

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

---

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
PARQUE CIENTÍFICO DE BARCELONA

**Función de Netrina1 y Semaforinas  
secretables en la guía neuronal y axonal en el  
hipocampo y el cerebelo**

**Patricia Guijarro Larraz**  
Programa de Doctorado de Biología Celular  
Bienio 1998-2000

**Barcelona, Abril de 2006**

# **INTRODUCCIÓN**

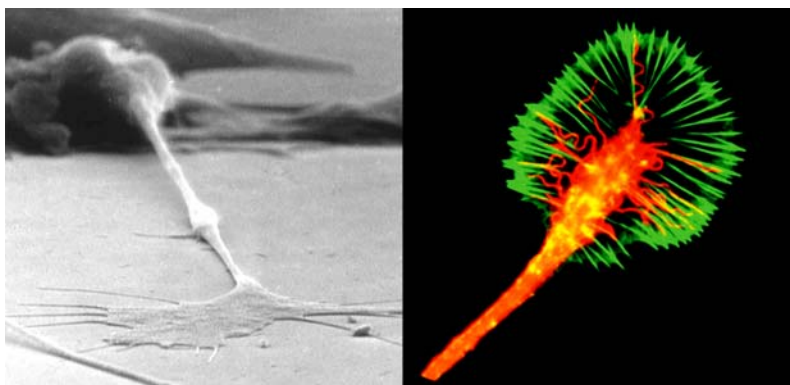


## INTRODUCCIÓN

### I. FACTORES GUÍA Y SU FUNCIÓN EN NAVEGACIÓN NEURONAL DURANTE EL DESARROLLO

#### 1. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo, la guía de neuronas y axones resulta esencial para conseguir una organización celular ordenada y una red de conexiones nerviosas específica, dos rasgos que definen al sistema nervioso adulto. Las neuronas son generadas en regiones proliferativas concretas, para luego migrar hasta su destino básicamente según dos mecanismos: por migración radial, como ocurre en la corteza cerebral, donde las neuronas recién generadas en la zona proliferativa ventricular se desplazan en el plano radial siguiendo fibras gliales; o por migración tangencial, como las interneuronas originadas en regiones subcorticales y destinadas a la corteza e hipocampo, que migran hasta allí en un plano tangencial a la superficie cerebral y siguiendo distintas trayectorias, alguna de las cuales coincide con la de axones corticofugales (para más información sobre modos y mecanismos de migración neuronal, ver (Lambert de Rouvroit y Goffinet, 2001; Marin y Rubenstein, 2003). Una vez alcanzan su posición definitiva, o incluso antes de llegar a ella, las neuronas empiezan a emitir un conjunto de dendritas característico de su fenotipo, y un axón que se extiende a través de rutas determinadas para contactar específicamente con su neurona diana. Tanto la migración de la neurona como la de su axón es dirigida por el mismo grupo de factores guía, familias de proteínas secretables o asociadas a membrana que estimulan en la neurona y en el axón en movimiento vías de señalización también similares (Song y Poo, 2001).



**Figura 1. El cono de crecimiento**

**Izquierda:** imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido, que muestra una neurona en cultivo extendiendo un axón con el cono de crecimiento en su extremo (fotografía de Ken Balazovich, laboratorio de la Dra Tosney, Universidad de Michigan)

**Derecha:** portada de la revista *Journal of Cell Biology*, 157 (5), Mayo 2002. La imagen muestra un cono de crecimiento axonal, con sus haces de actina en verde y sus microtúbulos en rojo (Zhou et al., 2002)

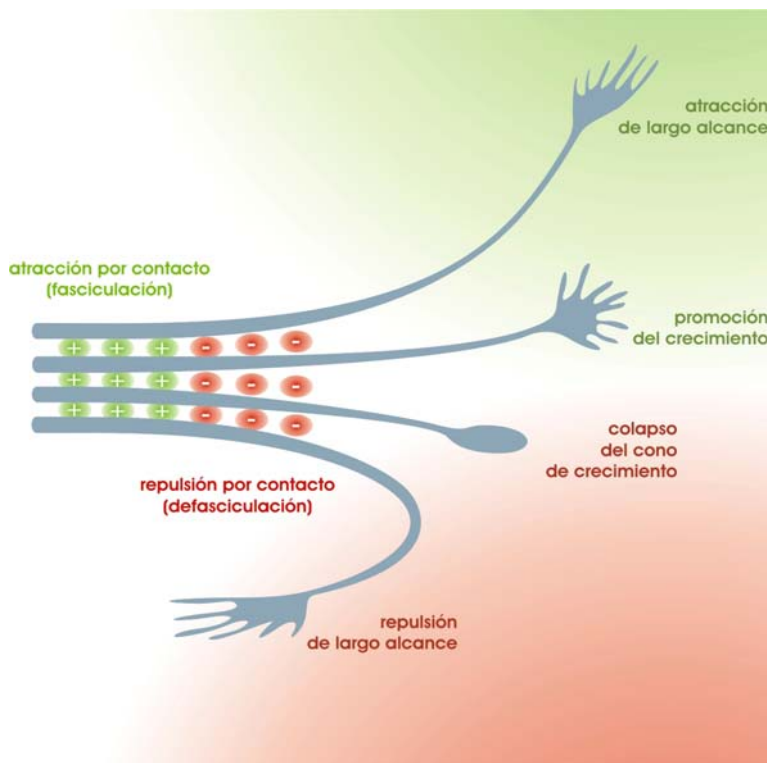
#### 1.2.1. Definición de factor guía

Al igual que otros tipos celulares, las neuronas siguen tres pasos básicos en el proceso de migración: en primer lugar, la extensión de su extremo de avance (*leading edge*), seguido de la translocación del soma neuronal a lo largo de la extensión del extremo anterior (proceso que recibe el nombre de nucleoquinesis), y por último la retracción de su extremo posterior (*tailing process*) (Lambert de Rouvroit y Goffinet, 2001). El extremo de avance de una neurona migrante tiene mucho en común con el cono de crecimiento, situado en el extremo distal del axón en migración. Ambas estructuras son responsables de decidir sobre la dirección a seguir por parte de la neurona y el axón, y para ello exploran el medio que les rodea mediante la proyección en su periferia de dos tipos de expansiones del citoplasma y la membrana plasmática adyacente: lamelipodios, de forma laminar que contienen redes de filamentos de actina, y filopodios, estructuras alargadas y tensas formadas por haces de filamentos de actina que testan continuamente el medio externo (Huber et al., 2003; Lambert de Rouvroit y Goffinet, 2001; Tamagnone y Comoglio, 2004). A través de filopodios y lamelipodios el extremo de avance neuronal y el cono de crecimiento axonal reciben señales de distinta índole, que al ser integradas e interpretadas les

permiten decidir sobre la dirección a tomar; dichas señales son proporcionadas por los llamados factores guía.

**Definición de factor guía.** Un factor guía en navegación neuronal cumple con los siguientes puntos:

- 1) se expresa o sintetiza in vivo en el momento y lugar adecuados para influir sobre la migración o extensión axonal de una población neuronal concreta, aportando básicamente estímulos de dos naturalezas distintas: permisivos y atractivos, o bien inhibitorios y repulsivos;
- 2) la reducción o supresión del factor in vivo produce alteraciones en la migración neuronal o extensión axonal de dicha población;
- 3) tiene actividad quimiotáctica in vitro, o sea, induce el movimiento del axón o neurona hacia la fuente del factor guía (quimioatracción) o lejos de ella (quimiorepulsión) (Song y Poo, 2001; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996).



**Figura 2. Mecanismos de acción de factores guía.**

Los factores guía influyen en la navegación axonal (y también en la migración neuronal) aportando estímulos de dos naturalezas distintas: **positivos o atractivos** (representados en verde), y **negativos o repulsivos** (representados en rojo). Se pueden diferenciar tres mecanismos distintos en la acción de factores guía en axones y neuronas: **a) atracción o repulsión de corto alcance o de contacto**, que permite, por ejemplo, la fasciculación axonal formando haces de fibras nerviosas, y la defasciculación selectiva de dichos haces en puntos concretos; **b) atracción o repulsión de largo alcance**, que permite dirigir al axón o neurona hacia la región diana o evitar la invasión de regiones inapropiadas; **c) estimulación del crecimiento axonal o colapso del cono de crecimiento**, acciones que generan el avance o la detención del cono de crecimiento sin implicar direccionalidad.

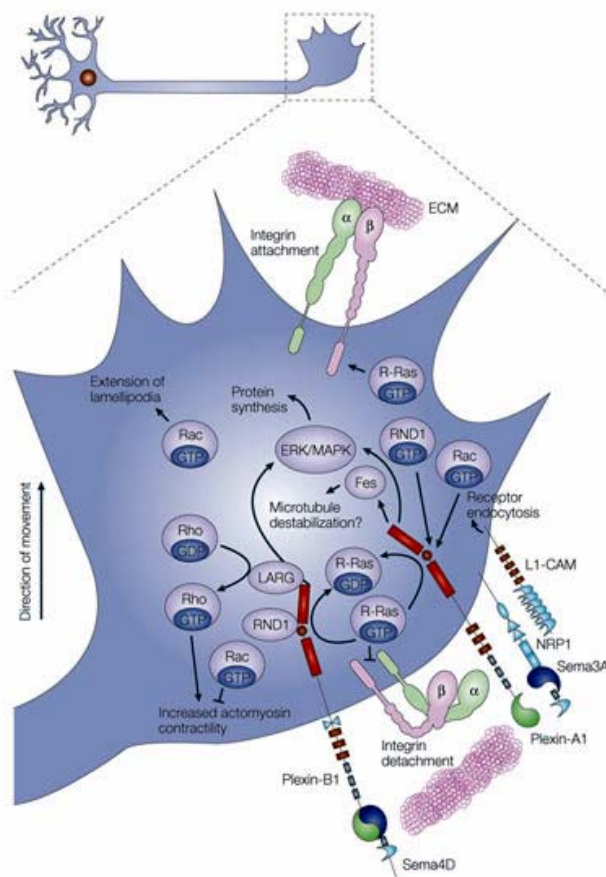
### 1.2.2. Modos de actuación de factores guía

En líneas generales, los factores guía pueden funcionar de distintos modos (figura 2):

- 1) *pueden actuar simplemente como factores permisivos o restrictivos* para la migración neuronal o la extensión axonal, sin aportar información posicional o direccional; es el caso de moléculas de adhesión celular (CAM), especialmente aquellas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que resultan esenciales para la fasciculación axonal (Song y Poo, 2001);
- 2) *pueden aportar información posicional*, como en el caso del sistema Efrinas-Eph en la conexión retinotectal (Martinez y Soriano, 2005), o Reelina en la migración radial de las células de Purkinje en el cerebelo (Miyata et al., 1996; Miyata et al., 1997), donde el factor guía parece más bien actuar como una señal de detención para neuronas o axones en movimiento, sin indicar la dirección a seguir; sin embargo, algunos factores guía también pueden servir como señales direccionales: Reelina presente de forma ectópica en la zona ventricular del cerebelo atrae a células de Purkinje, que se acumulan en esa zona (Miyata et al., 1997).
- 3) *pueden aportar información direccional*, distribuyéndose en forma de gradientes de concentración que atraen o repelen neuronas o axones, y en ocasiones actúan bifuncionalmente: atractivos en un evento de navegación concreto, y repulsivos en otro (Song y Poo, 2001). Es el caso de Netrina que, expresada en la línea media, atrae axones comisurales y neuronas de los núcleos

precerebelares, y al mismo tiempo repele axones trocleares (Alcantara et al., 2000; Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995). Los gradientes de concentración pueden ser de dos tipos: los formados por factores solubles, que una vez secretados difunden por el espacio extracelular y forman gradientes de largo alcance, o bien los formados por factores que permanecen asociados a las membranas celulares o a la matriz extracelular, formando gradientes de corto alcance que funcionan mediante mecanismos de contacto (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Se ha demostrado *in vitro* que varias proteínas secretables forman gradientes de largo alcance que producen la reorientación del axón, como Netrina1, Sema3A, o las neurotrofinas BDNF y NGF (Song et al., 1998); sin embargo, no está claro si los factores secretables *in vivo* difunden en el espacio extracelular, o bien quedan unidos a la superficie celular o a la matriz extracelular (Song y Poo, 2001).

### 1.2.3. Comportamiento neuronal ante un factor guía



**Figura 3. Las semaforinas repelen al cono de crecimiento axonal.**

En el extremo del cono de crecimiento en contacto con semaforinas presentes en células vecinas (como Sema4D en oligodendrocitos) o solubles (como Sema3A), se inician las vías de señalización mediadas por plexinas, que en última instancia producen la inhibición del crecimiento axonal. Al mismo tiempo, en el lado opuesto del cono de crecimiento (donde no hay semaforina), se produce un aumento de la unión a la matriz extracelular mediada por integrinas que facilita el crecimiento. Existe por lo tanto un crecimiento desigual en ambos lados del cono axonal, que causa un cambio de dirección en contra de la fuente de semaforina (adaptado de Kruger et al., 2005)

Se ha descrito una secuencia de eventos que ocurren en el cono de crecimiento axonal (y muy probablemente, también en el extremo de avance de la neurona en migración) tras el encuentro con un factor guía distribuido en gradiente de concentración:

1) *Detección del gradiente del factor guía*, mediante la ocupación desigual de su receptor específico en la superficie del cono de crecimiento, que se traduce primero en un débil gradiente de activación del receptor, y luego en el agrupamiento de varias moléculas de receptor y/o de sus efectores citosólicos, iniciándose así una o varias vías de señalización intracelular.

2) *Amplificación de la señal inicial*. El agrupamiento inicial de receptores y/o efectores específicamente en una zona del cono de crecimiento (allí donde se detectó el gradiente de factor guía) desencadena el reclutamiento y concentración en esa misma zona de más intermediarios de la cascada de señalización, y la consiguiente depleción de dichos intermediarios en el resto del cono; finalmente, la amplificación de la señal intracelular termina en la concentración y ensamblaje de moléculas de actina en un lado del cono de crecimiento según una orientación determinada, por donde se forman nuevas prolongaciones membranosas (filopodios, lamelipodios) que lideran la extensión del axón en la nueva dirección (figura 3).

3) *Adaptación al gradiente de factor guía*. Una vez detectado el factor guía y tras la respuesta inicial (atracción/repulsión), el

cono de crecimiento reajusta su sensibilidad hacia el factor guía mediante un mecanismo llamado adaptación, que consiste en un ciclo de desensibilización y posterior resensibilización del cono de crecimiento hacia las distintas concentraciones del gradiente del factor guía. Tras cada ciclo de adaptación, el axón avanza ascendiendo (atracción) o descendiendo (repulsión) el gradiente del factor guía (Song y Poo, 2001). Mediante el proceso de adaptación, el cono de crecimiento puede, por ejemplo, responder a concentraciones crecientes del factor sin alcanzar la saturación (figura 4). Las dos fases del

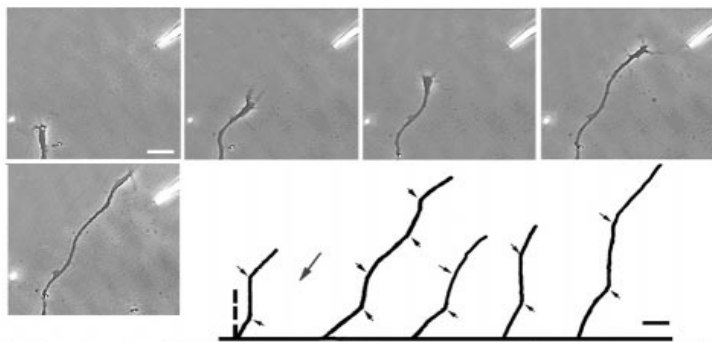
proceso (desensibilización/resensibilización) son específicas de ligando, lo que significa que el cono de crecimiento puede ajustarse a concentraciones crecientes de un factor guía sin que cambie su sensibilidad ante un factor guía distinto o de distinto grupo (ver siguiente párrafo) (Ming et al., 2002; Piper et al., 2005). La fase de desensibilización depende de la endocitosis del receptor específico del factor guía, mientras que la fase de resensibilización requiere actividad de quinasas MAPK y síntesis proteica a nivel local (en el cono de crecimiento, de forma independiente del soma neuronal (Campbell y Holt, 2001; Ming et al., 2002; Piper et al., 2005).

#### 1.2.4. Tipos de factores guía según sus vías de señalización

La unión del factor guía a su receptor específico desencadena la activación de vías de señalización también específicas que, en última instancia, inducen en la neurona un comportamiento determinado (atracción/repulsión). El enlace entre el receptor y las vías de señalización intracelular proporcionan elementos que actúan como mediadores en la transducción de la señal del factor guía en el citosol neuronal, y que en general cumplen con tres requisitos:

- 1) la alteración de su función produce un cambio en el comportamiento neuronal hacia el factor guía;
- 2) son activados en presencia del factor guía (generalmente por unión de éste a su receptor específico);
- 3) la exposición de la neurona al factor guía produce en ésta un gradiente de su actividad desde el lugar inicial de activación (que acostumbra a estar cerca del receptor) (Song y Poo, 2001).

Actualmente existen dos grupos de factores con actividad quimiotáctica (entre los que se incluyen aquellos con funciones de guía axonal y neuronal durante el desarrollo), que se caracterizan por inducir en la célula vías de señalización distintas, mutuamente excluyentes: en el grupo I, al que pertenecen Netrina1, BDNF, NGF, MAG y Ach, la señalización intracelular es dependiente de la actividad de PKA (dependiente de cAMP), PI3K, PLC- $\gamma$ , quinasa dependiente de Calmodulina-Ca<sup>2+</sup> (CaMKII) y Calcineurina (CaN), así como de los niveles de cAMP y Ca<sup>2+</sup>. El grupo II, que incluye Sema3A y NT-3, desencadena una respuesta intracelular que es independiente de la actividad de PI3K y de los niveles de cAMP y Ca<sup>2+</sup>, pero está regulada por cGMP y PKG (dependiente de cGMP) (Ming et al., 1999; Song et al., 1998; Song y Poo, 1999).



**Figura. 4. Adaptación del cono de crecimiento a un gradiente de Netrina1**

El cono de crecimiento es atraído hacia la fuente de Netrina1 (esquina superior derecha), ascendiendo el gradiente del factor quimiotáctico mediante una trayectoria en zig-zag que refleja ciclos consecutivos de desensibilización y resensibilización. Las flechas en el dibujo indican puntos de inflexión en la trayectoria durante el proceso de adaptación del axón (adaptado de Ming et al., 2002).

Aquellos factores quimiotácticos pertenecientes al mismo grupo comparten las mismas vías de señalización; por lo tanto, la presencia en concentración homogénea de uno de ellos puede desensibilizar al cono de crecimiento ante un gradiente de otro factor del mismo grupo, lo que inhibe la respuesta del cono ante el gradiente. Sin embargo, la desensibilización del cono no se produce entre factores guía de grupos distintos, ya que éstos no comparten la misma señalización intracelular (Ming et al., 1999; Ming et al., 2002; Piper et al., 2005).

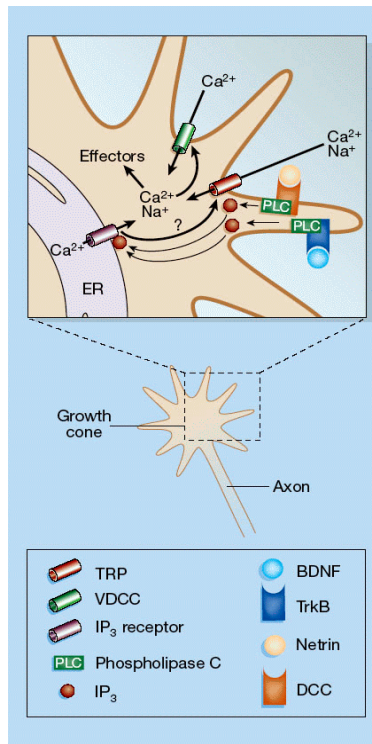
#### 1.2.5. Mediadores en la señal del factor guía

Mediadores comunes a diversos factores guía en la neurona incluyen, entre otros, segundos mensajeros como el calcio, los distintos productos de la actividad de la quinasa PI3K o nucleótidos

cíclicos, y también las pequeñas GTPasas de la familia Rho, que constituyen piezas esenciales en la regulación del citoesqueleto neuronal (Song y Poo, 2001).

**Calcio.** Algunos factores guía, como Netrina1 o Ach, inducen tras su unión a su receptor específico un aumento en el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular, proveniente del medio extracelular y de los almacenes internos celulares (retículo endoplasmático), en neuronas y conos de crecimiento axonales, y al menos en estos últimos se han detectado gradientes de  $Ca^{2+}$  momentáneos a través del citosol (figura 5).  $Ca^{2+}$  influye en numerosas vías de transducción neuronales, a menudo a través de su unión a Calmodulina (Song y Poo, 2001).

**PI3K.** La quinasa PI3K fosforila el fosfolípido minoritario de la membrana plasmática fosfatidil



**Figura 5. Señalización de factores guía dependiente de  $Ca^{2+}$ .**

inositol (PI), dando lugar a diversas formas, fosforiladas como mínimo en la posición 3 del anillo inositol: PI3P, PI(3,4)P2, PI(3,5)P2, PI(3,4,5)P3. Las moléculas de fosfatidil-inositol fosforiladas unen y activan proteínas con dominios específicos (entre los que se encuentra el dominio PH), reclutándolas en distintas membranas celulares y participando así en numerosas funciones celulares, como crecimiento celular, proliferación, locomoción o supervivencia. Uno de los principales efectores de PI3K es PKB, también llamada Akt, implicada en el metabolismo y la supervivencia de la célula, y que resulta necesaria para la quimiotaxis en células de *Dyctiostelium* (Song y Poo, 2001). Se ha demostrado que la actividad de PI3K es necesaria en la vía de señalización de determinados factores guía, como NGF o Netrina1 (Ming et al., 1999).

**Nucleótidos cíclicos.** Se ha observado que la presencia de determinados factores guía (ver más arriba) produce en la neurona un cambio en el nivel de cAMP o de cGMP. De hecho, dicho cambio puede determinar si la respuesta de la neurona ante un factor guía determinado es atractiva o repulsiva (ver más abajo). Los nucleótidos cíclicos inician cascadas de señalización intracelular en la neurona al activar determinadas quinasas: concretamente, cAMP activa PKA, mientras que cGMP activa PKG. Ambos enzimas son responsables de la gran mayoría de respuestas celulares desencadenadas por un cambio en el nivel de nucleótidos cíclicos (Francis y Corbin, 1999).

**Familia Rho de pequeñas GTPasas.** El avance o la retracción del cono de crecimiento (y por extensión, del extremo de avance de la neurona en migración) depende de tres procesos (Huber et al., 2003):

- 1) la polimerización de actina periférica en el extremo de lamelipodios y filopodios;
- 2) la despolimerización de actina en la región proximal del cono;
- 3) la tasa de circulación retrógrada de F-actina en filopodios y lamelipodios.

Los factores guía alteran el movimiento del axón o neurona mediante el control del citoesqueleto neuronal a través de la familia Rho de pequeñas GTPasas, que regulan la polimerización, despolimerización y ramificación de actina, así como la contractibilidad dependiente de actina-miosina, (que a su vez controla el flujo retrógrado de F-actina en el cono de crecimiento) (Huber et al., 2003).



Las GTPasas Rho actúan como interruptores: son activas cuando unen GTP, e inactivas cuando unen GDP. Varios miembros de la familia han sido implicados en motilidad neuronal, de los cuales Rac1, Cdc42 y RhoA son los más estudiados. Rac1 y Cdc42 estimulan la extensión de lamelipodios y filopodios respectivamente en fibroblastos y en el cono de crecimiento neuronal; RhoA estimula la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales en fibroblastos, y genera colapso en el cono de crecimiento y retracción neurítica. (Negishi et al., 2005a; Pasterkamp y Kolodkin, 2003). Por otra parte, las GTPasas Rnd se caracterizan por su baja actividad GTPasa intrínseca y su baja afinidad por GDP, por lo que unen GTP de forma constitutiva y están permanentemente activas. Rnd1 expresado en fibroblastos inhibe la formación de fibras de estrés, e induce el desensamblaje de filamentos de actina y de contactos focales, además de bloquear la adhesión celular; por lo tanto, Rnd1 antagoniza los efectos de la activación de RhoA y Rac1, posiblemente interviniendo en algún punto más arriba de la cadena de señalización de RhoA y Rac1 (Nobes et al., 1998; Wennerberg et al., 2003).

