennan Y, Polussa J, Tassone F, Hagerman R. Fragile x syndrome. *Curr Genomics.* 2011;12(3):216-24.

- McNaughton CH, Moon J, Strawderman MS, Maclean KN, Evans J, Strupp BJ. Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav Neurosci*. 2008;122(2):293-300.
- Meng R, Zhu DL, Bi Y, Yang DH, Wang YP. Anti-oxidative effect of apocynin on insulin resistance in high-fat diet mice. *Ann Clin Lab Sci*. 2011;41(3):236-43.
- Menon RP, Gibson TJ, Pastore A. The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *J Mol Biol*. 2004;343(1):43-53.
- Meredith RM, Mansvelder HD. STDP and Mental Retardation: Dysregulation of Dendritic Excitability in Fragile X Syndrome. *Front Synaptic Neurosci*. 2010;2:10.
- Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):344-56.
- Michalon A, Bruns A, Risterucci C, Honer M, Ballard TM, Ozmen L, y col. Chronic metabotropic glutamate receptor 5 inhibition corrects local alterations of brain activity and improves cognitive performance in fragile X mice. *Biol Psychiatry*. 2014;75(3):189-97.
- Michalon A, Sidorov M, Ballard TM, Ozmen L, Spooren W, Wettstein JG, y col. Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron*. 2012;74(1):49-56.
- Miller DK, Oelrichs CE, Sun GY, Simonyi A. Subchronic apocynin treatment attenuates methamphetamine-induced dopamine release and hyperactivity in rats. *Life Sci*. 2014;98(1):6-11.
- Miller LJ, McIntosh DN, McGrath J, Shyu V, Lampe M, Taylor AK, y col. Electrodermal responses to sensory stimuli in individuals with fragile X syndrome: a preliminary report. *Am J Med Genet*. 1999;83(4):268-79.
- Min WW, Yuskaitis CJ, Yan Q, Sikorski C, Chen S, Jope RS, y col. Elevated glycogen synthase kinase-3 activity in Fragile X mice: key metabolic regulator with evidence for treatment potential. *Neuropharmacology*. 2009;56(2):463-72.
- Mines MA, Yuskaitis CJ, King MK, Beurel E, Jope RS. GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One*. 2010;5(3):e9706.
- Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, y col. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *Fmr1* null mice. *Neuron*. 2003;37(3):417-31.
- Mongin AA, Dohare P, Jourdeuil D. Selective vulnerability of synaptic signaling and metabolism to nitrosative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(7):992-1012.
- Morita A, Yamashita N, Sasaki Y, Uchida Y, Nakajima O, Nakamura F, y col. Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci*. 2006;26(11):2971-80.

- Muddashetty R, Bassell GJ. A boost in microRNAs shapes up the neuron. *EMBO J*. 2009;28(6):617-8.
- Muddashetty RS, Nalavadi VC, Gross C, Yao X, Xing L, Laur O, y col. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell*. 2011;42(5):673-88.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
- Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione Morelli MA, Nilges M, Gibson TJ, y col. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*. 1996;85(2):237-45.
- Musumeci SA, Bosco P, Calabrese G, Bakker C, De Sarro GB, Elia M, y col. Audiogenic seizures susceptibility in transgenic mice with fragile X syndrome. *Epilepsia*. 2000;41(1):19-23.
- Musumeci SA, Hagerman RJ, Ferri R, Bosco P, Dalla Bernardina B, Tassinari CA, y col. Epilepsy and EEG findings in males with fragile X syndrome. *Epilepsia*. 1999;40(8):1092-9.
- Myrick LK, Hashimoto H, Cheng X, Warren ST. Human FMRP contains an integral tandem Agenet (Tudor) and KH motif in the amino terminal domain. *Hum Mol Genet*. 2015;24(6):1733-40.
- Nakamoto M, Nalavadi V, Epstein MP, Narayanan U, Bassell GJ, Warren ST. Fragile X mental retardation protein deficiency leads to excessive mGluR5-dependent internalization of AMPA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(39):15537-42.
- Napoli I, Mercaldo V, Boyl PP, Eleuteri B, Zalfa F, De Rubeis S, y col. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*. 2008;134(6):1042-54.
- Naumann A, Hochstein N, Weber S, Fanning E, Doerfler W. A distinct DNA-methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. 2009;85(5):606-16.
- Nelson DL, Orr HT, Warren ST. The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron*. 2013;77(5):825-43.
- Nelson EJ, Connolly J, McArthur P. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol Cell*. 2003;95(1):3-8.
- Neri G, Chiurazzi P. X-linked mental retardation. *Adv Genet*. 1999;41:55-94.
- Neuhofer D, Henstridge CM, Dudok B, Sepers M, Lassalle O, Katona I, y col. Functional and structural deficits at accumbens synapses in a mouse model of Fragile X. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:100.
- Newey SE, Velamoor V, Govek EE, Van Aelst L. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol*. 2005;64(1):58-74.
- Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*. 2001;21(14):5139-46.

- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:313-53.
- Nolin SL, Dobkin C, Brown WT. Molecular analysis of fragile X syndrome. *Curr Protoc Hum Genet.* 2003;Chapter 9:Unit9 5.
- Nolin SL, Glicksman A, Houck GE, Jr., Brown WT, Dobkin CS. Mosaicism in fragile X affected males. *Am J Med Genet.* 1994;51(4):509-12.
- Nolin SL, Houck GE, Jr., Gargano AD, Blumstein H, Dobkin CS, Brown WT. FMR1 CGG-repeat instability in single sperm and lymphocytes of fragile-X premutation males. *Am J Hum Genet.* 1999;65(3):680-8.
- Nosyreva ED, Huber KM. Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol.* 2006;95(5):3291-5.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, y col. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* 1991;252(5009):1097-102.
- Obrenovitch TP. Amyotrophic lateral sclerosis, excitotoxicity and riluzole. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(1):9-11.
- Olmos-Serrano JL, Paluszkiwicz SM, Martin BS, Kaufmann WE, Corbin JG, Huntsman MM. Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci.* 2010;30(29):9929-38.
- Oostra BA, Chiurazzi P. The fragile X gene and its function. *Clin Genet.* 2001;60(6):399-408.
- Osterweil EK, Chuang SC, Chubykin AA, Sidorov M, Bianchi R, Wong RK, y col. Lovastatin corrects excess protein synthesis and prevents epileptogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuron.* 2013;77(2):243-50.
- Pacey LK, Heximer SP, Hampson DR. Increased GABA(B) receptor-mediated signaling reduces the susceptibility of fragile X knockout mice to audiogenic seizures. *Mol Pharmacol.* 2009;76(1):18-24.
- Pacey LK, Tharmalingam S, Hampson DR. Subchronic administration and combination metabotropic glutamate and GABAB receptor drug therapy in fragile X syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(3):897-905.
- Peier AM, McIlwain KL, Kenneson A, Warren ST, Paylor R, Nelson DL. (Over)correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. *Hum Mol Genet.* 2000;9(8):1145-59.
- Peprah E. Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations. *Ann Hum Genet.* 2012;76(2):178-91.
- Peters EA, Hiltermann JT, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1442-7.
- Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature.* 1995;375(6526):68-73.

- Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci.* 1992;106(2):274-85.
- Piazzon N, Rage F, Schlotter F, Moine H, Branlant C, Massenet S. In vitro and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5598-610.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, y col. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* 1991;66(4):817-22.
- Pietrobono R, Tabolacci E, Zalfa F, Zito I, Terracciano A, Moscato U, y col. Molecular dissection of the events leading to inactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 2005;14(2):267-77.
- Pietropaolo S, Guilleminot A, Martin B, D'Amato FR, Crusio WE. Genetic-background modulation of core and variable autistic-like symptoms in Fmr1 knock-out mice. *PLoS One.* 2011;6(2):e17073.
- Pilpel Y, Kollerker A, Berberich S, Ginger M, Frick A, Mientjes E, y col. Synaptic ionotropic glutamate receptors and plasticity are developmentally altered in the CA1 field of Fmr1 knockout mice. *J Physiol.* 2009;587(Pt 4):787-804.