Los estímulos extracelulares regulan la actividad de las Rho GTPasas mediante tres clases de proteínas (Negishi et al., 2005a; Pasterkamp y Kolodkin, 2003):

- proteínas GEF (Guanine Exchange Factors), elementos activadores al facilitar el intercambio de GDP por GTP;
- proteínas GAP (GTPase-Activating Protein), que al estimular la actividad GTPasa de las proteínas Rho, promueven la hidrólisis de GTP a GDP y, por tanto, las inactivan;
- proteínas GDI (Guanine Dissociation Inhibitor) inhibidoras de la disociación de GDP, que también las inactivan.

**Polimerización de actina.** La familia Rho de pequeñas GTPasas controla la polimerización de actina a través de la actividad del complejo Arp2/3, un grupo de siete proteínas altamente conservadas que controla el inicio de la elongación de un filamento de actina (nucleación) a partir de uno ya preexistente (Meyer y Feldman, 2002; Salazar et al., 2003). Arp2/3 estimula la nucleación de filamentos de actina al unir proteínas de la familia Wasp/Scar, que son directos efectores de GTPasas Rho (Huber et al., 2003). Las GTPasas de la familia Rho también influyen en el ensamblaje de nuevas moléculas de G-actina por el extremo distal o “más” (+) de filamentos de actina, que depende de la actividad de la proteína monomérica Profilina. Profilina estimula la extensión de filamentos de actina, ya que une actina-G (unida a ADP) en el extremo+ del filamento e induce un cambio de conformación que estimula el intercambio de ADP por ATP en la molécula de actina; actina-G se convierte entonces en actina-F (unida a ATP) que se incorpora al extremo+ del filamento (Pantaloni y Carlier, 1993). La familia de proteínas Vasp/Ena estimulan la elongación de filamentos de actina mediante dos acciones: al unir complejos Profilina-actina y reclutarlos donde hay remodelación activa del citoesqueleto de actina, y al impedir el bloqueo de la extensión del filamento de actina por parte de proteínas *capping*, función que se ve estimulada por su unión al complejo Profilina-actina (Barzik et al., 2005; Sechi y Wehland, 2004). Aunque existen evidencias en sistemas celulares no neuronales de que Ena/Vasp puede ser controlada por GTPasas Rho, aún no se conoce la relación entre la función de ambas familias de proteínas en neuronas (Huber et al., 2003; Meyer y Feldman, 2002). Sí que se ha demostrado la participación de Ena/Vasp en la formación de filopodios estimulada por Netrina1: la actividad de Ena/Vasp estaría regulada a través de su fosforilación por PKA (Lebrand et al., 2004).

**Despolimerización de actina.** La familia Rho de pequeñas GTPasas puede también controlar la despolimerización de actina. Pak es activada por Cdc42 y Rac, mientras que Rock es activada por Rho. Una vez activas, Pak y Rock fosforilan y activan la quinasa Lim, que a su vez fosforila e inactiva ADF/Cofilina, una proteína de unión a actina que estimula la disociación de monómeros de actina en el extremo- del filamento (Carlier et al., 1997). La quinasa Lim, al fosforilar e inactivar Cofilina, atenúa el desensamblaje de filamentos de actina, mientras que la fosfatasa *Slingshot* defosforila y activa Cofilina, estimulando la depolimerización de actina (Huber et al., 2003).

**Flujo retrógrado de actina.** La familia Rho de pequeñas GTPasas regula el flujo retrógrado de F-actina que se produce en células y conos de crecimiento en activa locomoción. Numerosos estudios en axones del molusco marino *Aplysia* han intentado elucidar los mecanismos implicados en el movimiento del cono de crecimiento (Cramer, 1997). Así, el avance del cono axonal depende de dos procesos aditivos independientes uno del otro: el ensamblaje de nuevas moléculas de actina en el extremo+ o distal de filamentos de actina en las extensiones membranosas del cono (filopodios, lamelipodios), y el

flujo retrógrado (en dirección al extremo- o proximal) de filamentos de actina gracias a la contracción producida por moléculas de miosina no-muscular (Lin et al., 1996). En una situación control existe un flujo retrógrado intenso acompañado de un crecimiento lento del cono de crecimiento, en el que la tasa de ensamblaje de actina es solo ligeramente superior a la tasa de flujo retrógrado; tras la inhibición de miosina, la disminución del flujo retrógrado de actina observada es directamente proporcional al aumento en la protusión de filopodios en el cono y consecuentemente, al crecimiento del axón (Lin et al., 1996). La fosforilación de miosina produce un cambio de conformación en la proteína que expone su punto de unión a actina, además de facilitar su actividad ATPasa dependiente de actina, ambos eventos imprescindibles para generar contracción (Alberts et al., 1992; Huber et al., 2003). Rock y la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) fosforilan y activan miosina; Rock, además, previene la inactivación de miosina al fosforilar e inactivar la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. La fosforilación de MLCK por parte de Pak induce su inactivación, y por tanto, la no-activación de miosina. Rho, a través de Rock, induce la activación de miosina y por tanto, estimula el flujo retrógrado de actina; Cdc42 y Rac, a través de Pak, producen la inactivación de miosina y en consecuencia, la atenuación del flujo retrógrado de actina (Huber et al., 2003).

#### 1.2.6. Modulación de la señal del factor guía

La señal intracelular desencadenada en la neurona por la unión de un factor guía a su receptor específico puede ser modulada, por ejemplo:

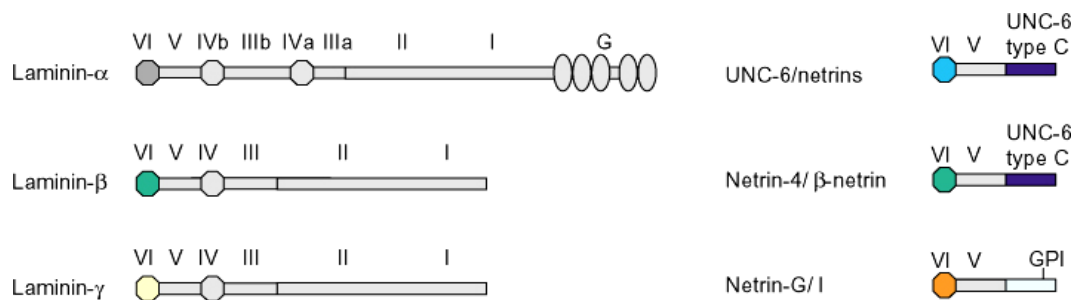
- 1) *por la presencia de un segundo factor guía con el que comparte vías de señalización*, que reduce o suprime la respuesta del cono de crecimiento ante el primer factor guía; a este fenómeno se le llama desensibilización heteróloga, y ya había sido observado previamente en la quimiotaxis de leucocitos (Ming et al., 1999; Song y Poo, 2001).
- 2) *Por la acción de un elemento que cambie la cantidad de receptores en la membrana neuronal o su funcionalidad*, alterando la sensibilidad de la neurona hacia el factor guía en cuestión; precisamente de ese modo actúa la proteína Comm, que expresada en la línea media de *Drosophila*, induce en axones que ya la han cruzado un aumento del nivel de Robo, el receptor específico de Slit, por lo que a partir de entonces dichos axones son sensibles a la acción repulsiva de Slit desde la línea media (Keleman et al., 2002; Keleman et al., 2005; Song y Poo, 2001).
- 3) *Por la composición del complejo receptor específico del factor guía*; así, un gradiente de Netrina1 produce atracción a través de su receptor Dcc, y repulsión a través de Dcc unido a Unc5h (Hong et al., 1999a; Song y Poo, 2001).
- 4) *Por el nivel de nucleótidos cíclicos presente en el citosol de la neurona*, de manera que, ante un mismo factor guía, el aumento favorece atracción, y la disminución favorece repulsión (Song et al., 1998); así, ante un gradiente de Netrina1, la disminución del nivel de cAMP cambia la respuesta atractiva inicial a repulsión, y el aumento del nivel de cGMP cambia la repulsión inducida por un gradiente de Sema3A a atracción (Song y Poo, 2001).



## 2. NETRINAS

### 2.1. Estructura

La familia de las Netrinas (del sánscrito *netr*, “el que guía”) está compuesta por un conjunto de proteínas secretables tradicionalmente relacionadas con la guía de axones y células durante el desarrollo del sistema nervioso. El miembro que da nombre a la familia, Netrina1, fue identificado en cerebro de pollo como la molécula responsable de la actividad quimiotáctica y promotora del crecimiento axonal que posee la placa del suelo de la médula espinal (Serafini et al., 1994). Esta proteína de 78 kDa muestra elevada afinidad por las membranas celulares, aunque su actividad se presenta tanto en forma soluble como asociada a membranas, y su estructura es similar a la de la proteína Unc6, implicada en la guía circunferencial de axones y células y descrita en uno de los varios mutantes del gusano *C.elegans* con distintos fenotipos de descoordinación. (Ishii et al., 1992; Serafini et al., 1994). Netrina1 y Unc6 presentan en su extremo N-terminal una secuencia señal, seguida de una región de elevada similitud con las tres cadenas de la Laminina (y especialmente con sus cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ ). Esta región homóloga a la Laminina la forman el dominio VI o dominio globular, y el dominio V, una región lineal compuesta de tres repeticiones tipo EGF ricas en cisteína, también llamadas VI-3, y que forman parte de numerosas moléculas de matriz extracelular. El extremo C-terminal contiene el dominio C (llamado así por su parecido a la región C-terminal de proteínas del complemento), una región rica en residuos básicos (lo que explica la elevada afinidad de Netrina1 por la heparina) que además presenta un motivo RGD, una secuencia señal para receptores de la familia de las integrinas (figura 6) (Serafini et al., 1994; Yurchenco y Wadsworth, 2004).



**Figura 6. Familia de las Netrinas.**

Las tres clases de Netrinas y las tres cadenas de Laminina son similares en su extremo N-terminal (izquierda de la secuencia) Unc6/Netrina 1 contiene un dominio N-terminal, seguido de dos dominios EGF y de un dominio C-terminal. Netrina4/βNetrina tiene un mayor parecido a la cadena β de la Laminina que las otras dos clases de Netrina. NetrinaG no contiene el dominio C y presenta una molécula GPI en la región C-terminal (adaptado de Yurchenco y Wadsworth, 2004)

Posteriormente, otras proteínas homólogas a Unc6 se han identificado en distintas especies e incorporado a la familia de las Netrinas, todas ellas con un tamaño de entre 70 y 80 kDa y una estructura altamente conservada a lo largo de la evolución. Se pueden distinguir tres subfamilias en base a similitudes estructurales (figura 6) (revisado en Barallobre et al., 2005):

– *las llamadas “Netrinas clásicas” incluyen a Unc6, Netrina1 y otras netrinas.* Comparten dos residuos cisteína adicionales en el dominio VI y en el dominio C. Hay miembros de esta subfamilia en vertebrados e invertebrados, y tradicionalmente se les ha atribuido funciones en la guía de axones y células del sistema nervioso, aunque algunos estudios sugieren su participación en el desarrollo de otros órganos, como la glándula mamaria, el pulmón, el intestino o el páncreas (Yurchenco y Wadsworth, 2004).

– *La subfamilia de Netrina4/β-Netrina.* Si en todos los miembros de la familia, los dos tercios N-terminales muestran similitud con las subunidades β y γ de la Laminina, en el caso de la Netrina4/β-Netrina el dominio VI es el más parecido a la Laminina-β, además de no poseer las dos cisteínas adicionales que sí presenta la anterior subfamilia. Tiene, como otros rasgos estructurales característicos, el dominio C en el extremo C-terminal propio de Unc6 y el residuo triptófano conservado en las distintas subunidades de Laminina. Netrina4/β-Netrina se expresa tanto en tejido nervioso, donde se ha demostrado que promueve el crecimiento axonal en determinados tipos neuronales, como en otros

órganos como hígado, corazón, ovario y vasculatura, donde se localiza en membrana basal (Yurchenco y Wadsworth, 2004).

– *La tercera subfamilia la componen las Netrinas G1 y G2.* Ambas se presentan ancladas a la membrana plasmática mediante una molécula GPI, y no tienen ni el dominio C en el extremo C-terminal ni las dos cisteínas adicionales en el dominio VI, dos características de la subfamilia de las Netrinas clásicas. Además, tampoco poseen el residuo triptófano conservado en las distintas subunidades de Laminina. Ambas proteínas pueden dar lugar, mediante *splicing* alternativo, a distintas isoformas con cambios en sus dominios V y C-terminal. Se expresan básicamente en el sistema nervioso central, y no presentan afinidad por los receptores Dcc o Unc5, aunque recientes estudios han identificado una proteína transmembrana, Ng11, que interacciona con NetrinaG1 (Yurchenco y Wadsworth, 2004).

## **2.2. Función de Netrina1**

Unc6, la primera proteína de la familia de las Netrinas en ser identificada, guía a axones y células hacia la línea media ventral o lejos de ella durante el desarrollo de *C.elegans*. Estudios en el nematodo indican que los dominios de Unc6 actúan tanto de forma modular, participando específicamente en una u otra de las acciones mediadas por Unc6, como de forma paralela, en la que varias señales activadas por distintos dominios coordinan los procesos de guía axonal y celular (Lim y Wadsworth, 2002).

En vertebrados, Netrina1 expresada en la placa del suelo de la médula espinal atrae axones comisurales y repele axones trocleares (Colamarino y Tessier-Lavigne, 1995; Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). En el ratón mutante de Netrina1 se observan defectos en la trayectoria de axones comisurales espinales, así como en otras comisuras del encéfalo, como el cuerpo calloso, la comisura ventral anterior y la hipocampal (Barallobre et al., 2000; Serafini et al., 1996); por lo tanto, al igual que su estructura, la funciones de atracción/ repulsión presentes en la línea media se han mantenido a lo largo de la evolución. La deficiencia en Netrina1 in vivo también impide el desarrollo de parte de los núcleos precerebelares, los núcleos pontinos, ausentes en el ratón mutante (Serafini et al., 1996).

Datos in vitro apuntan que las Netrinas actúan en la migración de distintos tipos de axones y células del sistema nervioso: Netrina1 repele neuronas estriatales (Hamasaki et al., 2001), y precursores oligodendroglicales en la medula espinal (Jarjour et al., 2003), y en cambio atrae precursores de los núcleos precerebelares (Alcantara et al., 2000) y precursores oligodendroglicales en el nervio óptico (Spassky et al., 2002). Netrina1 también ejerce in vitro actividad quimiotáctica en axones retinales, hipocampales, talámicos, corticofugales y cerebelofugales. (Barallobre et al., 2000; Braisted et al., 2000; Metin et al., 1997; Shewan et al., 2002; Shirasaki et al., 1995) (para más información acerca de las funciones de Netrina1 en el desarrollo del sistema nervioso, ver Barallobre et al., 2005).

## **2.3. Receptores de Netrina1**

### 2.3.1. Dcc

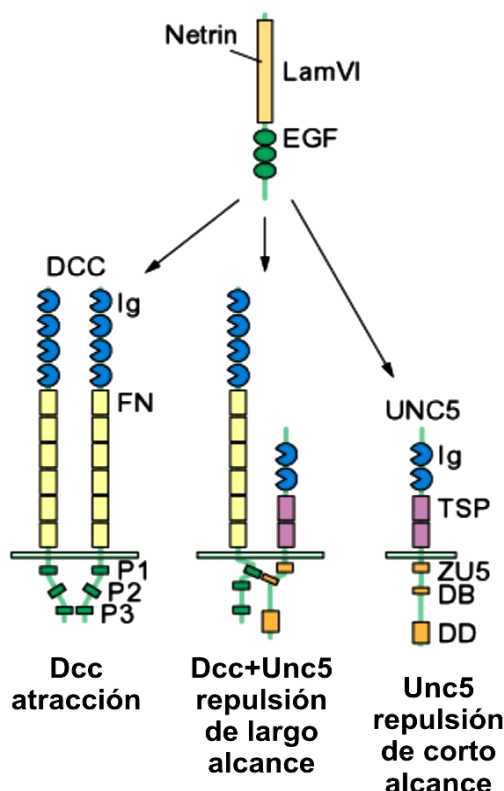
El gen Dcc fue descrito originariamente como un posible supresor de tumores localizado en el brazo largo del cromosoma 18, una región que era frecuentemente eliminada en tumores colorectales humanos (Hedrick et al., 1994). Posteriormente, y debido a su elevada homología con la proteína de *C.elegans* Unc40 (cuya ausencia produce alteraciones en la migración de axones y células parecidas a las causadas por mutaciones en el gen Unc6 (Hedgecock et al., 1990)), se identificó Dcc como un receptor de Netrina1 en vertebrados, ya que unía Netrina1 de forma específica, y anticuerpos contra su dominio extracelular reducían la actividad promotora del crecimiento de axones comisurales espinales mediada por Netrina1 (Keino-Masu et al., 1996; Stein et al., 2001). Además, el ratón mutante nulo de Dcc (cuyos ejemplares homocigotos mueren en edades perinatales) presenta la mayoría de defectos axonales y celulares en el sistema nervioso central que el mutante de Netrina1: defectos en la trayectoria de axones comisurales (más severos), ausencia del cuerpo calloso y la comisura hipocampal y anterior, y ausencia de núcleos pontinos (Fazeli et al., 1997). La familia de receptores Dcc incluye diversas proteínas, todas ellas implicadas en acciones mediadas por Netrinas: Unc40 de *C.elegans*, Frazzled de *Drosophila*, y Dcc y Neogenina de vertebrados. Tienen en común múltiples repeticiones Ig, repeticiones Fibronectina tipo III, un dominio transmembrana y tres dominios intracelulares conservados, llamados P1, P2 y P3 (figura 7) (Huber et al., 2003; Kolodziej et al., 1996). Existe otro alelo mutado de Dcc en

ratón, llamado *Dcc kanga*, que a diferencia del alelo mutado nulo mencionado más arriba, es hipomórfico y sobrevive hasta la edad adulta. El alelo *Dcc kanga* contiene una supresión que afecta al último exón, que codifica el dominio P3 de la región intracelular de *Dcc* (Finger et al., 2002). Las alteraciones observadas en el fenotipo del ratón mutante *Dcc kanga* incluyen ausencia de comisuras (comisura hipocampal, cuerpo caloso, comisura anterior), de los núcleos pontinos y del tracto corticoespinal, así como la ausencia de axones cruzando la línea media (Barallobre et al., 2005).

Desde un principio, *Dcc* ha sido relacionado con las respuestas atractivas generadas por *Netrina1* (figura 7). *Dcc* une *Netrina1* concretamente por el quinto de sus seis dominios Fibronectina de la región extracelular, y no compete con Heparina por ese punto de unión (probablemente, Heparina une *Dcc* de forma indirecta a través de *Netrina1*) (Geisbrecht et al., 2003). Anticuerpos bloqueantes de *Dcc* anulan el crecimiento de axones comisurales de espina dorsal de rata en presencia de *Netrina1*, así como la respuesta quimioatractiva de axones retinales de *Xenopus* ante un gradiente de *Netrina1* (de la Torre et al., 1997; Keino-Masu et al., 1996). *Dcc* muestra multimerización constitutiva (que en ausencia de *Netrina1* se encuentra reprimida) a través de su dominio intracelular P3, y esta multimerización es imprescindible para dar lugar a una respuesta atractiva (Stein et al., 2001). Además, el dominio P3 sirve de punto de unión de *Dcc* a *Robo*, receptor de *Slit* que se encarga de silenciar la señal de *Netrina1/Dcc* en axones que cruzan la línea media (Finger et al., 2002).

### 2.3.2. *Unc5*

Además de producir atracción, *Dcc* también participa en acciones repulsivas mediadas por *Netrina1*, aunque en colaboración con otra familia de receptores de *Netrina1*, las proteínas *Unc5* (Hong et al., 1999). El miembro fundador de la familia, la proteína de *C.elegans* *Unc5*, estaba relacionada con defectos en la migración dorsal de axones y células en la pared corporal del nematodo, que coincidían



**Figura 7.** *Dcc* y *Unc5* transducen la señal de *Netrina1* en axones y células.

*Dcc* produce atracción al multimerizar a través de su dominio intracelular P3. *Unc5* y *Dcc* forman un complejo que genera repulsión a bajas concentraciones de *Netrina1* (lejos de la fuente productora de *Netrina1*). *Unc5* puede por sí mismo producir repulsión ante concentraciones altas de *Netrina1* (cerca de la fuente productora de *Netrina1*). DB, DD, ZU5: dominios intracelulares de *Unc5*. EGF: repeticiones EGF. FN: dominio fibronectina. Ig: dominios inmunoglobulina. LamVI: dominio globular similar a Laminina VI. P1, P2, P3: dominios intracelulares de *Dcc*. TSP: dominio trombospondina. (adaptado de Dickson y Keleman, 2002)

con parte del fenotipo de gusanos mutantes en el gen *Unc6/Netrina1*. En la búsqueda de genes similares a *Unc5* en cerebro de rata embrionario, se hallaron dos proteínas, *Unc5h1* y 2 (de *Unc5-homologues*) (Leonardo et al., 1997); al mismo tiempo se identificaba el gen *rcm* ("Rostral Cerebellar Malformation", rebautizado más tarde como *Unc5h3*), cuya alteración espontánea producía en el ratón defectos en el cerebelo y mesencéfalo y cuya secuencia era similar a la del gen *Unc5* (Ackerman et al., 1997). Se consideró a las tres proteínas *Unc5h* receptores de *Netrina1* por su capacidad para unir *Netrina1* in vitro (Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997), concretamente por cualquiera de sus dos dominios Ig (Geisbrecht et al., 2003).

Además de las ya mencionadas, la familia *Unc5* también incluye la proteína de *Drosophila* *Unc5* (Keleman y Dickson, 2001), otro miembro identificado en ratón, *Unc5h4* (Engelkamp, 2002), y el homólogo humano de *Unc5h3*: *Unc5c* (Ackerman y Knowles, 1998).

Todos los miembros de la familia *Unc5* tienen en común 2 dominios Ig y 2 dominios Trombospondina en su región extracelular, seguidos de un único dominio transmembrana y de una región intracelular que contiene un dominio ZU5 (formado por una secuencia similar a la proteína ZO1,

implicada en uniones tipo *tight-junction* (Ackerman et al., 1997; Leonardo et al., 1997)), además de un dominio de Muerte (DD, *Death Domain*) en su extremo C-terminal (figura 7) (Hong et al., 1999). Las proteínas Unc5 en conjunto con el receptor Dcc están implicadas en respuestas repulsivas de largo alcance mediadas por Netrina1 (figura 7). Ambas proteínas interactúan a través de zonas concretas en sus regiones citoplasmáticas: una zona en Dcc que contiene el dominio P1, y una zona llamada DB (Dcc *binding*) en Unc5h. La interacción citoplasmática es necesaria para desencadenar la acción repulsiva, y es dependiente de ligando, ya que en ausencia de Netrina1 la unión se encuentra reprimida (Hong et al., 1999); sin embargo, hay que tener en cuenta que, en *C.elegans*, alelos de Unc5 mutantes que no contienen la mencionada secuencia DB mantienen la capacidad de interactuar funcionalmente con Unc40 (Merz et al., 2001). El dominio extracelular de Unc5h es prescindible para la acción repulsiva, pero anticuerpos contra el dominio extracelular de Dcc bloquean la repulsión. Existe, además, en Unc5h una pequeña secuencia situada entre los dominios DB y DD que resulta imprescindible para generar repulsión (Hong et al., 1999). Las proteínas Unc5, al igual que Dcc, pueden interactuar entre ellas, posiblemente de un modo directo formando complejos en la membrana plasmática (Merz et al., 2001).

Aunque, en general, se considera que la función quimiorrepulsiva de Netrina1 requiere la acción conjunta de Dcc y Unc5, estudios realizados en *C.elegans* indican que Unc5 puede funcionar independientemente de Dcc en migraciones dorsales de axones y células (o sea, repulsivas desde la línea media ventral), y que la intervención de Dcc es prescindible en la función quimiorrepulsiva de Unc5 (Hedgecock et al., 1990; Merz et al., 2001); en *Drosophila*, Unc5 puede producir respuestas repulsivas de corto alcance en ausencia de Frazzled (homólogo de Dcc) (Keleman y Dickson, 2001; Winberg et al., 1998a), mientras que en acciones repulsivas de largo alcance participan ambas proteínas (Keleman y Dickson, 2001).