- Pinheiro LP, Linden R, Mariante RM. Activation and function of murine primary microglia in the absence of the prion protein. *J Neuroimmunol.* 2015;286:25-32.
- Pintado E, de Diego Y, Hmadcha A, Carrasco M, Sierra J, Lucas M. Instability of the CGG repeat at the FRAXA locus and variable phenotypic expression in a large fragile X pedigree. *J Med Genet.* 1995;32(11):907-8.
- Pop AS, Levenga J, de Esch CE, Buijsen RA, Nieuwenhuizen IM, Li T, y col. Rescue of dendritic spine phenotype in Fmr1 KO mice with the mGluR5 antagonist AFQ056/Mavoglurant. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231(6):1227-35.
- Portera-Cailliau C. Which comes first in fragile X syndrome, dendritic spine dysgenesis or defects in circuit plasticity? *Neuroscientist.* 2012;18(1):28-44.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):3-33.
- Pugin A, Faundes V, Maria LS, Curotto B, Aliaga S, Salas I, y col. Clinical, molecular, and pharmacological aspects of FMR1 related disorders. *Neurologia.* 2014.
- Qin M, Kang J, Smith CB. Increased rates of cerebral glucose metabolism in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15758-63.
- Ramakers GJ, Wolfer D, Rosenberger G, Kuchenbecker K, Kreienkamp HJ, Prange-Kiel J, y col. Dysregulation of Rho GTPases in the alphaPix/Arhgef6

- mouse model of X-linked intellectual disability is paralleled by impaired structural and synaptic plasticity and cognitive deficits. *Hum Mol Genet.* 2012;21(2):268-86.
- Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel TA, y col. The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. *Structure.* 2006;14(1):21-31.
 - Raz L, Zhang QG, Zhou CF, Han D, Gulati P, Yang LC, y col. Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat. *PLoS One.* 2010;5(9):e12606.
 - Rebec GV, Barton SJ, Marseilles AM, Collins K. Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport.* 2003;14(9):1263-5.
 - Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ, y col. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003;348(14):1333-41.
 - Restivo L, Ferrari F, Passino E, Sgobio C, Bock J, Oostra BA, y col. Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(32):11557-62.
 - Reyniers E, Vits L, De Boulle K, Van Roy B, Van Velzen D, de Graaff E, y col. The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet.* 1993;4(2):143-6.
 - Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 2000;23(5):209-16.
 - Romero-Zerbo Y, Decara J, el Bekay R, Sanchez-Salido L, Del Arco-Herrera I, de Fonseca FR, y col. Protective effects of melatonin against oxidative stress in Fmr1 knockout mice: a therapeutic research model for the fragile X syndrome. *J Pineal Res.* 2009;46(2):224-34.
 - Rooms L, Kooy RF. Advances in understanding fragile X syndrome and related disorders. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23(6):601-6.
 - Rousseau F, Robb LJ, Rouillard P, Der Kaloustian VM. No mental retardation in a man with 40% abnormal methylation at the FMR-1 locus and transmission of sperm cell mutations as premutations. *Hum Mol Genet.* 1994;3(6):927-30.
 - Rudelli RD, Brown WT, Wisniewski K, Jenkins EC, Laure-Kamionowska M, Connell F, y col. Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol.* 1985;67(3-4):289-95.
 - Saldarriaga W, Tassone F, Gonzalez-Teshima LY, Forero-Forero JV, Ayala-Zapata S, Hagerman R. Fragile X syndrome. *Colomb Med (Cali).* 2014;45(4):190-8.

- Sananbenesi F, Fischer A, Wang X, Schrick C, Neve R, Radulovic J, y col. A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nat Neurosci.* 2007;10(8):1012-9.
- Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J.* 2001;20(17):4803-13.
- Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(2):211-5.
- Seese RR, Babayan AH, Katz AM, Cox CD, Lauterborn JC, Lynch G, y col. LTP induction translocates cortactin at distant synapses in wild-type but not *Fmr1* knock-out mice. *J Neurosci.* 2012;32(21):7403-13.
- Serra JA, Dominguez RO, de Lustig ES, Guareschi EM, Famulari AL, Bartolome EL, y col. Parkinson's disease is associated with oxidative stress: comparison of peripheral antioxidant profiles in living Parkinson's, Alzheimer's and vascular dementia patients. *J Neural Transm.* 2001;108(10):1135-48.