Además de la función de atracción y repulsión de axones y células que realizan las proteínas Unc5, una de ellas, Unc5h3, participa en el desarrollo del cerebelo. Existen tres cepas de animales con mutaciones en el gen *Unc5h3*: el ratón *rcm* (*Rostral Cerebellar Malformation*), la rata *cvd* (*Cerebellar Vermis Defect*) y la rata *Hobble* (Ackerman et al., 1997; Kuramoto et al., 2004). Los animales homocigotos para estas mutaciones muestran alteraciones neurológicas, principalmente un caminar anómalo (tambaleante o cojo), junto con defectos anatómicos en el cerebelo (reducción del tamaño cerebelar, reducción de la foliación y hemisferios fusionados) y alteraciones a nivel histológico (ectopias en el colículo inferior y el puente del encéfalo, errores de posición de las células de la corteza cerebelar) (Ackerman et al., 1997; Kuwamura et al., 1997). En conjunto, los datos experimentales referentes a estos animales sugieren que *Unc5h3* es parcialmente responsable de establecer el límite anterior del cerebelo y de garantizar su correcta laminación, aunque el posible papel de Netrina1 en estos procesos ha sido cuestionado (Goldowitz et al., 2000; Przyborski et al., 1998).

### 2.3.3. A2b



**Figura 8. Receptor de Adenosina A1.**

Al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, el receptor A1 contiene siete dominios transmembrana interconectados mediante tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares. En el dibujo también aparecen dos putativos enlaces disulfuro (representados en verde). (adaptado de Ralevic y Burnstock, 1998)

En la búsqueda de proteínas que interaccionaran con Dcc, se descubrió al receptor de adenosina A2b como un posible receptor de Netrina1 (Corset et al., 2000). Existen cuatro tipos de receptores específicos de adenosina (figura 8): A1 y A3, que funcionan inhibiendo la actividad adenilato ciclasa en respuesta a la

unión de su ligando, y A2a y A2b, que actúan estimulándola. El receptor A2b se acopla tanto a proteína Gq como Gs, activando la vía dependiente de PLC o acumulando cAMP, respectivamente (Ralevic y Burnstock, 1998). A2b interactúa a nivel intracelular con Dcc en presencia de Netrina1, y es capaz de unir Netrina1 independientemente de Dcc, siendo el punto de unión a Netrina1 distinto al de adenosina;

la unión de Netrina1 al receptor A2b aumenta la actividad adenilato ciclasa de la célula (Corset et al., 2000). Estudios independientes en la vía óptica de *Xenopus*, muestran que la disminución de niveles de cAMP en axones retinales envejecidos en cultivo coincide con una disminución de la expresión del receptor A2b, y que la presencia de antagonistas de A2b cambia la respuesta de axones retinales jóvenes ante un gradiente de Netrina1 de atracción a repulsión (Shewan et al., 2002). En general, existen suficientes datos experimentales que apuntan al receptor A2b como intermediario entre Netrina y una acumulación de cAMP intracelular que desencadena procesos específicos en la célula nerviosa, aunque esta hipótesis haya generado cierta controversia (Stein et al., 2001).

#### 2.3.4. Integrinas

Un estudio reciente implica a algunos miembros de la familia de las integrinas como receptores de Netrinas en funciones de adhesión y migración de células epiteliales; usando el páncreas embrionario como modelo de desarrollo epitelial, dicho estudio muestra que Netrina1 estimula la adhesión de células epiteliales al sustrato, que actúa como señal haptotáctica en la migración celular, y que ambas funciones dependen de la unión de Netrina1 a determinados heterodímeros de integrinas (Yebra et al., 2003). En la actualidad, no hay datos que permitan saber si las integrinas intervienen en la acción de Netrinas durante el desarrollo del sistema nervioso.

### 2.4. Señalización intracelular inducida por Netrina1

#### 2.4.1 Adaptación del cono de crecimiento a Netrina1

Ante un gradiente de Netrina1, la sensibilidad del cono axonal está relacionada con cambios en el nivel de  $Ca^{+2}$  intracelular (aunque esta variación por sí misma no produce el fenómeno de desensibilización) (Ming et al., 2002). Netrina1 induce atracción y repulsión mediante la activación de la síntesis y también de la degradación de proteínas localizadas en la misma neurita (Campbell y Holt, 2001) y el proceso de resensibilización requiere síntesis proteica a nivel local y actividad MAPK (Campbell y Holt, 2001; Ming et al., 2002). La desensibilización depende de la endocitosis del receptor, que retorna a la membrana plasmática durante el periodo de resensibilización en parte mediante tráfico endosomal, y en parte a través de su síntesis de novo (Piper et al., 2005).

#### 2.4.2. Señalización de Netrina1 a través de Dcc

**Nivel de  $Ca^{+2}$  y enzimas dependientes de  $Ca^{+2}$ .** El nivel de calcio intracelular también interviene en la señal desencadenada por Netrina1 y otros miembros del grupo I de factores guía. Un gradiente de Netrina1 aumenta la corriente de  $Ca^{+2}$  a través de los canales de membrana tipo L (dependientes de voltaje) en neuronas espinales de *Xenopus* (que expresan Dcc de forma endógena), mientras que en aquellas neuronas transfectadas con *Unc5h2*, el gradiente de Netrina1 induce una disminución de la corriente de  $Ca^{+2}$  a través de los mismos canales. Por lo tanto, Netrina1 produce una respuesta atractiva dependiente de Dcc que coincide con un aumento de la entrada de  $Ca^{+2}$ , y una respuesta repulsiva asociada a Dcc y Unc5 que da lugar a una disminución de la corriente de  $Ca^{+2}$  (Nishiyama et al., 2003). La relación cAMP/cGMP intracelular modula los canales de  $Ca^{+2}$  tipo L, de manera que una relación alta aumenta su activación (y por tanto, favoreciendo atracción), mientras que una relación baja la disminuye (y de ese modo favorece repulsión) (Nishiyama et al., 2003).

Netrina1 produce en el cono espinal de *Xenopus* una despolarización de la membrana, dependiente de Dcc, a través de canales TRPC (receptores no selectivos de cationes), y esa despolarización es necesaria para generar una respuesta atractiva (Hong et al., 2000a; Shim et al., 2005; Wang y Poo, 2005); la actividad de los canales TRPC también está presente en las respuestas quimiotácticas producidas por otros miembros del mismo grupo de factores guía (como BDNF y MAG), y su bloqueo altera la proyección contralateral de neuronas comisurales en la espina dorsal de *Xenopus*, dependiente de Netrinas (Shim et al., 2005). Los canales TRPC pueden influir en la entrada de  $Ca^{+2}$  en la célula respondiendo a la acción de factores guía de dos modos: permitiendo la entrada directa de  $Ca^{+2}$ , ya que son permeables a él, o dejando entrar  $Na^{+2}$ , lo que produce una despolarización de la membrana que activaría canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje, como por ejemplo, los canales tipo L (ver más arriba) (Shim et al., 2005; Wang y Poo, 2005).



Además de la entrada inicial de  $Ca^{2+}$  que se produce tras la unión de Netrina1 a su receptor Dcc, la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los almacenes internos celulares también contribuye al aumento global del nivel de  $Ca^{2+}$  citosólico. Dos mecanismos permiten dicha liberación: a través del aumento de  $Ca^{2+}$  inicial (según un mecanismo llamado CICR, *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release*), y mediante el incremento de IP3 que genera la unión de Netrina1 a su receptor (ver más abajo), y que activa los receptores IP3 presentes en los compartimientos internos (Hong et al., 2000a; Shim et al., 2005).

Así pues, el conjunto de datos aportados por diversos estudios y explicados en los párrafos anteriores permite construir un modelo de señalización (representado en la Figura 5) que tiene como objetivo de generar un gradiente en la concentración de calcio citosólico desde la membrana plasmática del cono de crecimiento, lo que finalmente produce una respuesta quimiotáctica ante un gradiente de Netrina1 (y muy posiblemente también del resto de factores guía que forman el grupo I). Si el gradiente de  $Ca^{2+}$  es pronunciado, activa la polimerización del citoesqueleto y se produce una respuesta atractiva; si el gradiente es suave, provoca la despolimerización del citoesqueleto y, por lo tanto, una respuesta repulsiva (Hong et al., 2000a; Ming et al., 1999; Shim et al., 2005; Wang y Poo, 2005).

La alteración del nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular en la vía de señalización de Netrina1 influye en la activación de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII) y de la fosfatasa Calcineurina (CaN) (Chen et al., 1999). Un aumento elevado del nivel de  $Ca^{2+}$  activa preferentemente CaMKII en el cono de neuronas espinales de *Xenopus* y produce atracción, mientras que un pequeño aumento activa preferentemente CaN (más afín a  $Ca^{2+}$  que CaMKII) y produce repulsión a través de la activación de la fosfatasa PP1. Además, el aumento elevado de  $Ca^{2+}$  intracelular produce a su vez un aumento en el nivel de cAMP, que activa a PKA y ésta a su vez inhibe la actividad de PP1 y por tanto suprime la respuesta repulsiva. Agentes inhibidores de CaN convierten la respuesta de neuronas espinales de *Xenopus* ante un gradiente de Netrina1 de repulsión a atracción, y la supresión de la actividad de CaMKII anula la respuesta atractiva. Sin embargo, la inhibición de CaN no altera la respuesta repulsiva del cono ante un gradiente de Sema3A, por lo que CaN y su efector PP1 parecen implicados de forma específica en respuestas repulsivas dependientes de  $Ca^{2+}$ , o sea, producidas por factores guía del grupo I (Wen et al., 2004). En explantes de espina dorsal embrionaria, la inhibición de CaN anula la actividad promotora del crecimiento de Netrina1 (dependiente de Dcc (Keino-Masu et al., 1996)), y suprime el aumento de la actividad de NFAT (un complejo transcripcional directamente activado por CaN) estimulado por Netrina1. El ratón con las tres subunidades del complejo NFAT (c1, c2 y c3) mutadas presenta alteraciones en la proyección comisural de la médula espinal, similares a las observadas en los mutantes Netrina1 y Dcc (Graef et al., 2003).

**PLC/PI3K.** La presencia homogénea de NGF en el medio desensibiliza el cono de crecimiento de axones espinales de *Xenopus* ante un gradiente de Netrina1, y para ello es necesaria la actividad del enzima PLC $\gamma$  (hidroliza el fosfolípido PIP2 produciendo DAG e IP3) o de la quinasa PI3K (fosforila PIP2 produciendo PIP3). Teniendo en cuenta que, cuando un factor quimiotáctico es capaz de desensibilizar al axón ante el gradiente de otro factor, significa que ambos factores comparten vías de señalización intracelular, estos resultados sugieren que PLC $\gamma$  y PI3K posiblemente están implicados en la señalización intracelular de Netrina1 (Ming et al., 1999). En ese sentido, se ha propuesto un modelo de actuación de PLC en la señal Netrina1, en el que la unión del factor guía a su receptor puede estimular la fosforilación del receptor, proporcionándole puntos de acoplamiento para proteínas con dominios SH2, como PLC; la subsiguiente síntesis de IP3 produce un aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores IP3 de los compartimientos internos y de los receptores TRPC en la membrana plasmática; un nivel de  $Ca^{2+}$  elevado permite activar vías específicas de señalización que acaban determinando el comportamiento del cono de crecimiento ante un gradiente de Netrina1 (ver más arriba) (Shim et al., 2005).

**Nucleótidos cíclicos.** La respuesta axonal ante distintos factores quimiotácticos depende del nivel de nucleótidos cíclicos: el aumento favorece atracción, mientras que la disminución favorece repulsión (Song et al., 1998). En ensayos de desvío axonal, donde axones espinales de *Xenopus* responden a un microgradiente de Netrina1, se ha constatado que los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos pueden regular el comportamiento del cono de crecimiento: disminuyendo la concentración de cAMP o inhibiendo la PKA (dependiente de cAMP), la respuesta atractiva inicial del cono se convierte en repulsión, y ese cambio es dependiente de Dcc (Ming et al., 1997); en realidad, es la relación entre los niveles de cAMP y cGMP en el citosol la que determina la reacción axonal: una

relación cAMP/cGMP baja favorece atracción, mientras que si la relación es alta favorece repulsión (Nishiyama et al., 2003). Nishiyama y colaboradores (Nishiyama et al., 2003) proponen que la unión de Netrina1 a Dcc activa la vía dependiente de cAMP (a través de PKA) (Ming et al., 1997), produciendo en el cono una respuesta atractiva mientras que, en presencia de Dcc y Unc5, Netrina1 desencadena la vía dependiente de cGMP (a través de PKG) además de la de cAMP, produciendo repulsión.

**GTPasas Rho.** Evidencias experimentales relacionan a las GTPasas Rho con la función de Netrina1 y su receptor Dcc en neuronas; en líneas celulares de neuroblastoma transfectadas con Dcc y que expresan constitutivamente Netrina1, se observa un aumento del número de filopodios y de la superficie celular dependiente de la activación de Rac1 y Cdc42 (Shekarabi y Kennedy, 2002), mientras que la inhibición de RhoA y Rock (efector de RhoA) estimula todavía más la formación de neuritas (Li et al., 2002b). La inhibición específica de proteínas Rho en explantes embrionarios de espina dorsal de rata suprime el crecimiento de axones comisurales en respuesta a Netrina1 (Li et al., 2002b).

La proteína Nck1, con dominios SH2 y SH3, homóloga en mamíferos a la proteína de *Drosophila* Dock, ha sido propuesta como nexo entre Netrina1 y su receptor Dcc, y la activación de GTPasas Rho. Nck1, mediante sus dominios SH3, une secuencias específicas intracelulares de Dcc de forma constitutiva. Se ha sugerido que la unión de Netrina1 a su receptor podría producir un cambio de conformación que permitiera a Nck1, a través de su dominio SH2, interaccionar con proteínas fosforiladas en residuos tirosina, que a su vez podrían activar Rac1 de forma indirecta (Li et al., 2002a).

**Proteínas quinasa.** Un estudio demuestra que Netrina1 estimula la fosforilación de su receptor Dcc en neuronas embrionarias espinales, y que tanto la actividad de Fyn, miembro de la familia de tirosina-quinasa Src, como la fosforilación de Dcc son necesarios para que Netrina1 estimule el crecimiento axonal en explantes de espina dorsal embrionaria. El mismo estudio propone que Fyn fosforila Dcc cuando éste une Netrina1, lo que podría inducir indirectamente, por mecanismos desconocidos, la activación de Rac1 (Meriane et al., 2004).

Se ha observado que Netrina1 provoca la fosforilación de Fak (una tirosina quinasa presente en lugares de interacción integrina-matriz extracelular en fibroblastos) en neuronas corticales embrionarias. Dcc interacciona con Fak y Fyn, y tanto la presencia de Fak y su fosforilación como la actividad Src-quinasa son necesarios para las funciones de crecimiento axonal y atracción mediadas por Netrina1 en el sistema nervioso (Liu et al., 2004; Ren et al., 2004). La fosforilación de Fak podría servir para reclutar proteínas con dominios SH2 (Fyn y otras quinasa Src o PLC $\gamma$ ) en un complejo proteico ligado a Dcc, lo que permitiría al sistema Netrina1/Dcc activar a enzimas como Fyn u otras quinasa Src, o PLC $\gamma$  (Ren et al., 2004).

En neuronas comisurales de espina dorsal de rata embrionaria, Netrina1 induce la activación de la MAP quinasa Erk1/2 mediante Dcc. Erk 1/2 une directamente Dcc, y la actividad de Erk1/2 es necesaria para promover el crecimiento de axones comisurales en presencia de Netrina1. La inhibición de la actividad Erk1/2 en axones espinales de *Xenopus* produce la supresión parcial tanto de la atracción del cono como del aumento en la extensión axonal ante un gradiente de Netrina1 (Forcet et al., 2002).

**MAP1B.** Aunque tradicionalmente se ha considerado el citoesqueleto de actina como el principal responsable del movimiento del cono de crecimiento, varios trabajos apuntan a que los microtúbulos de la periferia del cono también participan en el avance del axón. MAP1B se expresa en neuronas en desarrollo, y une microtúbulos y filamentos de actina contribuyendo a su estabilización mediante un proceso que requiere la fosforilación tipo I de MAP1B, realizada por las quinasa Gsk3 y Cdk5. Un estudio reciente sugiere que Netrina1 puede regular in vivo la función de MAP1B; este estudio muestra que la fosforilación tipo I de MAP1B en neuronas hipocampales embrionarias es estimulada por Netrina1, y ese proceso requiere la actividad de Gsk3 y Cdk5. En animales homocigotos deficientes en Netrina1, el nivel de fosforilación tipo I de MAP1B en extractos de cerebro en P0 se encuentra significativamente reducido en comparación a animales heterocigotos o salvajes. El ratón deficiente en MAP1B presenta alteraciones anatómicas e histológicas que resultan ser semejantes, aunque con diferencias, a las observadas en los ratones mutantes en Netrina1 y Dcc (disminución del tamaño de los núcleos pontinos, comisuras alteradas o ausentes), y explantes de ratones homocigotos mutantes en MAP1B muestran una respuesta atractiva ante Netrina1 parcialmente alterada (Del Rio et al., 2004).

**DCC y el citoesqueleto de actina.** Existen evidencias que apuntan a que Dcc interacciona con otras proteínas que, al igual que la familia de GTPasas Rho, también regulan la dinámica del citoesqueleto de actina. Shekarabi y colaboradores (Shekarabi et al., 2005) demuestran que, en neuronas comisurales de espina dorsal, la unión de Netrina1 a Dcc activa Cdc42, Rac1 y la serina/treonina quinasa Pak1 (una pieza clave en la vía de señalización que activa la polimerización de actina), y la activación de estas proteínas produce la expansión del cono de crecimiento. Además, Netrina estimula la formación de un complejo en el dominio intracelular de Dcc formado por la proteína adaptadora Nck1, Rac1, Cdc42, Pak1 y N-WASP, una proteína que une directamente F-actina por su extremo N-terminal, y que estimula la nucleación de filamentos de actina mediante la interacción de su extremo C-terminal con el complejo Arp2/3. El mismo estudio muestra cómo Netrina1 unida al substrato estimula la adherencia de neuronas de espina dorsal a través de Dcc. Se apunta a la existencia de dos mecanismos por los que Netrina1 y Dcc estimulan la formación de filopodios y la expansión de membrana: Dcc (un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, al igual que las proteínas CAM) actúa de puente entre Netrina1 unida a la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina; y Dcc es también el núcleo de un complejo proteico que organiza el citoesqueleto de actina (Shekarabi et al., 2005).

**Laminina.** Laminina-1 puede cambiar la respuesta del cono de crecimiento de axones espinales de *Xenopus* ante un gradiente de Netrina1 de atracción a repulsión, a través de receptores específicos de Laminina-1 (integrina  $\alpha\beta1$  y el receptor 67LR). Su acción produce en el cono una disminución de los niveles de cAMP, lo que está relacionado con respuestas de tipo repulsivo ante factores guía del grupo I (Hopker et al., 1999).

**Balsas lipídicas.** Se ha observado que la desintegración de las balsas lipídicas (microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en esfingolípidos y colesterol) suprime la respuesta del cono de crecimiento ante diversos factores con actividad quimiotáctica, como Netrina1 o Sema3A; sus receptores Dcc y Np1 se encuentran asociados a balsas lipídicas y su presencia en ellas aumenta tras la unión con sus respectivos ligandos (Guirland et al., 2004). La palmitoilación en un residuo cisteína conservado en el dominio transmembrana de Dcc le sirve para anclarse a las balsas lipídicas, y cuando éstas son químicamente desintegradas, la acción quimioattractiva de Netrina1 resulta alterada, así como la fosforilación y la actividad de quinasas MAPK, que en condiciones normales son estimuladas por Netrina1 (Guirland et al., 2004; Herincs et al., 2005).

#### 2.4.3. Señalización de Netrina1 a través de Unc5

**Pick1/PKC.** Muy poco se conoce acerca de los factores implicados en la cascada de señalización iniciada por la unión de Netrina1 a receptores Unc5h; entre ellos se encuentra Pick1, una proteína citosólica que interacciona con la subunidad catalítica de PKC  $\alpha$ . Pick1 une una región específica del dominio intracelular de Unc5h1 y también une Unc5h2 aunque en menor medida, mientras que no interacciona con Unc5h3. La activación de PKC en neuronas de hipocampo embrionario transfectadas con los cDNA de Unc5h1 y Pick1 produce la internalización específica de Unc5h1, lo que a su vez suprime la capacidad de Netrina1 de causar el colapso axonal en estas mismas neuronas. Por lo tanto, Pick1 podría actuar de nexo de unión entre Unc5h1 y PKC activa, y así provocar la internalización del receptor, hecho que podría tener consecuencias en la navegación del axón mediante dos mecanismos distintos: el primero, por generación de fuerzas mecánicas (ya sea por la estimulación de la endocitosis o bien por la pérdida de la adherencia que puede proporcionar la proteína Unc5h, con varios dominios Ig comunes a muchas moléculas adhesivas) que favorecerían el colapso y la posterior repulsión del cono. El segundo, porque la internalización específica de Unc5h1 y no de Dcc podría producir un cambio en la respuesta del axón de repulsión a atracción (Williams et al., 2003).

**Proteínas quinasa Src.** Otro estudio muestra que el dominio citosólico de Unc5 interacciona directamente con la tirosina quinasa Src1, y que para esta interacción son necesarios tanto el dominio SH2 de Src1 como su actividad quinasa; además, la fosforilación de Unc5 en varios residuos tirosina tanto in vitro como in vivo son debidas a la acción de Src1. Unc5 y Src1 no sólo interaccionan físicamente, sino que también lo hacen a nivel funcional, ya que el fenotipo mutante nulo *Unc5* es rescatado mediante la expresión de una construcción formada por el dominio extracelular de Unc5 y su dominio intracelular substituido por Src1, y para ello es necesaria la actividad quinasa de Src1. Los

autores proponen que, en *C.elegans*, Unc6 une y activa Unc5 de forma asimétrica en la superficie del cono, y que la unión de Src1 a Unc5 podría servir para concentrar Src1 en la región del cono de crecimiento afectada por el gradiente de Unc6, determinando la dirección del axón en ruta (Lee et al., 2005).

**Fosfatasa Sph2.** En *C.elegans* y en ratón, respectivamente, las proteínas Unc5 y Unc5h3 son fosforiladas in vivo en residuos tirosina. En *C.elegans*, la fosforilación de Unc5 es parcialmente dependiente de Unc6. In vitro, la fosforilación de Unc5h3 permite el reclutamiento de la fosfatasa Sph2 (conocida por su papel en migración celular y en la organización de adhesiones focales durante el desarrollo embrionario), y por tanto Sph2 podría modular el estado de fosforilación general de las proteínas Unc5 (Tong et al., 2001). Estudios en *C.elegans* indican que Unc5 es fosforilada in vivo en varios puntos, y la fosforilación de la tirosina 482 de Unc5 es importante para la función de Unc6 en la migración axonal motora, e imprescindible en la migración celular, también dependiente de Unc6 (Killeen et al., 2002).