- Sinden RR. Neurodegenerative diseases. Origins of instability. *Nature.* 2001;411(6839):757-8.
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell.* 1993;74(2):291-8.
- Sjekloca L, Konarev PV, Eccleston J, Taylor IA, Svergun DI, Pastore A. A study of the ultrastructure of fragile-X-related proteins. *Biochem J.* 2009;419(2):347-57.
- Skinner M, Hooper S, Hatton DD, Roberts J, Mirrett P, Schaaf J, y col. Mapping nonverbal IQ in young boys with fragile X syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005;132A(1):25-32.
- Slegtenhorst-Eegdeman KE, de Rooij DG, Verhoef-Post M, van de Kant HJ, Bakker CE, Oostra BA, y col. Macroorchidism in FMR1 knockout mice is caused by increased Sertoli cell proliferation during testicular development. *Endocrinology.* 1998;139(1):156-62.
- Slotnick BM. Fear behavior and passive avoidance deficits in mice with amygdala lesions. *Physiol Behav.* 1973;11(5):717-20.
- Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, y col. Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. *Hum Mol Genet.* 1995;4(11):2103-8.
- Smit HF, Kroes BH, van den Berg AJ, van der Wal D, van den Worm E, Beukelman CJ, y col. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *J Ethnopharmacol.* 2000;73(1-2):101-9.
- Sokol RJ. Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Annu Rev Nutr.* 1988;8:351-73.
- Sorce S, Krause KH. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(10):2481-504.

- Spencer CM, Alekseyenko O, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Paylor R. Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* 2005;4(7):420-30.
- Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11(1):95-102.
- Sullivan K, Hatton D, Hammer J, Sideris J, Hooper S, Ornstein P, y col. ADHD symptoms in children with FXS. *Am J Med Genet A.* 2006;140(21):2275-88.
- Sullivan K, Hooper S, Hatton D. Behavioural equivalents of anxiety in children with fragile X syndrome: parent and teacher report. *J Intellect Disabil Res.* 2007;51(Pt 1):54-65.
- Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science.* 1977;197(4300):265-6.
- Tabolacci E, Moscato U, Zalfa F, Bagni C, Chiurazzi P, Neri G. Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(12):1487-98.
- Tamanini F, Willemsen R, van Unen L, Bontekoe C, Galjaard H, Oostra BA, y col. Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1315-22.
- Tan W, Xue-Bin C, Tian Z, Xiao-Wu C, Pei-Pei H, Zhi-Bin C, y col. Effects of simvastatin on the expression of inducible nitric oxide synthase and brain-derived neurotrophic factor in a lipopolysaccharide-induced rat model of Parkinson disease. *Int J Neurosci.* 2015.
- Tassone F, Beilina A, Carosi C, Albertosi S, Bagni C, Li L, y col. Elevated FMR1 mRNA in premutation carriers is due to increased transcription. *RNA.* 2007;13(4):555-62.
- Tassone F, Hagerman R. The fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Results Probl Cell Differ.* 2012;54:337-57.
- Tassone F, Hagerman RJ, Ikle DN, Dyer PN, Lampe M, Willemsen R, y col. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1999;84(3):250-61.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Gane LW, Godfrey TE, Hagerman PJ. Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet.* 2000;66(1):6-15.
- Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Mills JB, Harris SW, Gane LW, y col. Clinical involvement and protein expression in individuals with the FMR1 premutation. *Am J Med Genet.* 2000;91(2):144-52.
- Tassone F, Longshore J, Zunich J, Steinbach P, Salat U, Taylor AK. Tissue-specific methylation differences in a fragile X premutation carrier. *Clin Genet.* 1999;55(5):346-51.

- Taylor AK, Tassone F, Dyer PN, Hersch SM, Harris JB, Greenough WT, y col. Tissue heterogeneity of the FMR1 mutation in a high-functioning male with fragile X syndrome. *Am J Med Genet.* 1999;84(3):233-9.
- Tejada-Simon MV. Modulation of actin dynamics by Rac1 to target cognitive function. *J Neurochem.* 2015;133(6):767-79.
- Theard MA, Baughman VL, Wang Q, Pelligrino DA, Albrecht RF. The role of nitric oxide in modulating brain activity and blood flow during seizure. *Neuroreport.* 1995;6(6):921-4.
- Thomson L. 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis. *Dis Markers.* 2015;2015:708282.
- Tian H, Cao YX, Zhang XS, Liao WP, Yi YH, Lian J, y col. The targeting and functions of miRNA-383 are mediated by FMRP during spermatogenesis. *Cell Death Dis.* 2013;4:e617.
- Till SM, Asiminas A, Jackson AD, Katsanevaki D, Barnes SA, Osterweil EK, y col. Conserved hippocampal cellular pathophysiology but distinct behavioural deficits in a new rat model of FXS. *Hum Mol Genet.* 2015.
- Till SM, Wijetunge LS, Seidel VG, Harlow E, Wright AK, Bagni C, y col. Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 2012;21(10):2143-56.
- Toliaf KF, Bikoff JB, Burette A, Paradis S, Harrar D, Tavazoie S, y col. The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron.* 2005;45(4):525-38.
- Toliaf KF, Bikoff JB, Kane CG, Toliaf CS, Hu L, Greenberg ME. The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7265-70.
- Tucker B, Hepperle C, Kortschak D, Rainbird B, Wells S, Oates AC, y col. Zebrafish Angiotensin II Receptor-like 1a (*agtr1a*) is expressed in migrating hypoblast, vasculature, and in multiple embryonic epithelia. *Gene Expr Patterns.* 2007;7(3):258-65.
- Tucker B, Richards R, Lardelli M. Expression of three zebrafish orthologs of human FMR1-related genes and their phylogenetic relationships. *Dev Genes Evol.* 2004;214(11):567-74.
- Turner G, Daniel A, Frost M. X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. *J Pediatr.* 1980;96(5):837-41.
- Turner G, Eastman C, Casey J, McLeay A, Procopis P, Turner B. X-linked mental retardation associated with macro-orchidism. *J Med Genet.* 1975;12(4):367-71.
- Tuskova R, Liptak B, Szomolanyi P, Vancova O, Ulicna O, Sumbalova Z, y col. Neuronal marker recovery after Simvastatin treatment in dementia in the rat brain: in vivo magnetic resonance study. *Behav Brain Res.* 2015;284:257-64.

- Ulatowski LM, Manor D. Vitamin E and neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2015.
- Valverde R, Edwards L, Regan L. Structure and function of KH domains. *FEBS J.* 2008;275(11):2712-26.
- Valverde R, Pozdnyakova I, Kajander T, Venkatraman J, Regan L. Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. *Structure.* 2007;15(9):1090-8.
- van 't Padje S, Engels B, Blondin L, Severijnen LA, Verheijen F, Oostra BA, y col. Characterisation of Fmrp in zebrafish: evolutionary dynamics of the *fmr1* gene. *Dev Genes Evol.* 2005;215(4):198-206.
- Van Dam D, D'Hooge R, Hauben E, Reyniers E, Gantois I, Bakker CE, y col. Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in Fmr1 knockout mice. *Behav Brain Res.* 2000;117(1-2):127-36.
- van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2009;88(1):64-75.
- van der Veen RC, Dietlin TA, Hofman FM, Pen L, Segal BH, Holland SM. Superoxide prevents nitric oxide-mediated suppression of helper T lymphocytes: decreased autoimmune encephalomyelitis in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase knockout mice. *J Immunol.* 2000;164(10):5177-83.
- van Lent PL, Nabbe KC, Blom AB, Sloetjes A, Holthuysen AE, Kolls J, y col. NADPH-oxidase-driven oxygen radical production determines chondrocyte death and partly regulates metalloproteinase-mediated cartilage matrix degradation during interferon-gamma-stimulated immune complex arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R885-95.
- Vanhatalo S, Riikonen R. Markedly elevated nitrate/nitrite levels in the cerebrospinal fluid of children with progressive encephalopathy with edema, hysarrhythmia, and optic atrophy (PEHO syndrome). *Epilepsia.* 2000;41(6):705-8.