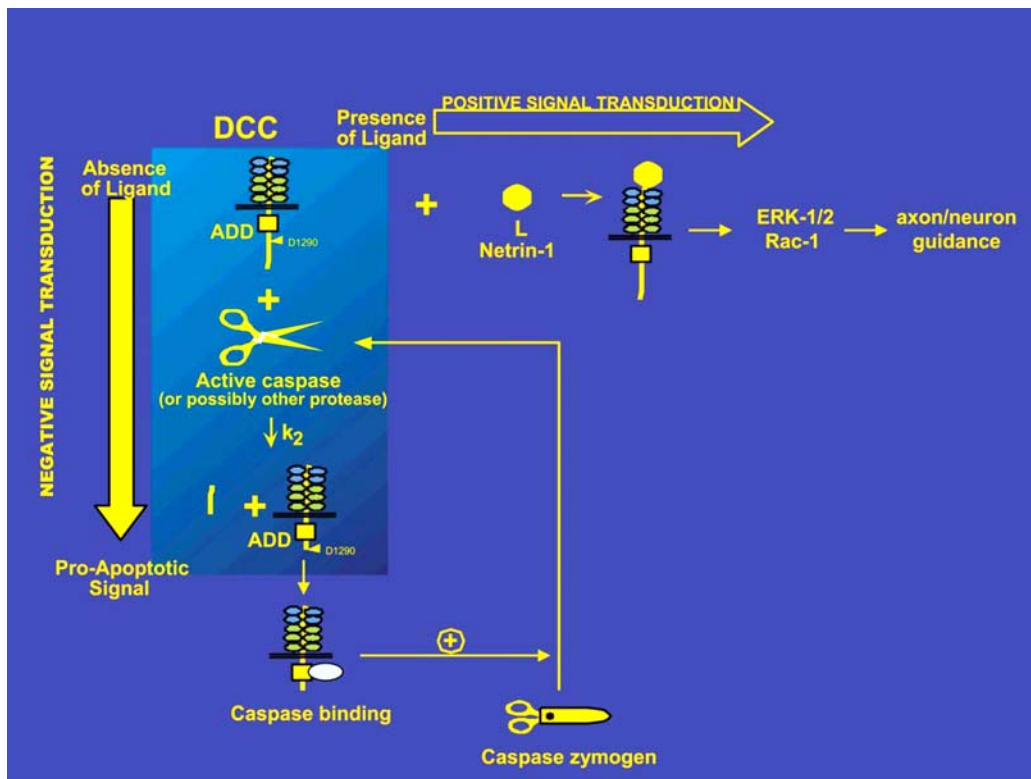
**MAX1.** En una búsqueda de genes en *C.elegans* cuya alteración producía defectos leves en migración axonal, se aisló e identificó la proteína MAX1, que establecía una nueva familia de proteínas estructuralmente parecidas, la familia MAX, con miembros en ratón, *Drosophila* y en humanos, todos ellos posiblemente homólogos en cuanto a función. Varias evidencias experimentales basadas en interacciones genéticas sugieren que MAX1 funciona en la vía o vías de repulsión mediadas por Unc5 y Unc6 independientemente de Unc40, aunque MAX1 y Unc5 parece que no interactúan directamente, o esa interacción es muy débil (Huang et al., 2002).

**Proteínas G.** Las proteínas G funcionan en la transducción de señales generadas por la unión ligando-receptor en la membrana plasmática, y juegan un papel en la migración de varias líneas celulares. La subunidad  $\alpha$  intercambia GDP por GTP, activándose y disociándose de la subunidad  $\beta\gamma$ ; ambas subunidades disociadas pueden entonces interactuar con moléculas efectoras. Mediante su actividad GTPasa intrínseca, la subunidad  $\alpha$ -GTP pasa a ser  $\alpha$ -GDP y vuelve a asociarse con la subunidad  $\beta\gamma$ . Un trabajo demuestra la interacción entre Unc5h2 y la proteína  $G\alpha_2$  cuando ésta se encuentra unida a GTP y por tanto, en estado activo.  $G\alpha_2$  activo inhibe el enzima adenil-ciclase, y por tanto disminuye la concentración de cAMP intracelular. In vitro, la unión de Unc5h2 con  $G\alpha_2$  reduce la inhibición de la adenil-ciclase por parte de  $G\alpha_2$ , generando la acumulación de cAMP. Teniendo en cuenta el papel de cAMP en la transducción de la señal desencadenada por varios factores de guía axonal, entre ellos Netrina1 (ver más arriba), la modulación de la función de  $G\alpha_2$  por parte de Unc5h2 podría regular el comportamiento del cono axonal ante un gradiente de Netrina1 (Komatsuzaki et al., 2002).

## **2.5. Dcc y Unc5h como receptores de dependencia**

Varios estudios subrayan la función de Dcc y las proteínas Unc5h como receptores de dependencia, entre los cuales se encuentran el receptor común de neurotrofinas  $P75^{NTR}$ , el receptor de andrógenos AR o la integrina  $\alpha\beta3$ . Dichos receptores generan una señal apoptótica en la célula cuando no unen sus ligandos específicos, por lo que la célula depende del ligando para sobrevivir (Mehlen y Mazelin, 2003); de ahí que pueda considerarse a Netrina1 como un factor de supervivencia. La expresión de Dcc y Unc5h1-3 en líneas celulares desencadena apoptosis, mientras que la adición de Netrina1 reduce drásticamente la muerte de esas mismas células (Llambi et al., 2001; Mehlen y Mazelin, 2003). En el mutante deficiente en Netrina1 se observa un aumento de apoptosis en zonas donde Unc5h y Dcc son expresados, como el tronco del encéfalo, el labio rómbico y el primordio cerebelar (Llambi et al., 2001). Para la acción pro-apoptótica de Dcc es necesaria la actividad proteolítica de caspasas, que cortan un fragmento C-terminal intracelular de Dcc y dejan expuesta una región situada por encima del punto de corte; este dominio, llamado ADD (*Addiction/Dependence Dcc*) es suficiente para causar la muerte celular (Mehlen y Mazelin, 2003). La proteólisis de Dcc produce el reclutamiento de un complejo proteico formado por caspasa 9, que une el dominio ADD posiblemente a través de una proteína adaptadora (DIP13 sería una posible candidata) y caspasa 3, que une el fragmento C-terminal liberado; este complejo proteico asociado a Dcc actuaría, en ausencia de Netrina1, como estimulador de la actividad caspasa en la célula, produciendo en última instancia la muerte celular (Forcet et al., 2001);

Mehlen y Mazelin, 2003). Curiosamente, los datos apuntan a que el proceso apoptótico inducido por el complejo activador de caspasas asociado a Dcc es independiente de las dos vías que comúnmente producen apoptosis: la vía dependiente de caspasa 8 y la vía dependiente de apoptosoma (que incluye citocromo C, la proteína Apaf1 y caspasa 9) (figura 9) (Forcet et al., 2001; Mehlen y Mazelin, 2003).



**Figura 9. Dcc como receptor de dependencia.**

En presencia de Netrina1, Dcc induce en la neurona una señal “positiva” que genera un estímulo quimiotáctico (atracción/repulsión). En ausencia de Netrina1, Dcc sufre la proteólisis de un fragmento de su extremo C-terminal (intracelular) por parte de caspasa. Dicha proteólisis permite el reclutamiento de caspasa 9 en la región intracelular de Dcc, probablemente a través de una proteína adaptadora. La interacción caspasa-Dcc produce la activación de caspasa 9 y de caspasa 3, lo que finalmente conduce a) a más proteólisis de la región intracelular de Dcc; b) a la muerte celular a través de la actividad de caspasa 3 (adaptado de Mehlen y Mazelin, 2003)

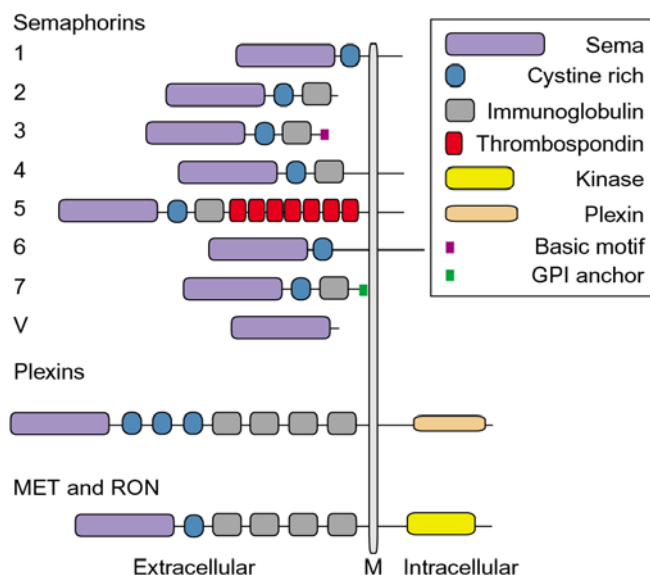
Igual que Dcc, Unc5h1-3 son también proteolizados por la actividad de caspasas, aunque en el caso de las proteínas Unc5h1 y 2, el inductor de apoptosis es el dominio de muerte, situado en el extremo C-terminal por debajo del punto de corte por parte de caspasas. En Unc5h3, la apoptosis parece depender del dominio ZU y no del dominio de muerte, y resulta necesaria la interacción del factor NRAGE con el dominio ZU para desencadenar la muerte celular mediante Unc5h3 (Mehlen y Mazelin, 2003). Un reciente estudio propone que Unc5h2 induce apoptosis a través de la quinasa DAPK, una proteína que, mediante su actividad serina/treonina-quinasa, produce la muerte celular activando diversas vías intracelulares; in vitro la presencia de Unc5h2 impide la autofosforilación inhibitoria de DAPK, y además estimula su actividad quinasa, mientras que la adición de Netrina1 restablece la autofosforilación y la subsiguiente inactivación de DAPK. Al igual que en Dcc y Unc5h, para la activación de DAPK y la posterior inducción apoptótica es necesaria la previa proteólisis de Unc5h2 por parte de caspasas (Llambi et al., 2005).

A la luz de este conjunto de evidencias experimentales se ha propuesto que la función de Netrina1 como factor de supervivencia a través de sus receptores Dcc y Unc5h actúe como un mecanismo más en el desarrollo del sistema nervioso, al igual que su función en la guía de axones y células. En el modelo propuesto en Mehlen y Mazelin 2003, Netrina1 distribuida en gradiente funcionaría como “estímulo positivo”, guiando axones y células hacia ella o en dirección opuesta. O bien actuaría de “estímulo negativo”, desencadenando en su ausencia procesos apoptóticos en aquellas células que han quedado fuera de las regiones específicas de expresión de Netrina1. Ambas funciones actuarían en conjunto durante la etapa de migración celular y elongación axonal.

### 3. SEMAFORINAS

#### 3.1. Introducción

La superfamilia de las Semaforinas está formada por tres subfamilias: Semaforinas, Plexinas y los receptores tirosina-quinasa Met y Ron (específicas de vertebrados). Las proteínas que forman parte de dicha superfamilia tienen una estructura similar, caracterizada por la presencia en el extremo N-terminal del dominio Sema, y por una o más copias del dominio rico en cisteínas CDR, también denominado MRS (*Met-Related sequence*) o PSI (*Plexin-Semaphorin-Integrin domain*), adyacente al dominio Sema en su lado C-terminal y solamente ausente en las semaforinas víricas (clase V) (Gherardi et al., 2004). El dominio Sema equivale estructuralmente a una variante del pliegue tipo hélice- $\beta$ , un tipo de topología proteica muy común tanto en proteínas extracelulares como citosólicas, y junto con el dominio CDR constituyen el dominio semaforina original, que, en el año 1993, Kolodkin y colaboradores (Kolodkin et al., 1993) definieron como el rasgo característico de la familia de las Semaforinas (figura 10) (Gherardi et al., 2004; Kolodkin et al., 1993).



**Figura 10. Estructura de la superfamilia de las Semaforinas**

La superfamilia de las Semaforinas se compone de tres familias distintas: las Semaforinas, las Plexinas, y los receptores tirosina-quinasa Met y Ron.

Las Semaforinas se dividen en ocho clases: dos de origen animal invertebrado (clases 1 y 2), cinco de origen animal vertebrado (clases 3, 4, 5, 6, 7) y una de origen viral (clase V). La semaforina vírica representada corresponde al producto del material genético presente en los virus Vaccinia y Variola (causantes de la viruela), que únicamente contiene el dominio Sema; otras semaforinas víricas contienen además el dominio CDR (Cystine-rich) (adaptado de Gherardi et al., 2004)

Las Semaforinas, cuyo nombre alude al sistema de banderas y luces de la comunicación marítima y ferroviaria (Committee, 1999), se agrupan según similitudes estructurales en ocho clases, todas ellas de origen animal excepto la clase V, formada por proteínas víricas. Las semaforinas de clase 2 y 3 son solubles, mientras que el resto de clases contienen semaforinas ancladas a la membrana plasmática; entre ellas, las clases 1, 4, 5 y 6 las componen proteínas transmembrana de tipo I (con su extremo N-terminal en el medio extracelular, y su extremo C-terminal en el citosol), y las semaforinas de clase 7 presentan un dominio GPI de unión a membrana. Las clases 1 y 2 contienen semaforinas de origen invertebrado, y las clases 3, 4, 5, 6 y 7 son de origen vertebrado (figura 10) (Gherardi et al., 2004).

Existen varias proteínas que pueden actuar como receptores o parte de complejos receptores de semaforinas. Entre ellas, destacan dos familias: Plexinas y Neuropilinas. Las Plexinas, miembros también de la superfamilia de las Semaforinas, unen directamente y transducen la señal intracelular de distintas clases de semaforinas: semaforinas transmembrana de invertebrados (clase 1), semaforinas asociadas a membrana de vertebrados (clases 4 y 7), y semaforinas víricas (clase V). Sin embargo, las semaforinas secretables de vertebrados (clase 3) no unen directamente plexinas, por lo que requieren un complejo receptor formado por Neuropilinas, que unen semaforinas, y Plexinas, que transducen su señal (Pasterkamp y Kolodkin, 2003; Tamagnone et al., 1999; Winberg et al., 1998b).

Además de neuropilinas y plexinas, otras proteínas pueden actuar como receptores o parte de un complejo receptor de semaforinas (figura 11) (Pasterkamp y Kolodkin, 2003):

- Otk, una proteína similar en estructura a un receptor tirosina-quinasa, pero con un dominio catalítico inactivo; en *Drosophila*, interacciona con PlexA y actúa como receptor de Sema1a.
- Moléculas de adhesión celular (CAM) pertenecientes a la superfamilia de las Immunoglobulinas. L1 forma parte junto con neuropilinas y plexinas del complejo receptor de Sema3A, mientras que NrCAM se asocia con Np2 y forma parte del complejo receptor de Sema3F y Sema3B (Julien et al., 2005).
- Integrinas como  $\beta$ 1-integrina, considerada un receptor de Sema7A anclada a membrana (Pasterkamp et al., 2003).
- Met o factor de crecimiento hepático, un miembro de la superfamilia de las Semaforinas que, asociado a PlexB1, transduce la señal de Sema4D.
- CD72, una proteína que forma parte de la superfamilia de las Lectinas, actúa de receptor de Sema4D específicamente en el sistema inmune.
- Tim2, perteneciente a la familia de proteínas TIM, es un receptor de Sema4A que actúa como regulador de la función de las células T.

### **3.2. Semaforinas secretables**

#### **3.2.1. Estructura**

Fue un miembro de la clase 3 el que inauguró la familia de las semaforinas: en el año 1993 se purificó y clonó una glucoproteína de 100 kDa con capacidad de colapsar el cono de crecimiento axonal *in vitro*, por lo que fue bautizada como Colapsina (Luo et al., 1993), y posteriormente renombrada Sema3A (Committee, 1999). La estructura de Sema3A, común a todos los miembros de la clase 3, consiste en el dominio Sema más el dominio PSI en su extremo N-terminal (ver más arriba), seguidos por un dominio Ig y una región básica en el extremo C-terminal. El dominio Sema es necesario y además suficiente para producir colapso axonal, y una secuencia de 70 AA dentro del dominio Sema especifica la actividad propia de cada semaforina; los dominios Ig y básico únicamente potencian la actividad y no intervienen en la especificidad de su función, siendo intercambiables entre las distintas semaforinas (Koppel et al., 1997).

Sema3A contiene además tres secuencias consenso para furin-proteasas, cuya acción permite activar la proteína (ya que su versión completa es inactiva) dando lugar a varios péptidos con distinta capacidad de repulsión: la forma de 95 kDa generada por hidrólisis en el punto C-terminal es la más activa, y su posterior digestión en el punto entre los dominios Sema y PSI reduce su actividad considerablemente (Adams et al., 1997). Tanto Sema3A como la semaforina transmembrana Sema4B forman homodímeros, y en el caso de Sema3A la dimerización resulta imprescindible para su función, ya que parece ser necesaria para hidrolizar la proteína completa y obtener así la forma más activa de 95 kDa (Klostermann et al., 1998; Koppel y Raper, 1998).

#### **3.2.2. Funciones**

##### **3.2.2.a) Semaforinas en el sistema nervioso.**

A partir de datos *in vitro* se ha demostrado la acción quimiotáctica de las semaforinas secretables sobre distintas clases de axones, y en particular la función de Sema3A en colapso o repulsión axonal en los sistemas periférico, sensorial y motor, así como en el sistema nervioso central: Sema3A repele axones olfativos, pontocerebelares, corticales e hipocampales. *In vitro*, las semaforinas de clase 3 también pueden ser factores quimioattractivos: Sema3C sobre axones corticales, Sema3B sobre axones de bulbo olfativo (Fiore y Puschel, 2003), y Sema3D sobre axones telencefálicos que forman la comisura anterior (Wolman et al., 2004).

Sema3A también puede regular el desarrollo dendrítico; ensayos *in vitro* demuestran que Sema3A actúa en neuronas corticales atrayendo sus dendritas hacia la superficie pial, y al mismo tiempo repele los axones de esas mismas neuronas, empujándolas hacia la sustancia blanca. La presencia predominantemente dendrítica de la enzima guanilil-ciclasa (cuya actividad de producción de cGMP puede cambiar la respuesta axonal ante Sema3A de repulsión a atracción (Song et al., 1998)) podría ser responsable de la dualidad funcional de Sema3A sobre neuronas corticales (Polleux et al., 1998; Polleux et al., 2000). La acción *in vitro* de Sema3A en dendritas se confirma en el fenotipo del ratón deficiente

en SemaA, que presenta alineación dendrítica al azar de las neuronas piramidales de la capa cortical 5 (Behar et al., 1996).

Se ha demostrado que SemaA juega un papel en el proceso de ramificación de axones una vez éstos han alcanzado la región diana. Así, Sema3A inhibe la ramificación de axones corticales mientras que Netrina1 la estimula, todo ello sin influir en la longitud del axón (Dent et al., 2004); y en el hipocampo, Sema3A y Sema3F intervienen en la poda, respectivamente, de la proyección al septum y de las fibras musgosas (Liu et al., 2005)

Además de la guía axonal, también la migración celular cuenta entre las funciones de las semaforinas secretables: in vitro, células de la cresta neural evitan territorios que contienen Sema3A y Sema3F (Eickholt et al., 1999; Gammill et al., 2006; Osborne et al., 2005), mientras que evidencias in vivo sugieren un efecto quimioatractivo de Sema3C sobre células cardíacas de la cresta neural (Feiner et al., 2001). Sema3A también parece intervenir en la distribución entre la corteza y el estriado de interneuronas telencefálicas en migración (Marin et al., 2001; Tamamaki et al., 2003). En el nervio óptico in vitro, precursores gliales son repelidos por Sema3A, mientras que Sema3F los atrae y además estimula su división (Spassky et al., 2002; Sugimoto et al., 2001).

Además de funcionar como factor quimiotáctico para axones y células, Sema3A también puede inducir apoptosis en neuronas, a la misma dosis necesaria para producir colapso o repulsión aunque a tiempos de exposición más largos (Ben-Zvi et al., 2006; Gagliardini y Fankhauser, 1999); tras la axotomía del nervio óptico, la inyección de anticuerpos anti-Sema3A in vivo en el ojo tienen un efecto protector, aumentando la supervivencia de células ganglionares de la retina incluso 24 h después de la axotomía, lo que abre la posibilidad de futuras aplicaciones terapéuticas (Shirvan et al., 1999). La función apoptótica de Sema3A in vitro se produce a dosis bajas, compatibles con su posible concentración en el tejido nervioso durante el desarrollo; por lo tanto, Sema3A podría intervenir como factor apoptótico en varios procesos fisiológicos, que incluirían la muerte neuronal masiva que tiene lugar en determinadas etapas del desarrollo, así como el ajuste de la ramificación axonal o la degeneración neuronal tras lesión (Ben-Zvi et al., 2006; Gagliardini y Fankhauser, 1999; Shirvan et al., 2002).

### 3.2.2.b) Estudios in vivo: ratones mutantes.

Con el objetivo de conocer la función de las semaforinas en el desarrollo neuronal in vivo, han sido creadas varias líneas ratones mutantes deficientes en semaforinas clase 3 y sus receptores:

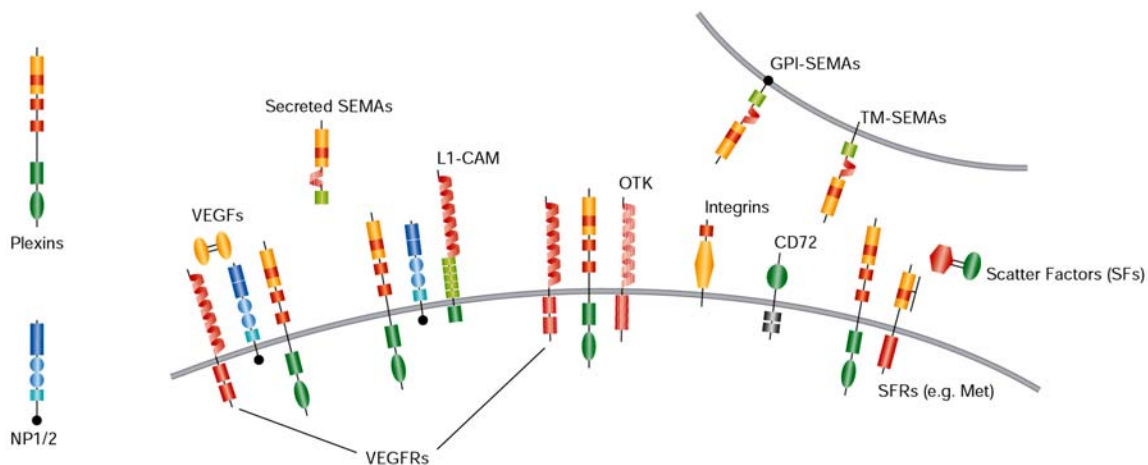
- existen dos cepas de ratones mutantes deficientes en *Sema3A*. La primera de ellas, creada por Behar y colaboradores (Behar et al., 1996), muestra un fenotipo neuronal con pocas alteraciones, y únicamente a nivel central; entre ellas, la anormal terminación de axones entorrinales en el hipocampo y la proyección aberrante de las aferencias sensoriales a la medula espinal (Behar et al., 1996; Catalano et al., 1998; Pozas et al., 2001). Además, presentan defectos en el desarrollo óseo y cardíaco que producen la muerte postnatal del animal (Behar et al., 1996). Sin embargo, la línea mutante *Sema3A* generada posteriormente por Taniguchi y colaboradores (Taniguchi et al., 1997) es viable y fértil, sin aparentes defectos cardíacos, y presenta a edades tempranas severas alteraciones en nervios periféricos, mientras que no muestran defecto alguno en la proyección sensorial a la medula espinal. Las diferencias observadas entre ambas líneas se atribuyen al distinto fondo genético empleado (Taniguchi et al., 1997), y a un proceso de corrección de defectos a nivel periférico durante la etapa tardía del desarrollo embrionario (White y Behar, 2000).
- el ratón deficiente en *Sema3F* presenta defasciculación de algunos nervios craneales, y varias alteraciones en el sistema nervioso central, que incluyen defasciculación de la comisura anterior antes, durante y después de cruzar la línea media, y la terminación ectópica del tracto infrapiramidal de la proyección musgosa en el hipocampo, que se extiende hasta el límite CA3-CA1 (Sahay et al., 2003).
- el ratón deficiente en *Sema3B* muestra defectos neuronales únicamente en la comisura anterior, cuyo desarrollo también se encuentra alterado en el mutante *Sema3F*; ambas semaforinas intervienen en la formación de la comisura anterior con funciones distintas y no compensables entre sí (Julien et al., 2005).
- el ratón deficiente en *Sema3C* no tiene alteraciones periféricas apreciables, a falta de analizar el estado del sistema nervioso central; sin embargo, desarrollan defectos cardiovasculares congénitos que provocan la muerte perinatal del animal (Feiner et al., 2001).



### 3.3. Receptores de Semaforinas secretables

#### 3.3.1. Neuropilinas

Neuropilina 1 (Np1) fue inicialmente identificada a finales de los años 80 (seis años antes del descubrimiento de la primera semaforina) como la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal Mab-A5, que marcaba mayoritariamente el neuropilo (de ahí su nombre) en el tectum óptico de *Xenopus* (Fujisawa, 2004). Más tarde, fue definida por dos estudios simultáneos como un receptor de Sema3A (He y Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Al mismo tiempo fue aislado otro miembro de las Neuropilinas, Neuropilina 2 (Np2), a partir de secuencias de Neuropilina 1 conservadas durante la evolución (figura 11) (Chen et al., 1997; Kolodkin et al., 1997).



**Figura 11. Complejos receptores para la familia de las Semaforinas.**

Las Plexinas unen Semaforinas (SEMA5) y pueden formar complejos receptores con Neuropilinas (NP1/2), moléculas de adhesión celular como L1 (L1-CAM), receptores tirosina-quinasa como Otk, receptores Met y Ron (que forman parte de la familia de los receptores para proteínas "Scatter" (SFR)), y receptores de VEGF (VEGFR). Neuropilinas son coreceptores de semaforinas secretables y VEGF. Integrina  $\beta 1$  participa en la señal de Sema7A. CD72 es un receptor de baja afinidad de Sema4D. GPI: molécula glucosil-fosfatidilinositol. TM: transmembrana (adaptado de Tamagnone y Comoglio, 2004).

#### 3.3.1.a) Funciones de Neuropilinas en el sistema nervioso

Np1 y Np2 unen y participan en la señal de semaforinas clase 3 (Feiner et al., 1997; He y Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Sin embargo, ni Np1 ni Np2 pueden unir la semaforina secretable de invertebrados Sema2a, ni tampoco la semaforina transmembrana de vertebrados Sema6A, por lo que se considera a las neuropilinas receptores específicos de la clase 3 de semaforinas (Chen et al., 1997). Ambas neuropilinas se expresan en determinados lugares del sistema nervioso central y periférico según un patrón regulado durante su desarrollo (Chen et al., 1997; Kawakami et al., 1996), y su alteración genética produce anomalías en distintos nervios que incluyen defasciculación, excesiva extensión axonal o ausencia de determinadas proyecciones (Chen et al., 2000a; Giger et al., 2000; Kitsukawa et al., 1997; Kitsukawa et al., 1995). Por lo tanto, las neuropilinas intervienen en el desarrollo del sistema nervioso como parte del complejo receptor que transduce las acciones de Semaforinas secretables.

Previamente a su identificación como receptor de semaforinas, Np1 había sido descrita como una molécula de adhesión celular independiente de  $Ca^{+2}$ , que expresada en una línea celular fibroblástica producía agregación celular. A lo largo de su camino hasta el bulbo olfativo, los axones olfativos de *Xenopus* son paulatinamente segregados en dos grupos según su expresión mayoritaria de Np1 o plexina, y axones retinales de *Xenopus* que expresan Np1 y que han sido transplantados en la zona dorsal del embrión, tienden a crecer siguiendo tractos de fibras sensoriales Np1-positivas (Fujisawa et al., 1997). Teniendo en cuenta el fenotipo del animal que sobreexpresa Np1 (Kitsukawa et al., 1995), en el que varios nervios están defasciculados o generan brotes en lugares inapropiados, el conjunto de

datos apunta a que Np1 durante el desarrollo neuronal podría funcionar en fasciculación y guía axonal como una molécula de adhesión celular, regulando la interacción axón-axón o axón-célula de forma homofílica (Chen et al., 1998) o heterofílica (Fujisawa et al., 1997).

**VEGF como ligandos para Neuropilinas.** Tras las semaforinas, un año más tarde fueron identificados nuevos ligandos para las neuropilinas: los miembros de la familia VEGF, factores angiogénicos esenciales en la formación del sistema vascular y en angiogénesis tumoral (Gluzman-Poltorak et al., 2000; Gluzman-Poltorak et al., 2001; Guttmann-Raviv et al., 2006; Soker et al., 1998). Np1 y Np2 unen varios miembros de la familia VEGF con afinidades parecidas a las de semaforinas (Gluzman-Poltorak et al., 2000; Kitsukawa et al., 1995; Soker et al., 1998), e interaccionan con VEGFR1 y 2, ambos receptores de VEGF (Gluzman-Poltorak et al., 2001; Soker et al., 1998; Whitaker et al., 2001). In vitro, VEGF pueden, a través de neuropilinas y/o VEGFR, influir en diversas funciones celulares del sistema nervioso: VEGF bloquean el colapso de axones DRG producido por Sema3A (Miao et al., 1999), inhiben la repulsión y apoptosis generadas por Sema3A en una línea neuronal (Bagnard et al., 2001), y tienen un efecto quimioatractivo sobre neuronas de núcleos faciales (Schwarz et al., 2004); los ratones deficientes en *Np1* y en *VEGF165* comparten defectos en la migración tangencial de neuronas de núcleos faciales que no muestran las distintas cepas de ratones mutantes en distintas semaforinas secretables (Schwarz et al., 2004). VEGF estimula in vitro el crecimiento neurítico, así como la proliferación y supervivencia de neuronas y glía (Rosenstein y Krum, 2004), y datos in vitro e in vivo han demostrado que VEGF pueden jugar un papel en procesos regenerativos, aumentando la supervivencia, proliferación y migración de células de Schwann, o ejerciendo un efecto neuroprotector (Rosenstein y Krum, 2004).

### 3.3.1.b) Estructura de Neuropilinas

Np1 está formada por dos dominios homólogos a la proteína del complemento C1 (dominios CUB, a1 y a2), dos dominios homólogos a factores de coagulación V y VIII (dominios b1 y b2), un dominio MAM, un dominio transmembrana y una corta región citoplasmática altamente conservada entre distintas especies (He y Tessier-Lavigne, 1997). La región intracelular no contiene dominios funcionales reconocibles, aunque puede interaccionar con el dominio PDZ de la proteína Nip, que posiblemente actúa como adaptador acoplado Np1 al tráfico de membrana celular (Cai y Reed, 1999).

Aunque comparte sólo un 44% de homología general con Np1, Np2 tiene su misma estructura (Giger et al., 1998b). Las diversas isoformas de Np2 descritas fueron clasificadas en dos grupos: Np2(a0) o Np2, y Np2(b0). Ambos grupos difieren entre sí en el AA 809, situado entre los dominios MAM y transmembrana, y entre ellos solamente existe un 10% de homología en sus dominios transmembrana y citoplasmático. El AA 809 es punto en común de inserciones que definen varias isoformas en cada grupo: tres inserciones de 5, 17 y 22 (5+17) AA en el grupo a0, y una inserción de 5 AA en el grupo b0. La expresión de los dos grupos de isoformas está regulada durante el desarrollo: en el embrión a edades tempranas sólo se detectan las isoformas a, mientras que en el ratón adulto se detectan isoformas a y b (Chen et al., 1997).

Existen varias formas truncadas de Np1 (sNp1), que debido a un proceso de *splicing* alternativo contienen únicamente sus dominios extracelulares a y b y son por tanto solubles. Todas las formas sNp1 se expresan in vivo de forma natural en distintos órganos incluido el cerebro, así como en tejido canceroso y en líneas celulares de origen tumoral. sNp1 une VEGF165 y Sema3A con afinidades semejantes, y pueden antagonizar la señal de VEGF a través de Np1, actuando por ejemplo como agentes antitumorales (Cackowski et al., 2004; Gagnon et al., 2000).

Los distintos dominios de las neuropilinas participan en sus funciones de forma específica:

- los dominios a1/a2 (CUB) y b1 (CV/VIII) intervienen en la unión a semaforinas: ambos dominios pueden unir el dominio básico C-terminal de semaforinas, mientras que la interacción del dominio a1/a2 con los dominios Sema-Ig de semaforinas determina la especificidad de unión de neuropilina hacia una semaforina concreta (Chen et al., 1998; Feiner et al., 1997; Giger et al., 1998b; Gu et al., 2002; Nakamura et al., 1998; Renzi et al., 1999).
- el dominio b1 es el punto de unión de VEGFs (Gu et al., 2002), y Sema3A compete con VEGF165 por su unión a Np1 (Gu et al., 2002).

- dos secuencias homólogas en cada uno de los dos dominios b son responsables de la actividad de adhesión celular de Np1, y estas secuencias no intervienen en su unión a otros ligandos o receptores (Shimizu et al., 2000).
- el dominio MAM interviene en la oligomerización de neuropilinas, formando multímeros homogéneos (Np1 o Np2) o heterogéneos (Np1 y Np2), y junto con el dominio a1/a2 resulta necesario para la función de Sema3A (Chen et al., 1998; Giger et al., 1998b; Renzi et al., 1999).
- el dominio intracelular de neuropilinas no es necesario para la función de semaforinas (Nakamura et al., 1998); por lo tanto, existe otro u otros elementos en el complejo receptor de semaforinas capaces de transducir su señal a nivel intracelular, y ese papel lo cumple la familia de las Plexinas (ver más abajo). Sin embargo, las neuropilinas son capaces de señalar mediante su dominio intracelular cuando, en una forma quimera, unen EGF estimulando la migración celular (Guttmann-Raviv et al., 2006).

### 3.3.1.c) Especificidad de semaforinas por neuropilinas

Existe diversidad en cuanto a la presencia de neuropilinas en el complejo receptor de las distintas semaforinas clase 3:

- Sema3A une únicamente Np1 *in vitro*, y Np1, pero no Np2, participa en la respuesta repulsiva axonal mediada por Sema3A (Chedotal et al., 1998; Chen et al., 1997; Chen et al., 1998; Giger et al., 1998b; Kolodkin et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Este dato es confirmado por la similitud en los fenotipos neuronales entre los ratones deficientes en *Sema3A* y *Np1* (Gu et al., 2003; Kitsukawa et al., 1997; Renzi et al., 1999; Taniguchi et al., 1997). Por lo tanto, Np1 constituye al menos en parte el receptor de Sema3A.
- Sema3F une Np2 con mayor afinidad que Np1. Sin embargo, solamente Np2 permite la transducción de la señal repulsiva de Sema3F (Chedotal et al., 1998; Chen et al., 1997; Chen et al., 1998; Giger et al., 1998b; Renzi et al., 1999); además, el conjunto de defectos observados en el ratón mutante *Sema3F* constituyen una fenocopia del mutante *Np2* (Chen et al., 2000a; Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003). Por lo tanto, al menos parte del receptor de Sema3F está formado por Np2.
- Sema3C une Np1 y Np2; datos *in vitro* e *in vivo* demuestran la participación de ambas neuropilinas en la respuesta axonal ante Sema3C, y se ha propuesto que el receptor de Sema3C contenga heterodímeros Np1-Np2 o bien homodímeros Np2 (Chen et al., 1997; Chen et al., 1998; Giger et al., 2000; Renzi et al., 1999; Takahashi et al., 1998; Takahashi y Strittmatter, 2001). Sin embargo, evidencias experimentales *in vitro* e *in vivo* sugieren que cualquiera de las dos neuropilinas puede funcionar como receptor de Sema3C (Feiner et al., 2001; Gitler et al., 2004; Gu et al., 2003; Rohm et al., 2000a). Además, Sema3C puede actuar como antagonista de Np1 y como agonista de Np2 (Takahashi et al., 1998).
- Sema3B puede unir Np1 y Np2; al igual que Sema3C, se ha postulado que el receptor de Sema3B esté formado por heterodímeros Np1-Np2 u homodímeros Np2 (Takahashi et al., 1998). Existen evidencias de que Np2 interviene en la función de Sema3B (Julien et al., 2005), y los ratones deficientes en *Sema3B* y en *Np2* tienen la comisura anterior defectuosa (Feiner et al., 2001; Julien et al., 2005). Además, al igual que Sema3C, Sema3B puede actuar como antagonista de Np1 y como agonista de Np2 (Takahashi et al., 1998). Sin embargo, un reciente estudio cuestiona las anteriores suposiciones, al mostrar en un sistema de expresión heterólogo que Sema3B no une neuropilinas (Gu et al., 2005).
- Sema3E une Np1 *in vitro* (Feiner et al., 1997), aunque un reciente estudio lo cuestiona al demostrar que Sema3E no une Np1 ni Np2 expresados en un sistema heterólogo, y que los puntos de unión *in vivo* de Sema3E desaparecen en el ratón deficiente en *PlexD1*, pero se mantienen básicamente igual en los mutantes *np1<sup>sema-</sup>* y *Np2* (Gu et al., 2005).
- Sema3D une Np1 *in vitro* (Feiner et al., 1997); *in vivo*, las respuestas repulsivas mediadas por Sema3D son transducidas por Np1, mientras que en las respuestas atractivas intervienen heterodímeros Np1-Np2 (Wolman et al., 2004).

### 3.3.1.d) Estudios in vivo: ratones mutantes

Varios ratones mutantes en Neuropilinas han sido generados con el objetivo de estudiar su función in vivo:

- el ratón de sobreexpresión de *Np1* (bajo el promotor de *Nestina*) presenta anomalías en el sistema cardiovascular que son causa probable de su letalidad a edades embrionarias tempranas; también desarrolla alteraciones en el sistema nervioso periférico y central, así como excesivo crecimiento cartilaginoso en las extremidades. Estas anomalías son atribuidas a la capacidad de unión homo/heterofílica de *Np1*, que expresada en exceso podría alterar la correcta interacción entre axones y células endoteliales con su entorno mesenquimático (Kitsukawa et al., 1995).
- El ratón deficiente en *Np1* muere a edades embrionarias tempranas, debido a alteraciones cardiovasculares (Kitsukawa et al., 1997). Los animales mutantes presentan defectos en el sistema nervioso periférico similares a los observados en una de las líneas de ratones mutantes *Sema3A* (Taniguchi et al., 1997): defasciculación, excesiva extensión axonal, axones que rebasan la región diana. Junto con el hecho de que sus axones pierden la capacidad de colapso ante *Sema3A*, los datos apuntan a que, in vivo, la acción quimiorrepulsiva de *Sema3A* es mediada a través de *Np1*; la presencia de *Sema3A* en el tejido que rodea a los axones periféricos restringiría el crecimiento de éstos (evitando la defasciculación) y canalizaría su trayectoria (Kitsukawa et al., 1997). Sin embargo, las proyecciones del sistema nervioso central estudiadas (proyección de DRG en la médula espinal) no muestran anomalías, a diferencia de lo observado en otra de las líneas deficientes en *Sema3A* (Behar et al., 1996).
- Aparte de las anomalías en el sistema nervioso, el ratón deficiente en *Np1* también presenta alteraciones cardiovasculares que producen la muerte del animal a edades embrionarias muy tempranas. Presenta vascularización deficiente del sistema nervioso central (que provoca la muerte neuronal y la destrucción del tejido), defectos en el desarrollo de las arterias de los arcos branquiales y de las grandes venas (entre ellos, la ausencia de la arteria del 4º arco branquial, que también se observa en el mutante *Sema3C* (Feiner et al., 2001)), *truncus arteriosus* persistente (defecto congénito en el que la arteria pulmonar y la aorta no se separan completamente), presente también en el mutante *Sema3C* (Feiner et al., 2001), y anormal organización de la red vascular en la bolsa embrionaria (Kawasaki et al., 1999). Por lo tanto, *Np1* es in vivo parte del receptor de *Sema3C*, al menos en determinados aspectos del desarrollo cardiovascular.
- El ratón mutante *Np1*<sup>Sema-</sup> (en el que la sustitución de 7 AA en dos bucles hidrofóbicos del dominio extracelular CUB de *Np1* impide su unión a *Sema3A*, *Sema3C* y *Sema3F*, pero no de VEGF165) permite averiguar qué función in vivo de *Np1* es debida a la acción de *Sema3A*. Este animal es una fenocopia parcial del ratón deficiente en *Sema3A*: presenta defasciculación y extensión axonal anormal en nervios periféricos, así como terminaciones entorrinales aberrantes y proyecciones sensoriales a la medula espinal erróneas (Behar et al., 1996; Taniguchi et al., 1997). Estos resultados demuestran que, in vivo, *Np1* es un receptor de *Sema3A*. Sin embargo, el animal *Np1*<sup>Sema-</sup> muestra otros defectos neuronales que no comparte con ninguna de las dos líneas de ratones deficientes en *Sema3A*, que afectan al cuerpo calloso o a las proyecciones del oído interno entre otros; por lo tanto, otras semaforinas secretables con capacidad de unión a *Np1* pueden in vivo funcionar a través de *Np1* (Gu et al., 2003).
- En el ratón mutante deficiente en *Np1* únicamente en células endoteliales (*Np1*<sup>C/-;Cre</sup>) se observan severas alteraciones en la vasculatura sistémica (que posiblemente expliquen la letalidad embrionaria del animal) y cerebral, anomalías que no muestra el mutante *Np1*<sup>Sema-</sup>; por lo tanto, in vivo la función de *Np1* en el desarrollo de la vasculatura es debida a su unión con VEGF165, y no con semaforinas (Gu et al., 2003). El ratón mutante *Np1*<sup>C/-;Cre</sup> también tiene un corazón anómalo: presenta *truncus arteriosus* (defecto congénito en el que la arteria pulmonar y la aorta no se separan completamente), y dilatación auricular entre otros defectos. Mientras que el ratón *Np1*<sup>Sema-</sup> no presenta *truncus arteriosus*, este mutante junto con el deficiente en *Sema3A* (Behar et al., 1996) sí comparten con el animal *Np1*<sup>C/-;Cre</sup> la dilatación auricular. Por lo tanto, en la correcta separación de la arteria pulmonar y aorta interviene VEGF165 y *Sema3C* (cuya supresión genética también produce *truncus arteriosus* persistente (Feiner et al., 2001)), mediante su interacción con *Np1* específicamente en células endoteliales; mientras que en el desarrollo auricular participa la señal de *Sema3A* y VEGF165 a través de *Np1* también en células endoteliales (Gu et al., 2003).
- Tanto el ratón *Np1*<sup>C/-;Cre</sup> como el deficiente en *Sema3C* presentan *truncus arteriosus*, y este defecto cardíaco también aparece en el ratón doble mutante en *Np1*<sup>Sema-</sup> y *Np2* (*Np1*<sup>Sema-</sup>; *Np2*<sup>-/-</sup>). Sin

embargo, no se observa en los ratones *Np1<sup>Sema-</sup>* y *Np2<sup>-/-</sup>*, por lo que se concluye que, in vivo, la acción de Sema3C en el desarrollo cardiovascular es mediada por un complejo receptor que contiene ambas neuropilinas (Gu et al., 2003).

- El ratón doble mutante *Np1<sup>Sema-</sup>;Np2<sup>-/-</sup>* y el ratón mutante *Np1<sup>C/-;Cre</sup>* desarrollan una anómala septación del ventrículo (Gu et al., 2003). Por lo tanto, en la formación del septo ventricular interviene la señalización específicamente en células endoteliales de VEGF165 a través de Np1 y de otros ligandos que incluyan Np1 y Np2 en su complejo receptor (por ejemplo, algunas semaforinas secretables: Sema3B o Sema3D).

- Se generaron independientemente dos líneas de ratones deficientes en *Np2*. Ambas presentan defectos neuronales: desorganización de nervios craneales y espinales en el sistema periférico, y extensión anómala de la proyección musgosa en el hipocampo, ausencia de las dos ramas de la comisura anterior, y alteraciones severas en el fascículo retroflexo (proyección talámica) en el sistema central; los defectos en el sistema periférico son complementarios a las del mutante *Np1*. Sin embargo, ninguna de las dos líneas muestra defectos cardiovasculares (Chen et al., 2000a; Giger et al., 2000). El fenotipo de ambos ratones es prácticamente idéntico al del ratón deficiente en *Sema3F* (Sahay et al., 2003), por lo que, in vivo, Np2 es un receptor de Sema3F en su acción en el sistema nervioso.

- El ratón doble mutante *Np1;Np2* muere a edades muy tempranas (E8.5) con severas alteraciones vasculares (ausencia de vascularización en el saco embrionario, vascularización anormal en el embrión y desarrollo embrionario deficiente), que en general resultan más graves que las observadas en el ratón deficiente en *Np1* (Kawasaki et al., 1999); la supresión del gen *Np2*, sin embargo, no produce defectos en el sistema cardiovascular (Chen et al., 2000a; Giger et al., 2000). El fenotipo del ratón doble mutante *Np1;Np2* se parece al de los ratones mutantes *VEGFR2* y *VEGF* (ambos con letalidad embrionaria a partir de E8.5), pero no se observan alteraciones vasculares parecidas en ningún mutante de semaforinas clase 3. Por lo tanto, el conjunto de evidencias permiten concluir que tanto Np1 como Np2 participan en las primeras etapas de angiogénesis (Suchting et al., 2005) y lo hacen a través de VEGF, mientras que durante el desarrollo cardiovascular intervienen en la señal de semaforinas (Takashima et al., 2002).

### **3.3.2. Plexinas**

Las Plexinas fueron descritas junto con las Neuropilinas, seis años antes de que se descubriera la primera semaforina. Se le llamó Plexina a la glucoproteína reconocida por un anticuerpo monoclonal (Mab-B2) que, en el tectum óptico y la retina de *Xenopus*, marcaba principalmente las capas plexiformes (de ahí su nombre) (Fujisawa, 2004). Se describió a la primera plexina clonada como una molécula de adhesión celular homofílica dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Ohta et al., 1995); teniendo en cuenta que Plexina está implicada en la formación de capas plexiformes en la retina (Ohta et al., 1992), y que en varios nervios los axones son segregados según si expresan Neuropilina o Plexina, se sugirió un posible papel para Plexina (y también para Neuropilina) en contactos específicos entre axones, promoviendo su fasciculación (Ohta et al., 1995; Satoda et al., 1995). Más tarde, se descubrió que Plexina era un receptor de semaforinas (figura 11): en *Drosophila*, PlexA une las semaforinas transmembrana Sema 1a y 1b produciendo repulsión y fasciculación axonal (Winberg et al., 1998b), y la unión de Sema3A al complejo Np1-PlexA1 genera contracción celular (Takahashi et al., 1999).

#### 3.3.2.a) Estructura y función

Las Plexinas se agrupan en cuatro categorías según su semejanza estructural: A, B, C, D. Existen dos plexinas de clase A y B identificadas en invertebrados (PlexA, PlexB) y nueve en vertebrados: cuatro de clase A, tres de clase B, una de clase C y una de clase D. Todas ellas son proteínas transmembrana tipo I que, además del dominio Sema y tres dominios PSI (rasgos característicos de la superfamilia de las Semaforinas a la cual pertenecen) contienen en su región extracelular tres dominios IPT. La clase B tiene además un dominio de proteólisis por convertasas, que permite liberar su ectodominio y formar heterodímeros cuya unión a semaforinas es mayor. En su región intracelular hay un dominio de aprox. 600 AA llamado SP, altamente conservado en la familia de las Plexinas, que no presenta homología con ningún otro dominio proteico, pero que incluye varios residuos tirosina fosforilables. Este dominio se divide en los subdominios C1 y C2, que muestran elevada similitud con proteínas GAP para pequeñas GTPasas (Negishi et al., 2005a). Ambos subdominios C1 y C2 se encuentran separados por una región bisagra que a su vez contiene un dominio de unión a



### 3.3.2.b) Plexinas como componente del complejo receptor de semaforinas clase 3

Los datos obtenidos hasta la fecha indican que plexinas A y D forman junto con neuropilinas un complejo receptor que une semaforinas clase 3 y transduce su señal:

- in vitro, Np1 interacciona con PlexA1 y A2; en ambos casos el complejo formado transduce la señal de Sema3A produciendo una respuesta celular, y para ello es necesaria la región citoplasmática de PlexA1 y A2 (Rohm et al., 2000a; Takahashi et al., 1999; Takahashi y Strittmatter, 2001; Tamagnone et al., 1999). In vitro, PlexA3 y A4 intervienen en mayor o menor medida en la respuesta repulsiva ante Sema3A, aunque parece que es PlexA4 preferentemente la que forma junto a Np1 el receptor de Sema3A (Cheng et al., 2001; Suto et al., 2005; Yaron et al., 2005); sin embargo, in vivo la contribución de PlexA3 y A4 en la señal de Sema3A depende del tipo neuronal (Yaron et al., 2005). Sema3A también puede unir un receptor formado por Np1 y PlexD1 (Gitler et al., 2004), y la señal de Sema3A a través de PlexD1 es necesaria in vivo en el desarrollo vascular (Gitler et al., 2004; Torres-Vazquez et al., 2004). En resumen, PlexA1-A4 y PlexD1 pueden formar parte, junto con Np1, del receptor de Sema3A.
- La interacción Np2/PlexA1 aumenta la afinidad de Sema3F respecto a Np2, y complejos formados por Np2 y PlexA1 o A2 producen la contracción celular (Takahashi et al., 1999; Takahashi y Strittmatter, 2001). In vitro, PlexA3 y A4 están implicadas en la señal de Sema3F, aunque parece que el receptor de Sema3F esta formado por Np2 y PlexA3 preferentemente (Cheng et al., 2001; Suto et al., 2005; Yaron et al., 2005); sin embargo, in vivo PlexA3 y A4 participan en la acción de Sema3F dependiendo del tipo neuronal (Yaron et al., 2005). Por lo tanto, el receptor de Sema3F está compuesto por Np2 junto con cualquiera de las cuatro plexinas clase A.
- La unión del complejo Np1/PlexA1 a Sema3C es menor respecto a Sema3A, por lo que parece que la presencia de PlexA1 permite discriminar entre Sema3C y Sema3A, siendo Sema3A el ligando preferente (Rohm et al., 2000a). Los complejos formados por Np1/PlexA2, Np2/PlexA2 o Np2/PlexB1 unen Sema3C mejor que Np1, Np2 o Np2/PlexA1 (Rohm et al., 2000a). La expresión de PlexD1 junto con Np1 o Np2 aumenta la unión de Sema3C respecto a neuropilinas (Gitler et al., 2004), y durante el desarrollo cardiaco parece ser necesaria la acción de Sema3C a través de PlexD1 (Gitler et al., 2004) y de PlexA2 (Brown et al., 2001). El resumen de datos indica que el receptor de Sema3C lo constituyen: a) neuropilinas (heterodímeros Np1 y 2, o bien homodímeros Np1/Np2), y b) plexinas (PlexD1 o cualquiera de las plexinas clase A excepto PlexA1, cuya presencia disminuye la unión de Sema3C por su receptor).
- Determinados defectos observados en los animales deficientes en *PlexA3*, *PlexA4* o en los dobles mutantes (extensión axonal aberrante en la región ocular y en las extremidades) podrían ser debidos a la señalización de plexinas independiente de neuropilinas (Yaron et al., 2005).
- Un reciente estudio muestra que PlexD1 es capaz de unir Sema3E independientemente de neuropilinas, y transducir su señal durante la formación de la vasculatura (Gu et al., 2005).