- Vanhatalo S, Riikonen R. Nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites in the cerebrospinal fluid in children with west syndrome. *Epilepsy Res.* 2001;46(1):3-13.
- Veeraragavan S, Bui N, Perkins JR, Yuva-Paylor LA, Carpenter RL, Paylor R. Modulation of behavioral phenotypes by a muscarinic M1 antagonist in a mouse model of fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;217(1):143-51.
- Veeraragavan S, Graham D, Bui N, Yuva-Paylor LA, Wess J, Paylor R. Genetic reduction of muscarinic M4 receptor modulates analgesic response and acoustic startle response in a mouse model of fragile X syndrome (FXS). *Behav Brain Res.* 2012;228(1):1-8.
- Ventura R, Pascucci T, Catania MV, Musumeci SA, Puglisi-Allegra S. Object recognition impairment in Fmr1 knockout mice is reversed by amphetamine:

- involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. *Behav Pharmacol.* 2004;15(5-6):433-42.
- Verdyck P, Berckmoes V, De Vos A, Verpoest W, Liebaers I, Bonduelle M, y col. Chromosome fragility at FRAXA in human cleavage stage embryos at risk for fragile X syndrome. *Am J Med Genet A.* 2015.
 - Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, y col. Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature.* 1993;363(6431):722-4.
 - Verkerk AJ, de Graaff E, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, y col. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet.* 1993;2(8):1348.
 - Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, y col. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* 1991;65(5):905-14.
 - von Bohlen Und Halbach O. Dendritic spine abnormalities in mental retardation. *Cell Tissue Res.* 2010;342(3):317-23.
 - Wan L, Dockendorff TC, Jongens TA, Dreyfuss G. Characterization of dFMR1, a *Drosophila melanogaster* homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol Cell Biol.* 2000;20(22):8536-47.
 - Wang H, Kim SS, Zhuo M. Roles of fragile X mental retardation protein in dopaminergic stimulation-induced synapse-associated protein synthesis and subsequent α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-4-propionate (AMPA) receptor internalization. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21888-901.
 - Wang TJ, Stafford RS, Ausiello JC, Chaisson CE. Randomized clinical trials and recent patterns in the use of statins. *Am Heart J.* 2001;141(6):957-63.
 - Wei H, Dobkin C, Sheikh AM, Malik M, Brown WT, Li X. The therapeutic effect of memantine through the stimulation of synapse formation and dendritic spine maturation in autism and fragile X syndrome. *PLoS One.* 2012;7(5):e36981.
 - Weiler IJ, Greenough WT. Synaptic synthesis of the Fragile X protein: possible involvement in synapse maturation and elimination. *Am J Med Genet.* 1999;83(4):248-52.
 - Weisz ED, Monyak RE, Jongens TA. Deciphering Discord: How *Drosophila* research has enhanced our understanding of the importance of FMRP in different spatial and temporal contexts. *Exp Neurol.* 2015.
 - Wilding J, Cornish K, Munir F. Further delineation of the executive deficit in males with fragile-X syndrome. *Neuropsychologia.* 2002;40(8):1343-9.
 - Wilson BM, Cox CL. Absence of metabotropic glutamate receptor-mediated plasticity in the neocortex of fragile X mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(7):2454-9.
 - Wirojanan J, Jacquemont S, Diaz R, Bacalman S, Anders TF, Hagerman RJ, y col. The efficacy of melatonin for sleep problems in children with autism,

- fragile X syndrome, or autism and fragile X syndrome. *J Clin Sleep Med*. 2009;5(2):145-50.
- Wisniewski KE, Segan SM, Mizejeski CM, Sersen EA, Rudelli RD. The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am J Med Genet*. 1991;38(2-3):476-80.
 - Wohrle D, Schwemmle S, Steinbach P. DNA methylation and triplet repeat stability: new proposals addressing actual questions on the CGG repeat of fragile X syndrome. *Am J Med Genet*. 1996;64(2):266-7.
 - Wolff JJ, Hazlett HC, Lightbody AA, Reiss AL, Piven J. Repetitive and self-injurious behaviors: associations with caudate volume in autism and fragile X syndrome. *J Neurodev Disord*. 2013;5(1):12.