### 3.3.3. Otros receptores de semaforinas secretables

#### 3.3.3.a) VEGFR

Las neuropilinas pueden interactuar directa o indirectamente con los receptores tirosina-quinasa de factores de crecimiento vascular (VEGFR) para transducir la señal de sus dos ligandos, semaforinas y VEGFs, en neuronas y células endoteliales in vitro (figura 11). Así, la unión de VEGF165 a Np1 estimula la unión de VEGF165 a su receptor VEGFR2 (KDR/Flk1) (Soker et al., 1998), y Sema3A y VEGF165 compiten funcionalmente por unir Np1 (Miao et al., 1999). Np1 une solamente la forma VEGF165 (de 165 AA), y posiblemente la presencia de Np1 sea la causa de la diferencia de actividad entre VEGF165 y formas más cortas, como VEGF121: al no poder unir el complejo Np1-VEGFR2, VEGF121 no resulta tan eficaz como VEGF165 en activar a su receptor VEGFR2 (Fuh et al., 2000; Whitaker et al., 2001). Np1 y VEGFR2 no interactúan directamente, sino que VEGF165 hace de puente entre ambos receptores presentes en la misma célula (*cis*) o en tipos celulares distintos (*trans*), uniendo Np1 a través del dominio codificado por el exón 7, y VEGFR2 a través del dominio en el exón 4; al no tener exón 7, la forma de 121AA no puede unir Np1, y por tanto no puede formar el complejo ternario Np1-VEGF-VEGFR2 (Soker et al., 2002). Np2 puede unir VEGF165 con afinidad parecida a la de Np1, y al igual que Np1, no puede unir VEGF121; sin embargo, y a diferencia de Np1, sí puede unir VEGF145 (una forma que no incluye el exón 7) (Gluzman-Poltorak et al., 2000). Np1 y Np2 pueden

formar un complejo con otro receptor de VEGFs, VEGFR1 (Flt1), y esa interacción permite la unión de VEGF121 a Np2 y Np1 (que no unen dicha isoforma sin la presencia de VEGFR1) (Gluzman-Poltorak et al., 2001), pero bloquea la unión de VEGF165 con Np1; por lo tanto, VEGFR1 podría actuar como un regulador negativo de la señal mediada por Np1-VEGF165 (Fuh et al., 2000). El análisis de animales con supresiones génicas demuestran la co-participación de semaforinas, VEGFs, y neuropilinas en determinados procesos del desarrollo cardiovascular in vivo: la formación del septo que separa arteria pulmonar y aorta, la formación del septo ventricular y el desarrollo auricular (Gu et al., 2003); teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos, las neuropilinas son incapaces por sí mismas de activar vías intracelulares de señalización (Guttmann-Raviv et al., 2006; Nakamura et al., 1998), es factible suponer que en el desarrollo cardiovascular los receptores VEGFR actúen como cofactores de neuropilinas.

### 3.3.3.b) Moléculas de adhesión celular: L1 y NrCAM

L1, una glucoproteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas que es además una molécula de adhesión celular, regula el crecimiento neurítico mediante interacciones homofilicas y heterofilicas. En el hombre se han descrito varias mutaciones en el gen *L1* asociadas al síndrome MASA ligado al cromosoma X, caracterizado por un conjunto de alteraciones neurológicas que tienen en común el desarrollo anormal de las principales vías corticales decusativas; en ese sentido, el modelo animal de dicho síndrome, generado mediante la supresión del gen *L1*, presenta entre otros defectos, una proyección cortical que no decusa (Castellani et al., 2000). L1 interacciona con Np1, pero no con Np2, a través de sus respectivos dominios extracelulares, y axones corticales provenientes del animal deficiente en *L1* pierden la capacidad de respuesta repulsiva ante Sema3A, aunque continúan siendo repelidos por Sema3B o Sema3E; además, la coexpresión de *Np1* y *L1* es capaz de producir una respuesta celular ante Sema3A, la misma que producen Np1 y Plexinas. Por lo tanto, puede existir un complejo receptor de Sema3A alternativo a Np1-Plexina, que incluiría a Np1, que une Sema3A, y L1, que transduce su señal (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2004). L1 produce la internalización del complejo Np1-L1 en presencia de Sema3A, hecho que puede estar relacionado con la pérdida de adhesividad temporal necesaria para la respuesta de colapso o de repulsión, siendo L1 parte de la familia de moléculas de adhesión celular (CAM), o bien puede contribuir a la respuesta de Sema3A por reciclaje de su receptor (Castellani et al., 2004). Np1 puede unir L1 en *cis* y en *trans* de forma simultánea, y la interacción L1-Np1 en *trans* estimula la síntesis de óxido nítrico y con ello el aumento del nivel de cGMP, lo que da lugar a la reversión de la respuesta a Sema3A de repulsión a atracción. Teniendo en cuenta que el cambio a atracción puede suceder in vivo, mediante la interacción en *trans* con L1 transmembrana o bien con L1 soluble previamente proteolizada en un punto cercano a su dominio transmembrana, L1 podría actuar como un modulador de la respuesta celular ante una fuente de Sema3A durante el proceso de guía neuronal (Castellani et al., 2002).

Además de L1, otro miembro de la familia L1 de proteínas de adhesión celular, NrCAM, está implicado en la acción de semaforinas secretables; NrCAM se asocia con Np2 y aunque no une directamente semaforinas, es necesario en las respuestas tanto atractivas como repulsivas de Sema3B y Sema3F. Por lo tanto, NrCAM es un coreceptor de Np2 que transduce la señal de semaforinas y que, in vivo, interviene junto con Np2, Sema3B y Sema3F en determinados aspectos de la formación de la comisura anterior (Julien et al., 2005).

### 3.3.3.c) Integrinas

Existen evidencias de que la acción de semaforinas clase 3 a través de sus receptores puede interferir en la señal de integrinas. Ensayos in vitro demuestran que tanto la presencia de Sema3A o Sema3F exógenas como la supresión de la función de neuropilinas y plexinas en células endoteliales inhiben la adhesión al substrato, la extensión y la migración dependientes de integrinas; la sobreexpresión de Sema3A o la supresión de la función de sus receptores in vivo produce anomalías de vascularización en embriones de pollo (Serini et al., 2003). Por lo tanto, las semaforinas clase 3 pueden ejercer de forma autocrina un efecto inhibitorio sobre la función de integrinas en células endoteliales, lo que permite in vivo la correcta maduración de la vasculatura mediante la regulación de la adhesión y la migración endotelial. La señal de semaforinas a través de sus receptores interfiere a nivel intracelular, modificando el estado de activación de las integrinas (Nakamoto et al., 2004). Este mecanismo de acción en la regulación de integrinas es parecido al que ejerce Sema4D, una semaforina transmembrana que, a



través de su receptor PlexB1, interrumpe el acoplamiento funcional entre la adhesión mediada por integrinas y el citoesqueleto celular, produciendo el colapso celular e inhibiendo la migración de las células (Barberis et al., 2004). Sin embargo, Sema7A, una semaforina anclada a la membrana mediante una molécula GPI, interactúa con la función de integrinas de un modo distinto: Sema7A une directamente  $\beta 1$ -integrina mediante el dominio RGD presente en Sema7A, y la acción promotora del crecimiento axonal de Sema7A sobre neuronas de bulbo olfativo produce en ellas la fosforilación de las quinasas Fak y Erk, ambos hechos típicos de la vía de señalización de integrinas (Nakamoto et al., 2004).

### **3.4. Señalización intracelular inducida por semaforinas**

#### **3.4.1. Adaptación del cono de crecimiento a Sema3A**

Ya se han explicado los procesos de desensibilización y posterior resensibilización del cono de crecimiento axonal ante factores quimiotácticos, que le permiten adaptarse a un gradiente de concentración ascendente de dicho factor (ver más arriba). Al igual que sucede con Netrin1, el cono axonal se desensibiliza ante Sema3A mediante la endocitosis de su receptor Np1, que recupera su presencia en la membrana plasmática durante la resensibilización mediante tráfico endosomal y síntesis proteica (Piper et al., 2005). La respuesta repulsiva del axón inducida por Sema3A depende de síntesis de proteínas a nivel local (de forma independiente del soma), pero no de su degradación (Campbell y Holt, 2001).

#### **3.4.2. Nucleótidos cíclicos**

Ya se ha comentado que Sema3A, junto con NT3, señala a través de vías dependientes de cGMP y PKG (dependiente de cGMP), e independientes de la actividad de PI3K y de los niveles de cAMP y  $Ca^{2+}$  (ver más arriba). Según el nivel de nucleótidos cíclicos en la célula, la respuesta axonal ante un factor quimiotáctico puede ser atractiva o repulsiva (Song et al., 1998). Así, en axones espinales de *Xenopus* expuestos a Sema3A, agonistas de cGMP cambian la respuesta de repulsión a atracción (Song et al., 1998); el comportamiento de axones retinales de *Xenopus* ante Sema3A depende de cGMP (Campbell et al., 2001), y la distribución asimétrica de la guanilato ciclasa (enzima que sintetiza cGMP), con presencia mayoritariamente dendrítica, puede explicar el hecho de que axones y dendritas se comporten de forma antagónica ante Sema3A, mostrando repulsión y atracción respectivamente (Polleux et al., 2000).

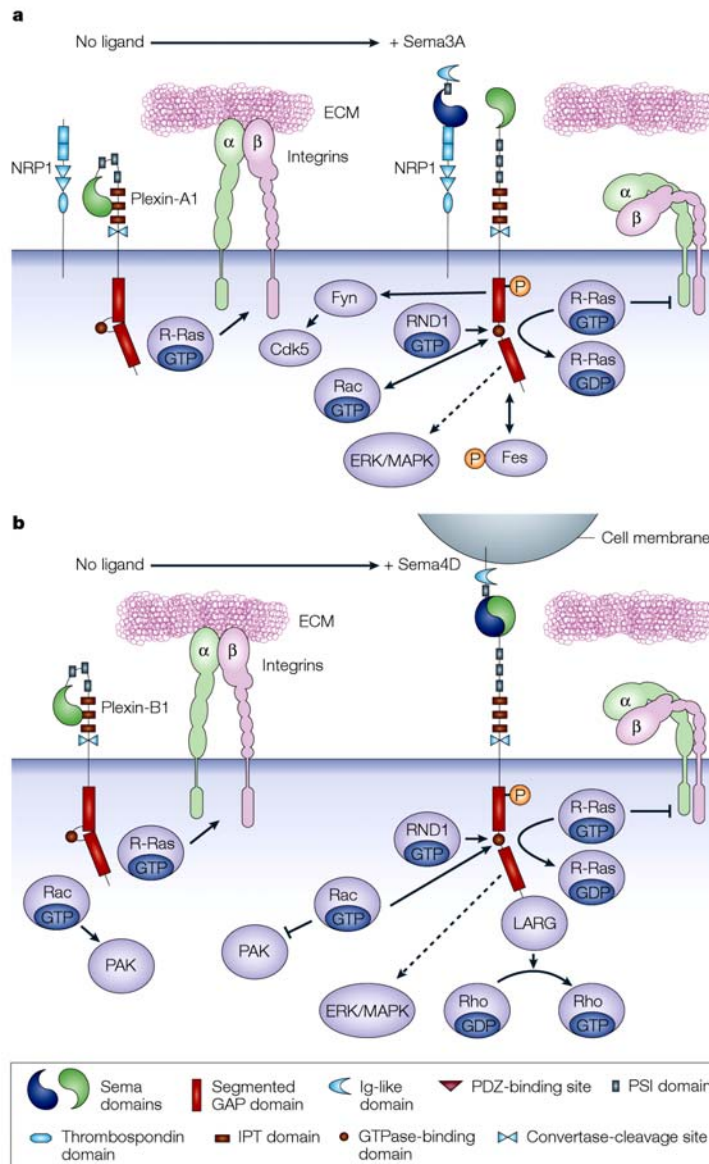
Existen evidencias que relacionan elementos de la vía de señalización de Sema3A con cambios en el nivel de cGMP: la interacción L1-Np1 en *trans* produce la síntesis de NO y con ello el aumento del nivel de cGMP, lo que da lugar a la reversión de la respuesta a Sema3A de repulsión a atracción (Castellani et al., 2002); y se ha sugerido que la actividad de RhoD, una GTPasa esencial en la función de Sema3A, pueda ser regulada por una proteína GEF dependiente de cGMP (Zanata et al., 2002).

Un reciente estudio añadió otro elemento regulador del nivel de nucleótidos cíclicos durante la señalización por semaforinas, al sugerir que la proteína de *Drosophila* Nervy participaba en la señal de semaforinas a través de plexinas (Terman y Kolodkin, 2004). Nervy es una proteína Akap (miembro de la familia MTG) que permite el anclaje de la PKA (dependiente de cAMP) a compartimientos citoplasmáticos concretos, y mediante varios dominios de unión a proteínas, recluta sustratos de la PKA entre otros elementos, por lo que facilita su fosforilación por parte de PKA y la consiguiente activación de señales intracelulares dependientes de cAMP (Bashaw, 2004). En dicho estudio, Terman y Kolodkin (Terman y Kolodkin, 2004) muestran que el subdominio intracelular C2 de PlexA de *Drosophila* une Nervy, que Nervy se expresa junto con PlexA en neuronas motoras de *Drosophila*, y que tanto la sobreexpresión como la supresión génica de Nervy indican que in vivo Nervy acopla PKA con PlexA para antagonizar la señal repulsiva de Sema1a (Terman y Kolodkin, 2004).

Sin embargo, un estudio posterior cuestiona estos resultados (Ice et al., 2005). Este trabajo demuestra que el anticuerpo usado en Terman y Kolodkin 2004 solamente reconoce algunos miembros de la familia MTG entre los cuales no está Nervy, y que un anticuerpo específico para Nervy tiñe núcleos de neuronas en el sistema nervioso central y periférico de *Drosophila*, pero no axones. De ese modo, Ice y colaboradores inciden en el hecho ya conocido de que la familia de proteínas MTG se localizan en el núcleo celular, donde actúan como represores en la transcripción, y apuntan a que los fenotipos mutantes debidos a la manipulación génica que aparecen en Terman y Kolodkin 2004 sean

debidos a una expresión génica alterada más que a la falta de anclaje de la PKA a la membrana plasmática, cerca de PlexA (Ice et al., 2005). A falta de más evidencias que clarifiquen el asunto, datos recientes sugieren que, además de cGMP, también cAMP puede regular la respuesta ante semaforinas, aunque en el caso de cAMP, la acción parece ser la de reprimir la respuesta repulsiva ante semaforinas más que convertirla en atractiva (Bashaw, 2004).

### 3.4.3. GTPasas Rho



**Figura 13. Señalización mediada por PlexA1 (a) y por PlexB1 (b).**

a) Sin ligando, r-Ras activa estimula la adhesión a la matriz extracelular a través de integrinas. La unión de semaforina a Np1 inicia la vía de señalización de PlexA1, cuya actividad GAP (dependiente de Rnd1) estimula la actividad GTPasa intrínseca de r-Ras y, en consecuencia, su inactivación y la posterior disminución de la adhesión a través de integrinas. La cascada de señalización inducida por PlexA1 también produce la activación de Fyn (que a su vez activa Cdk5) y de Erk/MAPK. La señalización entre PlexA1, Fes y Rac podría ser bidireccional.

b) La unión de Sema4D a PlexB1 activa directamente al receptor. La actividad GAP (dependiente de Rnd1) estimula la actividad intrínseca de r-Ras, inactivándola, lo que produce a su vez la inactivación de Pak. Además, la unión de Sema4D a PlexB1 secuestra la forma activa de r-Ras, suprimiendo así la actividad de Pak. (adaptado de Kruger et al., 2005)

Ya se ha mencionado la importancia de la familia de GTPasas Rho en la regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos (ver más arriba). Al igual que Netrina1, también las semaforinas ejercen su efecto quimiotáctico mediante el control de algunas GTPasas de la familia Rho: Rac1, RhoA, y Rnd1.

**Rac1.** Sema3A activa Rac1, y la forma activa de Rac1 (ligada a GTP) une la zona intermedia entre los dominios intracelulares C1 y C2 de PlexA1; además, la actividad de Rac1 es necesaria en el proceso de colapso de axones DRG desencadenado por Sema3A. El requerimiento de Rac1 en colapso axonal es contradictorio, ya que en general su acción se asocia a la extensión de la membrana plasmática (ver más arriba); sin embargo, un estudio resuelve la cuestión al demostrar que Rac1 es necesario en la endocitosis inducida por Sema3A, un paso esencial durante el colapso del cono de crecimiento (Negishi et al., 2005a).

Por otra parte, se ha observado que semaforinas pueden también inactivar Rac1. Rac1-GTP interacciona con PlexB1 en presencia de su ligando Sema4D a través del dominio CRIB situado entre los dominios C1 y C2 de la región intracelular de PlexB1 (Vikis et al., 2000); al unir la forma activa de Rac1, PlexB1 lo secuestra de su efector Pak, y eso explica porqué es necesaria la inactivación de Rac1 para que, en neuronas motoras de *Drosophila*, PlexB genere repulsión en respuesta a semaforinas (Hu et al., 2001; Negishi et al., 2005a). Además, la unión de Rac1 activo a PlexB1 estimula la unión de PlexB1 a su

ligando Sema4D al aumentar la presencia del receptor en la membrana (Vikis et al., 2002).

Por lo tanto, las evidencias apuntan a la existencia de procesos bidireccionales en respuesta a la interacción PlexB1-Rac1: PlexB1 regula la función de Rac1 apartándolo de la vía de señalización, y Rac1 controla la actividad de PlexB1 regulando la unión del receptor a su ligando (Negishi et al., 2005a).

**Rho.** En *Drosophila*, RhoA activa o inactiva una PlexB en una zona de su región intracelular distinta a la zona de unión de Rac1-GTP, y es necesaria la activación de RhoA en neuronas motoras para que éstas sean in vivo sensibles al efecto quimiorrepulsivo de semaforinas. Por lo tanto, en *Drosophila* RhoA y Rac1 actúan de forma antagónica en la vía de señalización mediada por PlexB, siendo RhoA activada y Rac1 inhibida (Hu et al., 2001). En vertebrados, inhibidores de RhoA y de Rock suprimen el colapso axonal producido por Sema4D a través de PlexB1 en neuronas hipocámpales cultivadas (Swiercz et al., 2002). Rock es un efector de RhoA cuya actividad produce la contracción de la actina, y por tanto la retracción de neuritas y el colapso del cono de crecimiento (Negishi et al., 2005a).

Como ya se ha explicado anteriormente, las proteínas GEF activan GTPasas al facilitar el cambio de GDP por GTP. Dos proteínas GEF específicas de Rho, PDZ-RhoGEF y Larg, contienen dominios PDZ en su extremo N-terminal y pueden acoplar la activación de Rho a receptores asociados a proteínas G. PDZ-RhoGEF y Larg interactúan in vitro e in vivo con PlexB1 a través de su dominio de unión a PDZ, situado en su región intracelular en el extremo C-terminal. PlexB1 regula la actividad de ambas proteínas GEF: in vitro, la unión de Sema4D al receptor aumenta considerablemente la actividad de RhoA en presencia de PDZ-RhoGEF/Larg activas, y PDZ-RhoGEF es necesaria para el colapso axonal inducido por la unión de Sema4D a PlexB1 en neuronas primarias de hipocampo (Swiercz et al., 2002).

Al igual que Rac1, PDZ-RhoGEF facilita la localización de PlexB1 en la membrana, aumentando así la unión del receptor con su ligando Sema4D (Swiercz et al., 2002).

**Rnd1.** Se caracteriza por su estado permanentemente activo y por su acción antagónica de las funciones de RhoA y Rac1 en la célula. Sin embargo, Rnd1 interviene en la señal mediada por plexinas de forma contraria, o sea, estimulando a RhoA; Rnd1 une el dominio CRIB en la región intermedia entre los dominios intracelulares C1 y C2 de PlexB1 independientemente de ligando, y esa unión estimula in vitro la interacción de PDZ-RhoGEF con PlexB1, lo que produce la activación de RhoA y finalmente la contracción celular (Negishi et al., 2005a).

**Actividad GAP de plexinas.** Los subdominios C1 y C2 de la región intracelular de plexinas tienen una elevada homología con proteínas GAP, que inactivan GTPasas al estimular la hidrólisis de GTP a GDP. Este hecho sugiere que las plexinas podrían tener actividad GAP, por lo que serían capaces de inactivar GTPasas. Rnd1 interactúa con el dominio CRIB de PlexB1; dicho tándem interactúa a su vez con la forma activa de r-Ras (perteneciente a la familia Ras de pequeñas GTPasas) y, en presencia de Sema4D, estimula la actividad GTPasa de r-Ras tanto in vitro como in vivo, promoviendo así su inactivación; además, tanto la activación de Rnd1 como la inactivación de r-Ras son necesarias para producir colapso axonal de neuronas primarias de hipocampo en respuesta a Sema4D (figura 13). Por lo tanto, PlexB1 sí puede actuar como una proteína GAP sobre r-Ras, confirmando previas suposiciones (Negishi et al., 2005a; Oinuma et al., 2004).

La actividad GAP de PlexB1 sobre r-Ras requiere dos pasos (figura 13): primero, la unión del dominio CRIB de PlexB1 a Rnd1 permite liberar la interacción entre los subdominios C1 y C2 de PlexB1 que mantenía su región citoplasmática en una conformación cerrada, y así PlexB1 puede unir r-Ras-GTP; segundo, la agrupación entre distintos complejos Rnd1-PlexB1 desencadenada por la unión de Sema4D a PlexB1 estimula la actividad GTPasa de r-Ras, produciendo su inactivación (Negishi et al., 2005a).

Las plexinas de clase A también poseen actividad GAP sobre la GTPasa Ras (figura 13). Rnd1 une el dominio CRIB que, al igual que en PlexB1, está presente entre los dos subdominios intracelulares C1 y C2; la unión de Rnd1 a PlexA1 produce el colapso en células Cos independientemente de Np1 o Sema3A, para lo cual son necesarios los dominios C1 y C2 intactos. A diferencia de RhoA y PlexB1, que no interactúan directamente (Vikis et al., 2000), RhoD-GTP une PlexA1 por la misma zona de unión a Rnd1, y en células Cos inhibe el colapso celular inducido por Sema3A a través de Np1 y PlexA1. Por lo tanto, Rnd1 y RhoD intervienen en la función de PlexA1 de forma antagónica: la unión de Rnd1 a PlexA1 podría promover la actividad Ras-GAP de PlexA1, que resulta imprescindible en la contracción

celular inducida por Sema3A, mientras que RhoD bloquea el colapso celular dependiente de Sema3A posiblemente compitiendo con Rnd1 por su unión a PlexA1. Teniendo en cuenta el estado constitutivamente activo de Rnd1, la antagonización de su función por parte de RhoD permitiría mantener a PlexA1 inactiva (Kruger et al., 2005; Rohm et al., 2000b; Zanata et al., 2002).

#### 3.4.4. GTPasa Ras

R-Ras es un miembro de la familia Ras que, junto con las proteínas Rho, forman la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas. R-Ras juega un papel esencial en los procesos de adhesión celular y crecimiento neurítico, y a diferencia de otros miembros de la familia Ras de pequeñas GTPasas, r-Ras no señala mediante Erk/MAPK, sino que regula la actividad de integrinas: r-Ras constitutivamente activa aumenta la adhesión celular mediada por integrinas, y este efecto es contrareestado por una forma mutada de r-Ras que presenta dominancia negativa. Teniendo en cuenta la actividad GAP sobre r-Ras de plexinas (ver más arriba), la inhibición de r-Ras comportaría a su vez la supresión de la actividad de integrinas, generando colapso axonal y retracción neurítica (Kruger et al., 2005; Negishi et al., 2005b).

#### 3.4.5. Proteínas quinasa

La familia de las plexinas contiene en su dominio intracelular varios residuos tirosina conservados entre sus distintos miembros; la fosforilación de residuos tirosina en PlexA3 y B1 llevó a pensar que alguna proteína con actividad tirosina quinasa pudiera participar en la vía de señalización de plexinas (Tamagnone et al., 1999).

Varios estudios demuestran la participación de las quinasas Fes/Fps, Fyn y Cdk5 en el colapso de axones DRG inducido por Sema3A. La tirosina-quinasa Fes/Fps une la región intracelular de PlexA1, y en estado basal, Np1 impide la interacción entre PlexA1 y Fes; la unión de Sema3A con su receptor Np1 permite a Fes unir PlexA1 y activarse, fosforilando PlexA1 y el complejo Cram/Crmp2 (Mitsui et al., 2002). Se ha demostrado la participación de la tirosina-quinasa Fyn y Sema3A in vivo en el desarrollo dendrítico de neuronas corticales. Fyn une y fosforila la región intracelular de PlexA1 y A2, y la fosforilación aumenta en presencia de Np1; Cdk5, con actividad serina/treonina quinasa, interacciona con PlexA2 uniéndose a Fyn activo, que a su vez fosforila y activa a Cdk5 (Sasaki et al., 2002). Cdk5 puede fosforilar Crmp2, facilitando posiblemente la posterior fosforilación de Crmp2 por parte de Gsk3 (Brown et al., 2004).

Por otra parte, Gsk3, que al igual que Cdk5 tiene actividad serina/treonina quinasa, colocaliza en su forma inactiva con F-actina en la periferia del cono de crecimiento axonal. Sema3A activa Gsk3, y la actividad de Gsk3 es necesaria para el colapso axonal inducido por Sema3A. Por lo tanto, Gsk3 puede participar en la señalización de Sema3A, acoplándola con la reorganización del citoesqueleto de actina y regulando así la motilidad axonal (Eickholt et al., 2002).

#### 3.4.6. Crmp

En la búsqueda de elementos en la vía de señalización de Sema3A, se identificó Crmp-62, una proteína intracelular homóloga a Unc33 en *C.elegans*, que resultaba esencial en el colapso de axones DRG inducido por Sema3A (Goshima et al., 1995). Crmp62 (rebautizada como Crmp2) es el miembro fundador de una familia de proteínas citosólicas que se expresan específicamente en neuronas durante el desarrollo, y que participan en la señalización intracelular de semaforinas (Pasterkamp y Kolodkin, 2003; Wang y Strittmatter, 1996). Crmp2 reconstituye la cascada de señalización de Sema3A dependiente de proteínas G (Goshima et al., 1995), y es fosforilada por quinasas que forman parte de la señal intracelular iniciada por semaforinas, como Fes/Fps o Cdk5 (Brown et al., 2004; Mitsui et al., 2002). Crmp2 promueve el ensamblaje de microtúbulos, y estimula el crecimiento y la ramificación del axón (Fukata et al., 2002), lo que subraya la importancia que la regulación de proteínas Crmp por parte de semaforinas podría tener en repulsión y colapso.

### 3.4.7. Reacciones redox

Mical, una flavoproteína con actividad monooxigenasa que cataliza la oxidación de distintos sustratos, interacciona con el extremo C-terminal de la región intracelular de plexinas clase A. En *Drosophila*, Mical une PlexA, y los individuos con pérdida de función en los genes *Mical*, *PlexA* y *Sema1a* muestran fenotipos parecidos, caracterizados por defectos en la guía de axones motores. En vertebrados, la inhibición de la actividad monooxigenasa suprime in vitro el colapso y la repulsión ejercidos por Sema3A en axones DRG. Por lo tanto, Mical interviene en la señalización de semaforinas clases 1 y 3 interactuando directamente con plexinas clase A, y la función oxidativa de Mical es imprescindible para los efectos repulsivos mediados por dichas semaforinas (Terman et al., 2002).

Las flavoproteínas monooxigenasas pueden actuar de forma indirecta, generando un aumento local de oxígeno reactivo en la célula, o bien directamente cambiando el estado redox de varios sustratos, como proteínas del citoesqueleto o miembros de la familia Rho de pequeñas GTPasas (Ventura y Pelicci, 2002); de hecho, se ha demostrado que la oxidación de actina provoca su despolimerización (Pasterkamp y Kolodkin, 2003). Por otra parte, hay que tener en cuenta que Mical fue inicialmente identificada como un elemento que interacciona con CasI; CasI forma parte de la familia Cas de proteínas citosólicas que residen básicamente en las adhesiones focales de la célula y que intervienen en la regulación del citoesqueleto dependiente de integrinas (Suzuki et al., 2002). Por lo tanto, Mical podría ser un nexo entre plexinas y el citoesqueleto neuronal en las funciones repulsivas de guía axonal mediadas por semaforinas (Kruger et al., 2005).

12-15/lipoxigenasa, un enzima oxidante que forma parte de la ruta de síntesis del eicosanoide 12(S)-HETE, es necesario en el colapso de axones DRG inducido por Sema3A. Axones DRG tratados con Sema3A experimentan un aumento de HETE en el cono de crecimiento que actúa desmantelando los puntos de adhesión focal, lo que comporta colapso axonal y repulsión (Mikule et al., 2002).

### 3.4.8. Sema3A y el citoesqueleto de actina

Se cree que los factores guía influyen en el movimiento del axón alterando el citoesqueleto neuronal, lo que produce el cambio en la morfología del cono de crecimiento. Así, Sema3A estimula la despolimerización de actina en la periferia del cono axonal durante su colapso, sin alterar significativamente los microtúbulos (Fan et al., 1993). En el cono de crecimiento colapsado por acción de Sema3A, la actina se concentra en su centro, alrededor de estructuras endosomales derivadas del aumento de la actividad endocítica (Fournier et al., 2000). Sema3A altera el estado de polimerización de actina a través de Lim, una quinasa serina/treonina que fosforila e inactiva a una proteína despolimerizadora de actina llamada Cofilina. Sema3A produce la fosforilación y defosforilación de Cofilina en conos de crecimiento de axones DRG, y es necesaria la activación de Lim (que depende de las quinasas Pak y Rock) para que axones DRG se colapsen ante Sema3A. En la señal intracelular iniciada por Sema3A, la quinasa Lim es activada y fosforila a Cofilina, liberándola de la molécula de actina a la que estaba ligada; Cofilina fosforilada es aún inactiva, por lo que es posible que, además de la quinasa Lim, participe también en la señal de Sema3A un enzima con actividad fosfatasa que defosforila Cofilina y la devuelve a su estado activo (Aizawa et al., 2001).

## 4. OTRAS FAMILIAS DE FACTORES GUÍA

### 4.1. Slit

La familia Slit de proteínas solubles fueron descubiertas a finales de la década de los 90 según dos aproximaciones distintas: se identificó a Slit como el ligando del receptor Robo y factor responsable de la actividad repulsiva axonal presente en la línea media de *Drosophila* (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999), y como el factor derivado de extractos cerebelares que estimulaba la elongación y ramificación de axones sensoriales espinales (Brose y Tessier-Lavigne, 2000; Wang et al., 1999). La familia Slit incluye miembros en *Drosophila*, en mamíferos y en pollo (Brose y Tessier-Lavigne, 2000), que se expresan en la línea media del sistema nervioso central y están asociados a la matriz extracelular (Brose y Tessier-Lavigne, 2000; Rothberg et al., 1990). Contienen una secuencia señal seguida de cuatro repeticiones ricas en leucina, siete repeticiones tipo EGF, y un dominio LNS típico de otras proteínas de matriz extracelular, situado entre el sexto y el séptimo dominio EGF (Brose y Tessier-Lavigne, 2000; Rothberg et al., 1990). Algunos miembros de la familia presentan un dominio de proteólisis entre la quinta y la sexta repetición EGF que genera un fragmento N-terminal y otro fragmento C-terminal más pequeño (figura 14) (Brose et al., 1999). Sus receptores, la familia de proteínas *Roundabout* (Robo), forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y presentan cinco dominios Ig, seguidos de tres dominios Fibronectina tipo III, un dominio transmembrana y una región intracelular que interacciona directamente con varios elementos reguladores del estado del citoesqueleto celular: con la proteína tirosina-quinasa Abelson, con su sustrato, Enabled, o con proteínas GAP inactivadoras de la GTPasa Rac (figura 14) (Bashaw et al., 2000; Hu et al., 2005; Kidd et al., 1998; Wong et al., 2001).

Junto con Netrin1, las proteínas Slit están tradicionalmente ligadas al proceso de guía de axones en la línea media, función descrita inicialmente en *Drosophila*, aunque conservada a lo largo de la evolución y presente también en vertebrados (Brose y Tessier-Lavigne, 2000; Dickson y Keleman, 2002). Generalmente, Slit interviene como factor repulsivo no solamente en la proyección de axones en la línea media, sino también el desarrollo de conexiones en otras regiones del sistema nervioso central, como el tracto olfativo lateral, o en las principales conexiones de la formación hipocampal (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999).

Slit también actúa como factor quimiotáctico en la migración de distintos tipos celulares durante el desarrollo: Slit repele células mesodérmicas precursoras de fibras musculares desde la línea media de *Drosophila*, que más tarde son atraídas por Slit presente en los puntos de anclaje musculares (Kidd et al., 1999; Kramer et al., 2001). Slit repele neuronas de la zona subventricular pertenecientes a la corriente rostral migratoria (RMS), que aporta células al bulbo olfativo (Wu et al., 1999), y desde la zona ventricular de la eminencia ganglionar, Slit repele a las interneuronas del subpallio y las dirige hacia la neocorteza (Zhu et al., 1999); Slit silencia la señal atractiva de Netrin1 sobre células de la oliva inferior, impidiendo que sus somas atraviesen la línea media (Bloch-Gallego et al., 2005).

Slit estimula la ramificación de axones sensoriales y GABAérgicos in vitro (Sang et al., 2002; Wang et al., 1999), efecto que resulta contrario a la función de repeler axones y células durante el desarrollo. Parece ser que el fragmento N-terminal de Slit generado tras su proteólisis acapara la función de ramificación, mientras que la proteína completa antagoniza la actividad de ramificación y es responsable, a su vez, de la repulsión celular; por lo tanto, pueden existir

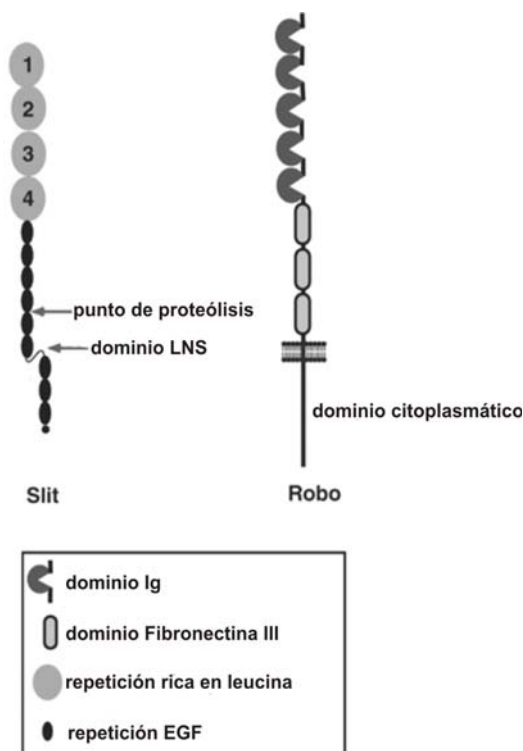


Figura 14. Estructura de Slit y de su receptor Robo.

Slit es una molécula de matriz extracelular que contiene, empezando por su extremo N-terminal, 4 repeticiones ricas en leucina, 7-9 repeticiones EGF, un dominio LNS y un punto de proteólisis. Robo contiene en su región extracelular 5 dominios Ig seguidos de 3 dominios Fibronectina tipo III; presenta además una región transmembrana y una región intracelular larga con dominios específicos (adaptado de (Chedotal et al., 2005)

diferencias en la señalización de Slit que dan lugar a funciones contrapuestas (Brose y Tessier-Lavigne, 2000).

#### 4.1.1. Guía axonal en la línea media

En *Drosophila*, la mutación nula del gen *Slit* genera un fenotipo de “línea media colapsada”, en el que los axones comisurales alcanzan la línea media, pero en vez de atravesarla, permanecen en ella formando un único tracto ascendente (Rothberg et al., 1990). Contrariamente a lo esperado, la deficiencia génica de sus receptores, las proteínas Robo, producían fenotipos distintos: en el mutante Robo los axones comisurales cruzan una y otra vez la línea media (Seeger et al., 1993), mientras que en el mutante Robo2 se observan alteraciones en los tractos axonales longitudinales, pero las comisuras aparecen normales; el doble mutante Robo/Robo2, en cambio, sí muestra un fenotipo similar al del mutante Slit (Simpson et al., 2000b). Por lo tanto, Robo y Robo2 son responsables de todas las acciones de Slit en la guía de axones comisurales en la línea media, respondiendo ambos receptores ante Slit con repulsión, aunque de forma distinta tanto cuantitativa como cualitativamente (Simpson et al., 2000b). *Robo* y *Robo2* se expresan en el sistema nervioso central desde estadios tempranos, y sus respectivas proteínas están presentes en los axones que proyectan ipsilateralmente desde el principio de su trayectoria (Kidd et al., 1998; Simpson et al., 2000b), sin embargo, la proteína Robo se localiza a elevados niveles en los axones comisurales únicamente cuando éstos ya han cruzado la línea media (Kidd et al., 1998). Este hecho es debido a la expresión de la familia de genes *Comm* específicamente en axones comisurales, y momentáneamente cuando éstos cruzan la línea media (Keleman et al., 2002). Los genes *Comm* codifican proteínas transmembrana presentes mayoritariamente en el compartimiento intracelular de Golgi y endosomal (Tear et al., 1996), y que actúan como receptores de clasificación, desviando a Robo hacia endosomas tardíos y lisosomas (Keleman et al., 2002; Keleman et al., 2005), y produciendo en última instancia la disminución del nivel de proteína Robo y Robo2 solamente en axones comisurales en tránsito por la línea media de *Drosophila* (Simpson et al., 2000b). La función atribuida a las proteínas Comm en la guía de axones comisurales concuerda con el fenotipo de mutaciones nulas, caracterizado por la falta de comisuras en el sistema nervioso central (Seeger et al., 1993).

En vertebrados, Slit y sus receptores Robo parecen funcionar de forma similar en la guía de axones comisurales de la medula espinal: tres miembros de la familia *Slit* se expresan en la línea media, y en el ratón triple deficiente los axones comisurales no abandonan la línea media (Long et al., 2004). Además, las proteínas Robo y Robo2 se localizan mayoritariamente en axones comisurales que ya han cruzado la línea media, precisamente cuando se vuelven sensibles al efecto repulsivo de Slit e insensibles a la actividad quimioattractiva de la línea media (Guthrie, 2004; Sabatier et al., 2004). Sin embargo, existen ciertas diferencias entre el modelo de guía axonal en la línea media de *Drosophila* y vertebrados: en éstos aún no se ha identificado un homólogo de Comm, mientras que, a diferencia de *Drosophila*, Rlg/Robo3 expresado en axones comisurales espinales previamente al cruce de la línea media anula la sensibilidad de dichos axones hacia el quimiorepelente Slit, posiblemente interfiriendo con receptores Robo en su unión a Slit o en la cascada de señalización intracelular (Guthrie, 2004; Sabatier et al., 2004). Además, en vertebrados se ha demostrado que los axones comisurales espinales pierden la sensibilidad ante el efecto atractivo de Netrin1 presente en la línea media una vez la han cruzado, debido a que la interacción entre Robo y Dcc a nivel intracelular produce la inactivación de Dcc y, por consiguiente, el silenciamiento de la señal de Netrin1 (Shirasaki et al., 1998; Stein y Tessier-Lavigne, 2001).

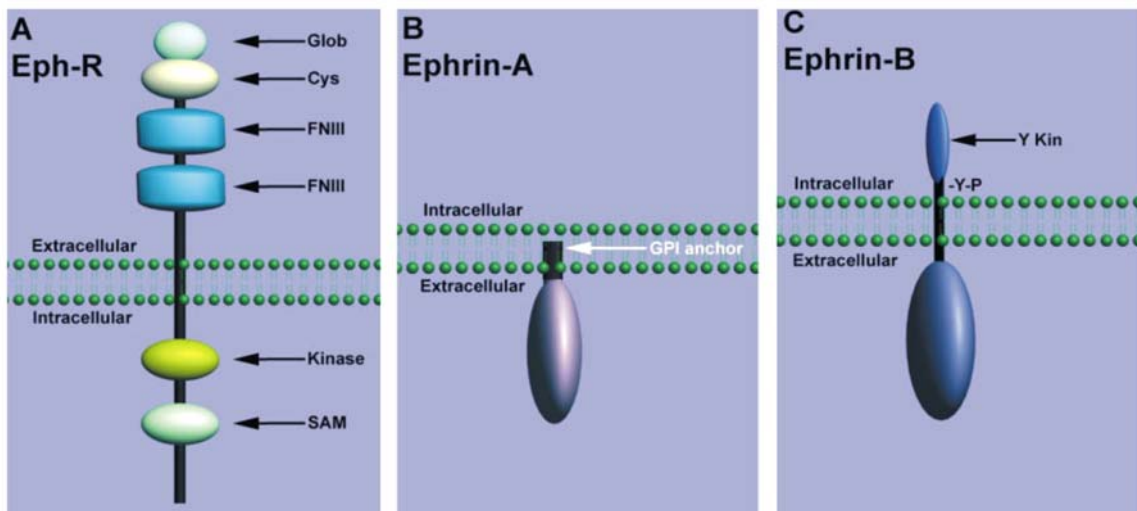
Además de guiar axones a través de la línea media, Slit y sus receptores Robo también determinan en *Drosophila* la posición longitudinal respecto a la línea media tanto en axones que no la cruzan (una minoría), como en axones comisurales una vez la han cruzado (una mayoría); así, el patrón de expresión longitudinal de Robo, Robo2 y Robo3 permite dividir el sistema nervioso central en tres grandes áreas paralelas a la línea media: axones que expresan únicamente Robo se extienden longitudinalmente según una trayectoria medial (cerca de la línea media), aquellos que, además, expresan Robo3 lo hacen en posiciones intermedias, y los que expresan Robo, Robo3 y Robo 2 se sitúan lateralmente (lejos de la línea media). Por lo tanto, Slit actúa como un factor quimiotáctico de corto alcance para axones comisurales en tránsito por la línea media, y como un factor quimiotáctico de largo alcance que difunde desde la línea media formando un gradiente que afecta a axones de trayectoria

longitudinal, tanto si han cruzado ya la línea media como si no la cruzan nunca (Rajagopalan et al., 2000; Rothberg et al., 1990; Simpson et al., 2000a).

#### 4.2. Efrinas-Eph

A finales de la década de los ochenta se descubrió el primer miembro de la familia de receptores con actividad tirosina-quinasa Eph, una proteína sobreexpresada por varios tipos de carcinomas humanos (Hirai et al., 1987), y el patrón de expresión de dichos receptores dio a entender que estaban relacionados con el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (Martinez y Soriano, 2005). Más tarde, a principios de los noventa, se identificó a Efrina A1 como un ligando de Eph (Bartley et al., 1994), y el primer miembro de la familia de proteínas Efrinas (*Ephrins*) (Martinez y Soriano, 2005). Las efrinas pueden ser de tipo A, unidas a membrana mediante una molécula GPI, o de tipo B, proteínas transmembrana, mientras que los receptores Eph, a su vez, se dividen en EphA y EphB según su preferencia por unir efrinas A o efrinas B respectivamente; sin embargo, existen excepciones: EphA4 une efrinas A y algunas efrinas B, y Efrina A5 une EphB2 (Martinez y Soriano, 2005).

Las Efrinas tienen un único dominio N-terminal de unión a Eph, separado de la membrana por una secuencia de 40 AA; a continuación, efrinas A tienen una molécula GPI mediante la cual se anclan a la membrana plasmática, mientras que las efrinas B tienen un dominio transmembrana seguido de una corta región intracelular que contiene un dominio de unión a dominios PDZ (Martinez y Soriano, 2005).



**Figura 15. Estructura del receptor Eph (A), Efrinas A (B) y Efrinas B (C).**

Eph contiene en su región extracelular un dominio globular (Glob, a través del cual une efrinas), un dominio rico en cisteínas (Cys) y dos dominios Fibronectina III (FNIII); su región intracelular presenta un dominio con actividad tirosina-quinasa (Kinase), y un dominio SAM que le permite la oligomerización. Efrinas A están formadas por un dominio extracelular de unión a Eph, y un dominio GPI de anclaje a membrana. Efrinas B tienen el mismo dominio extracelular de unión a Eph que Efrinas A, más una región transmembrana y una región intracelular corta que incluye puntos de fosforilación por actividad tirosina-quinasa (Y Kin) (adaptado de Sandvig et al., 2004).

Los receptores Eph están compuestos en su región extracelular por un dominio globular en su extremo N-terminal de unión a ligando, seguido de un dominio rico en cisteínas y dos dominios tipo Fibronectina III implicados en dimerización y en la interacción con otras proteínas. Además del dominio transmembrana, contienen en su región intracelular el dominio con actividad quinasa y, en su extremo C-terminal, un dominio SAM, que permite la homo o hetero-oligomerización de Eph (necesaria para las funciones de guía axonal), y un dominio de unión a dominios PDZ (figura 15). La interacción entre efrinas y Eph desencadena su multimerización en la superficie celular y la formación de zonas de señalización localizadas en lugares de contacto entre células o procesos celulares (Martinez y Soriano, 2005; Sandvig et al., 2004).

Efrinas y Eph desempeñan distintas funciones durante el desarrollo del sistema nervioso central. En etapas embrionarias muy tempranas, ambas familias de proteínas se expresan de forma complementaria en el cerebro posterior y medula espinal, y las interfases entre los dominios de efrinas y

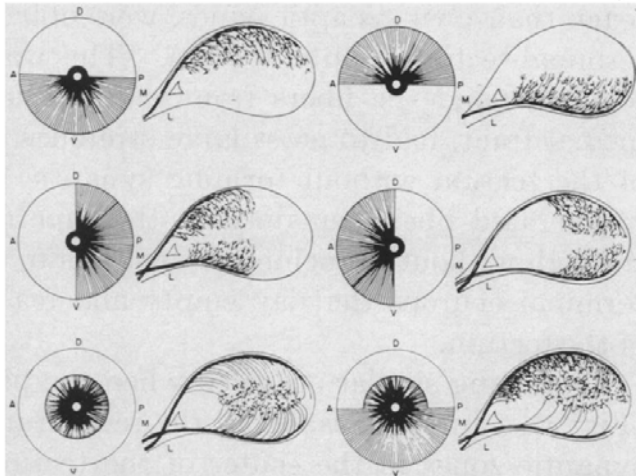


eph coinciden con los límites de rombómeros y somitas en el cerebro posterior y la medula espinal, respectivamente. La acción repulsiva bilateral derivada de la interacción entre parejas Efrina/Eph permite la distribución de células entre compartimientos contiguos al impedir que éstas se entremezclen (Martinez y Soriano, 2005; Mellitzer et al., 1999; Xu et al., 1999).