 - Woolley CS, McEwen BS. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci*. 1994;14(12):7680-7.
 - Wu P, Ding ZB, Meng SQ, Shen HW, Sun SC, Luo YX, y col. Differential role of Rac in the basolateral amygdala and cornu ammonis 1 in the reconsolidation of auditory and contextual Pavlovian fear memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(15):2909-19.
 - Xiao L, Hu C, Yang W, Guo D, Li C, Shen W, y col. NMDA receptor couples Rac1-GEF Tiam1 to direct oligodendrocyte precursor cell migration. *Glia*. 2013;61(12):2078-99.
 - Xie W, Dolzhanskaya N, LaFauci G, Dobkin C, Denman RB. Tissue and developmental regulation of fragile X mental retardation 1 exon 12 and 15 isoforms. *Neurobiol Dis*. 2009;35(1):52-62.
 - Xu Q, Zhu Z, Xu J, Gu W, Zhao Z. Depressed nNOS expression during spine transition in the developing hippocampus of FMR1 KO mice. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(12):1234-9.
 - Yamaguchi M, Okamoto K, Kusano T, Matsuda Y, Suzuki G, Fuse A, y col. The Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Oxidative Stress Markers following Global Brain Ischemia Reperfusion Injury in C57BL/6 Mice. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133980.
 - Yan QJ, Asafo-Adjei PK, Arnold HM, Brown RE, Bauchwitz RP. A phenotypic and molecular characterization of the *fmr1-tm1Cgr* fragile X mouse. *Genes Brain Behav*. 2004;3(6):337-59.
 - Yan QJ, Rammal M, Tranfaglia M, Bauchwitz RP. Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology*. 2005;49(7):1053-66.
 - Yang L, Zheng J, Xu R, Zhang Y, Gu L, Dong J, y col. Melatonin suppresses hypoxia-induced migration of HUVECs via inhibition of ERK/Rac1 activation. *Int J Mol Sci*. 2014;15(8):14102-21.
 - Yrigollen CM, Durbin-Johnson B, Gane L, Nelson DL, Hagerman R, Hagerman PJ, y col. AGG interruptions within the maternal FMR1 gene

- reduce the risk of offspring with fragile X syndrome. *Genet Med.* 2012;14(8):729-36.
- Yuhas J, Cordeiro L, Tassone F, Ballinger E, Schneider A, Long JM, y col. Brief report: Sensorimotor gating in idiopathic autism and autism associated with fragile X syndrome. *J Autism Dev Disord.* 2011;41(2):248-53.
 - Yuste JE, Tarragon E, Campuzano CM, Ros-Bernal F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:322.
 - Zalfa F, Adinolfi S, Napoli I, Kuhn-Holsken E, Urlaub H, Achsel T, y col. Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33403-10.
 - Zara S, Di Stefano A, Nasuti C, Rapino M, Patruno A, Pesce M, y col. NOS-mediated morphological and molecular modifications in rats infused with Abeta (1-40), as a model of Alzheimer's disease, in response to a new lipophilic molecular combination codrug-1. *Exp Gerontol.* 2011;46(4):273-81.
 - Zhang L, Alger BE. Enhanced endocannabinoid signaling elevates neuronal excitability in fragile X syndrome. *J Neurosci.* 2010;30(16):5724-9.
 - Zhang M, Wang Q, Huang Y. Fragile X mental retardation protein FMRP and the RNA export factor NXF2 associate with and destabilize Nxf1 mRNA in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(24):10057-62.
 - Zhang YQ, Bailey AM, Matthies HJ, Renden RB, Smith MA, Speese SD, y col. *Drosophila* fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell.* 2001;107(5):591-603.
 - Zhao MG, Toyoda H, Ko SW, Ding HK, Wu LJ, Zhuo M. Deficits in trace fear memory and long-term potentiation in a mouse model for fragile X syndrome. *J Neurosci.* 2005;25(32):7385-92.
 - Zins K, Lucas T, Reichl P, Abraham D, Aharinejad S. A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice. *PLoS One.* 2013;8(9):e74924.