Efrinas B expresadas en la parte posterior de las somitas podrían restringir in vivo la migración de células de la cresta neural y de axones de motoneuronas, ya que ambos tipos celulares expresan receptores Eph B y son repelidos por sus ligandos in vitro (Wang y Anderson, 1997). La regulación en la migración celular podría deberse a cambios en el estado de adhesión celular inducidos por la interacción del sistema efrinas/Eph con integrinas (Martinez y Soriano, 2005). Efrinas/Eph también participan en la guía de axones comisurales y vomeronasales, mediante repulsión y el aumento de la adhesión, respectivamente, y estimulan la ramificación axonal y su posterior poda (Martinez y Soriano, 2005).

Efrinas/eph se expresan en las uniones neuromusculares y en las regiones pre y postsinápticas del sistema nervioso central durante el desarrollo, lo que llevó a plantear su posible papel en sinaptogénesis. De hecho, se comprobó que efrinas/eph estaban directamente implicadas en el establecimiento, correcto desarrollo y estabilización de sinapsis, en modelar la morfología de espinas dendríticas tanto en sinapsis en desarrollo como ya maduras, y podría además regular la función sináptica (Martinez y Soriano, 2005).

#### 4.2.1. Formación de mapas topográficos



**Figura 16. Teoría de la quimioafinidad.**

Dibujo que representa los experimentos que dieron lugar a la formulación de la teoría de la quimioafinidad; tras la eliminación del nervio óptico y de distintas regiones de la retina, los axones retinales regeneraban e invadían de nuevo el tectum manteniendo la topografía de la conexión original, que dependía del punto de origen de las fibras seccionadas (Sperry, 1963)

La función más relevante de las atribuidas a Efrinas y receptores Eph posiblemente sea la formación de mapas topográficos en distintas regiones del cerebro, como los establecidos por las proyecciones hipocampo-septal, talamocortical, retinotectal y olfativa. En todos los casos se requiere la expresión complementaria, en forma de gradiente, de efrinas y Eph en las regiones origen y diana de la proyección (Martinez y Soriano, 2005). Se han propuesto varias hipótesis para explicar el mecanismo de formación de mapas topográficos, la mayoría de ellas construidas a partir de estudios de la proyección retinotectal. La primera de ellas, la llamada “teoría de la quimioafinidad”, fue expuesta por Sperry en el año 1963 (Sperry, 1963). Basándose en experimentos en los que se seccionaba el nervio óptico y se eliminaba parte de la retina, para así monitorizar la trayectoria y terminación de los axones retinales provenientes de la parte intacta (figura 16), Sperry propuso la existencia de dos gradientes citoquímicos distribuidos a lo largo de los ejes anteroposterior uno de ellos, y dorsoventral el otro, y presentes en la región de destino (tectum) y de forma invertida, también en la región de origen (retina); así, cada célula ganglionar retinal estaría identificada por un código químico que concordaría con el de su célula diana en el tectum (Sperry, 1963). Ya en los años noventa, se descubrieron gradientes complementarios de receptores eph en la retina y de efrinas en el tectum (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995) y se pudo constatar que la supresión funcional de efrinas y eph in vivo producía alteraciones en el mapa topográfico de la proyección retinal (Feldheim et al., 2000; Feldheim et al., 2004). Por lo tanto, el sistema efrinas/eph parecía proporcionar ese “código citoquímico” concordante entre la célula que

emitía el axón y la célula con la que el axón conectaba, y al que hacía referencia la teoría de la quimioafinidad de Sperry (Sperry, 1963).

Recientemente, Hansen y colaboradores (Hansen et al., 2004) propusieron un modelo de acción de efrinas/Eph en la formación del mapa topográfico retino-colicular, que resolvía cuestiones surgidas previamente (Martinez y Soriano, 2005) y aportaba un mecanismo molecular a la generación de mapas topográficos, confirmando a la vez la teoría de la quimioafinidad (Sperry, 1963). En dicho modelo, Efrina A expresada en el colículo según un gradiente creciente anterior-posterior, actúa sobre axones retinales de forma antagónica dependiendo de su concentración: niveles bajos estimulan el crecimiento axonal, mientras que niveles altos lo inhiben. Existe, pues, una concentración de Efrina A que equilibra los efectos promotor e inhibidor del crecimiento, y que provoca que el axón retinal, que avanza a través del colículo en dirección anterior-posterior, se detenga. Dicha concentración de Efrina A de equilibrio/stop resulta distinta para cada axón o grupo de axones retinales, dependiendo de su procedencia en el eje nasal-temporal: es alta para axones retinales nasales, lo que les permite alcanzar posiciones más posteriores en el colículo, y es baja para axones temporales, lo que les obliga a detenerse en posiciones anteriores. Esta diferencia en la sensibilidad hacia la concentración stop de Efrina A muy probablemente sea debida a la concentración diferencial de receptores Eph, que en general muestran un gradiente de expresión en la retina creciente nasal-temporal: eso explica que los axones temporales sean más sensibles al efecto de Efrina A y por ello, su concentración stop de Efrina A sea más baja (Hansen et al., 2004).

Por lo tanto, el modelo de Hansen y colaboradores (Hansen et al., 2004) cuadra con la teoría de la quimioafinidad, al proponer que las coordenadas del mapa topográfico sean definidas según la presencia gradual creciente de Efrina A a lo largo del eje antero-posterior del tectum/colículo, más la presencia gradual decreciente de receptores eph a lo largo del eje nasal-temporal, que produciría la respuesta gradual de los axones retinales según dos variables: la concentración de Efrina A en la región diana, y la concentración de Eph según la posición de las células ganglionares (origen de los axones retinales) en la retina (Hansen et al., 2004).

Si la pareja efrinas A/Eph A determina la topografía de la conexión retinal en el eje antero-posterior, parece ser que efrinas B y sus receptores Eph B se encargan de establecerla en el eje dorso-ventral. Así, varios receptores Eph B se expresan en la retina según un gradiente creciente dorsal-ventral, mientras que efrinas B se expresan según un gradiente invertido decreciente dorsal-ventral en el tectum. Aunque varios estudios indican que efrinas B/Eph B modulan la proyección retinal mediante atracción (Martinez y Soriano, 2005), datos recientes apuntan a que los receptores Eph B son capaces de interpretar la señal de efrinas B de forma tanto atractiva como repulsiva (McLaughlin et al., 2003), algo parecido a lo que ocurre con efrinas A/Eph A en la proyección retinocolicular según el eje antero-posterior (Hansen et al., 2004).

#### 4.2.2. Señalización bidireccional Efrinas-Eph

Una de las principales características de la pareja Efrina/Eph es su capacidad de señalización bidireccional: tras su unión, tanto efrinas como receptores Eph pueden inducir cascadas de señalización intracelular, por lo que ambos pueden actuar tanto de ligando como de receptor (Martinez y Soriano, 2005). Las vías de señalización inducidas por la interacción Efrina/Eph tienen como objetivo mayoritario la alteración del citoesqueleto celular, y en general producen respuestas inhibitorias en la célula, como colapso del cono de crecimiento o retracción neurítica (Martinez y Soriano, 2005); sin embargo, se ha descrito recientemente que la interacción entre EfrinaB1 y EphA2 genera la extensión de neuritas en células de neuroblastoma y neuronas corticales cultivadas (Tanaka et al., 2004).

Las vías de señalización inducidas por receptores Eph empiezan con su autofosforilación tras su unión a efrinas; una vez activados, los receptores Eph regulan la actividad de GTPasas de la familia Rho (a través de proteínas GEF) y de la familia Ras, produciendo en última instancia alteraciones en el citoesqueleto de actina y, en consecuencia, cambios en la morfología neurítica (Martinez y Soriano, 2005). Además, los receptores Eph interactúan con una gran variedad de proteínas en la superficie celular, iniciando así cascadas de señalización específicas que confieren a la pareja Efrina/Eph funciones como adhesión celular o modulación sináptica; (Martinez y Soriano, 2005).

La señalización mediada por efrinas es conocida como señalización reversa. La unión de Efrinas B a sus receptores Eph específicos da lugar a la fosforilación de su dominio intracelular (normalmente en residuos tirosina) y a la posterior activación de vías de señalización que terminan regulando el

citoesqueleto celular (Martinez y Soriano, 2005). Las efrinas A, sin región intracelular al estar ancladas a la membrana a través de una molécula GPI, son sin embargo capaces de iniciar una señal reversa tras su unión a Eph: concretamente, la interacción entre EphA3 y EfrinaA2 o A5 produce la activación por parte de efrinas de una vía de señalización que, a través de integrinas y tirosina quinasas Src, da lugar a un aumento de la adhesión celular (Martinez y Soriano, 2005).

### 4.3. Reelina

El gen *Reelina* fue identificado a partir de una cepa de ratones llamada reeler, descubierta en 1948 por presentar alteraciones en la locomoción aparecidas de forma espontánea en un grupo de ratones del Instituto de Genética Animal en Edimburgo, Escocia. La mutación reeler es autosómica recesiva, y debe su nombre al característico andar tambaleante que aparece en los individuos

homocigotos a partir de las dos semanas postnatales, acompañado de ataxia, temblores y dificultad en mantener el equilibrio. Estas alteraciones neurológicas se asocian a nivel anatómico con una severa hipoplasia del cerebelo, y a nivel histológico con anomalías en el posicionamiento de células que afectan severamente a estructuras laminadas como la corteza cerebral, el hipocampo o la corteza cerebelar, aunque también se

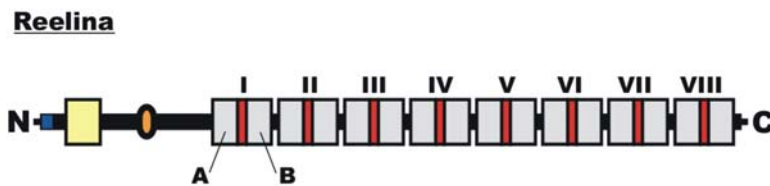


Figura 17. Estructura de Reelina.

Reelina es una proteína de gran tamaño, con un dominio de homología a F-Espondina en su extremo N-terminal y un dominio central formado por ocho unidades, cada una de ellas compuesta de una repetición EGF flanqueada a cada lado por subdominios A/B.

- péptido señal
- dominio F-Espondina
- epitopo CR-50
- subdominios A/B
- dominio EGF

han detectado anomalías menos drásticas en otras regiones del cerebro como los núcleos facial, trigémino y de la oliva inferior. (D'Arcangelo y Curran, 1998; Tissir y Goffinet, 2003).

El gen *Reelina* codifica una proteína de gran tamaño (aproximadamente 385 kDa) que presenta una secuencia señal en su extremo N-terminal, seguida de una pequeña región homóloga a F-Espondina, una proteína secretada por células de la placa del suelo en el tubo neural en desarrollo. En su extremo C-terminal hay una secuencia de aminoácidos cargados positivamente, y en la estructura central se distinguen ocho repeticiones, cada una de ellas con un dominio EGF rico en cisteínas flanqueado por dos subdominios llamados A y B (figura 17). La proteína Reelina es secretada al medio extracelular a través de una vía constitutiva, y contiene además dos lugares principales de proteólisis por acción de metaloproteinasas que dan lugar, una vez secretada, a tres fragmentos mayoritarios: un fragmento N-terminal de 180 kDa, un fragmento central de 120 kDa, y un fragmento C-terminal de 100 kDa. El fragmento central es suficiente para la función de Reelina (concretamente, las repeticiones 3-6 son suficientes para unir VLDLR y ApoER2, y para inducir la fosforilación de Dab1), pero la proteína completa es más activa, posiblemente porque el fragmento N-terminal contiene un epítipo reconocido por el anticuerpo CR-50 que produce la agregación de moléculas de Reelina, lo que a su vez facilita la agrupación del receptor y genera una señal intracelular más intensa. De hecho, el anticuerpo CR-50 inhibe la unión de Reelina a sus receptores, así como la agregación de la proteína (D'Arcangelo, 2006; D'Arcangelo y Curran, 1998; Tissir y Goffinet, 2003).

La mutación simultánea en los genes que codifican dos receptores de lipoproteínas, *VLDLR* y *ApoER2*, generan en ratón un fenotipo similar al reeler, por lo que se les incluyó en la vía de señalización dependiente de Reelina. *VLDLR* y *ApoER2* son proteínas transmembrana que unen Reelina y transducen su señal. Ambos receptores tienen una estructura parecida: la región de unión a Reelina está formada por 7-8 repeticiones leucina-alanina ricas en cisteína, cada una de ellas con tres uniones disulfuro y un ion  $Ca^{2+}$  de coordinación, y la siguen dos repeticiones EGF, un segmento tipo hélice- $\beta$  con repeticiones leucina-tirosina, otra repetición EGF y una región de glucosilación cercana a la membrana plasmática; tras el dominio transmembrana, el dominio intracelular contiene una secuencia asparragina-prolina-cualquier aminoácido-tirosina (NPXY), punto de interacción con dominios de unión a fosfotirosina (PTB) presentes en proteínas citosólicas como Dab1. Sin embargo, y a diferencia de la

mayoría de proteínas con dominios PTB, Dab1 une con gran afinidad secuencias NpxY sin fosforilar (Tissir y Goffinet, 2003). La región intracelular de ApoER2 está sujeta a *splicing* alternativo del exón 19 que genera moléculas de receptor con o sin un dominio con capacidad de unión a proteínas adaptadoras como Psd95 y Jip (D'Arcangelo, 2005); se ha demostrado que el exón 19 de ApoER2 está implicado en la función de Reelina en aprendizaje y memoria durante la edad adulta (Beffert et al., 2005).

La inactivación del gen *Disabled1 (Dab1)*, así como mutaciones espontáneas *scrambler* y *yotari* que afectan al mismo gen, producen también fenotipos tipo reeler. Dab1 es una proteína citosólica que funciona como adaptadora. En su región N-terminal, Dab1 contiene dos regiones que le permiten la interacción con otras proteínas: el dominio PTB, a través del cual une, entre otras, VLDLR y ApoER2 anclándose a su secuencia intracelular NPxY (Homayouni et al., 2001; Tissir y Goffinet, 2003), y una secuencia rica en tirosinas, que tras ser fosforiladas por la unión de Reelina a sus receptores VLDLR y ApoER2, pueden interaccionar con el dominio SH2 de proteínas como las quinasas de la familia Src Fyn, Src o Yes (Arnaud et al., 2003; Howell et al., 1997). Las acciones mediadas por la región N-terminal de Dab1 (unión a receptores de Reelina y fosforilación de Dab1 en tirosinas) son necesarias e imprescindibles para la función de Reelina (Tissir y Goffinet, 2003), y sin embargo, la región C-terminal, de función aún desconocida, parece ser necesaria *in vivo* para la eficiente señalización inducida por Reelina al menos en algunas neuronas (Herrick y Cooper, 2002). La región C-terminal de Dab1 contiene secuencias consenso implicadas en la acción de distintas proteínas intracelulares: puntos serina/treonina fosforilables por las quinasas Cdk5/P35 (Tissir y Goffinet, 2003), así como una región rica en prolinas que une el dominio SH3 de distintas proteínas, como por ejemplo el adaptador Grb2 (Xu et al., 1998).

La unión de Reelina a VLDLR y ApoER2 produce la agregación de los receptores y la fosforilación de Dab1 por parte de quinasas de la familia Src; evidencias experimentales indican que Fyn es la quinasa mayoritaria a la hora de fosforilar Dab1 *in vivo*, seguida de Src y, en menor medida, Yes, y se observa redundancia funcional parcial entre Fyn y Src (Arnaud et al., 2003; Bock y Herz, 2003; Tissir y Goffinet, 2003). Se propone un modelo en el que la unión de Reelina a la superficie celular produce el ensamblaje de un complejo proteico que, a su vez, acerca Fyn a Dab1; Dab1, mediante su dominio SH3, podría activar a Fyn, para luego ser a cambio fosforilado por Fyn activo (Arnaud et al., 2003; Bock y Herz, 2003). Además de la fosforilación de Dab1 en tirosinas, la unión de Reelina a sus receptores induce la disminución del nivel de proteína Dab1 (Tissir y Goffinet, 2003).

Una vez fosforilado, Dab1 interacciona con distintas proteínas intracelulares, entre ellas Lis1, cuya función es particularmente relevante en el desarrollo cortical: mutaciones en el gen *Lis1* causa en humanos lisencefalia (D'Arcangelo, 2006). Lis1, también conocido por Pafah1b1, forma parte del complejo Pafah1b, y puede también interaccionar con el complejo motor citoplasmático Dineína/Dinactina, implicado en procesos celulares que impliquen movimiento a lo largo de microtúbulos, como el transporte de vesículas, el posicionamiento de orgánulos en el interior de la célula o en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (Oiwa y Sakakibara, 2005). Recientemente, se ha relacionado a Lis1 junto con el complejo Dineína/Dinactina con el proceso de nucleoquinesis en neuronas (D'Arcangelo, 2006). Por lo tanto, Lis1 proporciona a la vía de señalización de Reelina un vínculo con el citoesqueleto celular y con el proceso de migración neuronal (D'Arcangelo, 2006). También es posible que Lis1 intervenga en la señalización de Reelina a través del complejo Pafah1b1: se ha demostrado que dicho complejo une el receptor de Reelina VLDLR (pero no ApoER2), por lo que Lis1 quedaría cerca del lugar donde se inicia la vía de Reelina para así interaccionar con Dab1 fosforilado (D'Arcangelo, 2006).

Reelina desempeña distintas funciones en el cerebro. Durante el desarrollo, Reelina está implicada en la migración celular, y su deficiencia *in vivo* causa severas alteraciones histológicas en la mayoría de regiones donde se expresa. También se detecta Reelina en el periodo postnatal y adulto, y datos *in vitro* indican que Reelina estimula el crecimiento y maduración de dendritas. Además, Reelina participa en sinaptogénesis y función sináptica: el animal reeler heterocigoto presenta una menor densidad de espinas dendríticas, e *in vitro* Reelina estimula la potenciación a largo plazo (LTP), además de influenciar la transmisión sináptica a través de la interacción de su receptor ApoER2 con receptores NMDA (D'Arcangelo, 2006).

Se ha relacionado a Reelina y proteínas que median su señal con varias enfermedades humanas. La mutación del gen *Reelina* es causa de lisencefalia, un tipo de malformación cerebral caracterizada por la ausencia o severa reducción de las circunvoluciones cerebrales y cerebelares, lo que da al cerebro un aspecto liso; estos individuos también muestran disfunciones fuera del cerebro, como conectividad neuromuscular anormal y limfoedema (Hong et al., 2000b). Mutaciones en el gen *Lis1* dan lugar a una

enfermedad autosómica dominante también caracterizada por lisencefalia, aunque en este caso el cerebelo no resulta afectado (D'Arcangelo, 2006). Por último, la mutación del gen *Lis1* combinada con mutaciones en homocigosis o heterocigosis en otros genes como *Reelina*, *VLDLR*, *ApoER2* o *Dab1*, producen hidrocefalia progresiva causada por anomalías en la capa de células endoteliales que en última instancia obstruyen el acueducto de Silvio (D'Arcangelo, 2006).

#### 4.3.1. Mecanismo de acción de Reelina durante el desarrollo cerebral

Durante el desarrollo, *Reelina* se expresa principalmente en células de Cajal-Retzius situadas en la zona marginal de la neocorteza e hipocampo, y en las células granulares postmitóticas de la EGL del cerebelo (D'Arcangelo y Curran, 1998). El ratón reeler presenta alteraciones en la organización laminar de estas tres regiones del cerebro: en la neocorteza, las células corticales no escinden la preplaca, y se acumulan por debajo de las células de la subplaca sin poder formar capas; en el hipocampo; las células piramidales del hipocampo propio y granulares del giro dentado se distribuyen laxamente, sin formar capas compactas con límites definidos; y en el cerebelo, las células de Purkinje tienden a acumularse en regiones subcorticales, mientras que el número de células de Purkinje y de células granulares se encuentra disminuido (D'Arcangelo y Curran, 1998).

A pesar de los numerosos estudios dedicados a *Reelina* y su función durante el desarrollo cerebral, aún no se ha podido elucidar con claridad su mecanismo de acción. En la neocorteza, se ha sugerido que *Reelina* regula el desarrollo de la placa cortical funcionando como una señal de detención para las células que migran radialmente, ya que se expresa principalmente en la capa más superficial y porque *in vitro*, *Reelina* detiene la migración neuronal e induce que las neuronas se despeguen de la glía radial (D'Arcangelo, 2006). Sin embargo, existen varias evidencias que contradicen esta hipótesis:

- 1) en el ratón reeler, las células no llegan hasta la zona marginal, sino que se acumulan a niveles profundos de la neocorteza;
- 2) en el ratón salvaje, existe expresión de *Reelina* en capas profundas de la neocorteza (futuras capas V-VI) en etapas tardías del desarrollo embrionario y durante el desarrollo postnatal, cuando todavía hay células destinadas a capas superiores (II-III) en activa migración;
- 3) la expresión ectópica de *Reelina* bajo el promotor de *Nestin* en la zona ventricular del ratón reeler restituye parcialmente el fenotipo normal a nivel histológico y funcional, sin detener la migración de células corticales en la zona ventricular (Magdaleno et al., 2002).

Estudios recientes indican que *Reelina* podría ser un factor permisivo para la migración de células corticales hacia la superficie de la corteza, ya que *Dab1* es requerido por neuronas en migración para poder extender su proceso líder a través de la placa cortical (D'Arcangelo, 2006). En base a todos los datos obtenidos hasta el momento, D'Arcangelo propone la existencia de un gradiente extracelular de *Reelina* en la neocorteza durante el desarrollo, que podría afectar de forma diferencial a las células en migración según su concentración: a bajos niveles, *Reelina* favorecería la extensión del proceso líder y por consiguiente la migración neuronal en dirección a la superficie pial; a niveles altos, presentes únicamente en la zona marginal, *Reelina* podría producir la desadhesión de la fibra de glía radial, induciendo así la detención de las células en migración (D'Arcangelo, 2006).

## II. FACTORES GUÍA Y SU FUNCIÓN EN REGENERACIÓN AXONAL ADULTA

### 1. INTRODUCCIÓN

La capacidad del sistema nervioso central (SNC) adulto para regenerar sus axones lesionados es prácticamente nula. Sin embargo, los axones del SNC neonatal y sistema nervioso periférico (SNP) sí muestran cierta capacidad regenerativa. Esta diferencia en la respuesta axonal tras lesión se atribuye a las distintas características de la reacción del tejido lesionado, que incluyen las siguientes:

- una lesión en el SNC adulto genera una cicatriz glial extremadamente inhibitoria para el crecimiento axonal, mientras que en el SNC neonatal se forma una cicatriz glial menos densa y transitoria, que permite ser atravesada por los axones regenerantes (Pasterkamp et al., 1999; Silver y Miller, 2004).
- la lesión de axones del SNC adulto produce la liberación de restos de mielina, que también tiene un efecto inhibitor del crecimiento axonal; sin embargo, en el SNP se produce una rápida eliminación de la mielina liberada en la zona lesionada (He y Koprivica, 2004).
- las propiedades de la mielina cambian: por ejemplo, el componente mielínico Nogo y su receptor P75<sup>NTR</sup> se expresan en el SNC pero no en el SNP (GrandPre et al., 2000); además, otro componente mielínico, MAG, promueve el crecimiento neurítico en neuronas jóvenes del SNC, pero induce colapso y repulsión en neuronas adultas (Cai et al., 2001; Filbin, 1996)

#### 1.1. La cicatriz glial

La cicatriz glial es una estructura tisular específica que aparece en respuesta a una lesión del tejido nervioso, y que en el sistema nervioso central constituye una barrera que frena el recrecimiento axonal. La cicatriz glial tiene un componente celular formado por astrocitos reactivos y, en el caso de que las meninges hayan sido afectadas, también por fibroblastos; además, la matriz extracelular de la cicatriz glial contiene elementos inhibidores del crecimiento axonal, como proteoglicanos condroitín sulfato (CSPG), o semaforinas secretables, y se ha demostrado que la degradación de matriz extracelular en lesiones del SNC promueve el crecimiento neurítico a través de la lesión (He y Koprivica, 2004; Sandvig et al., 2004; Silver y Miller, 2004). En conjunto, la particular composición de la cicatriz glial la convierte en un muro que impide el paso de los axones lesionados.

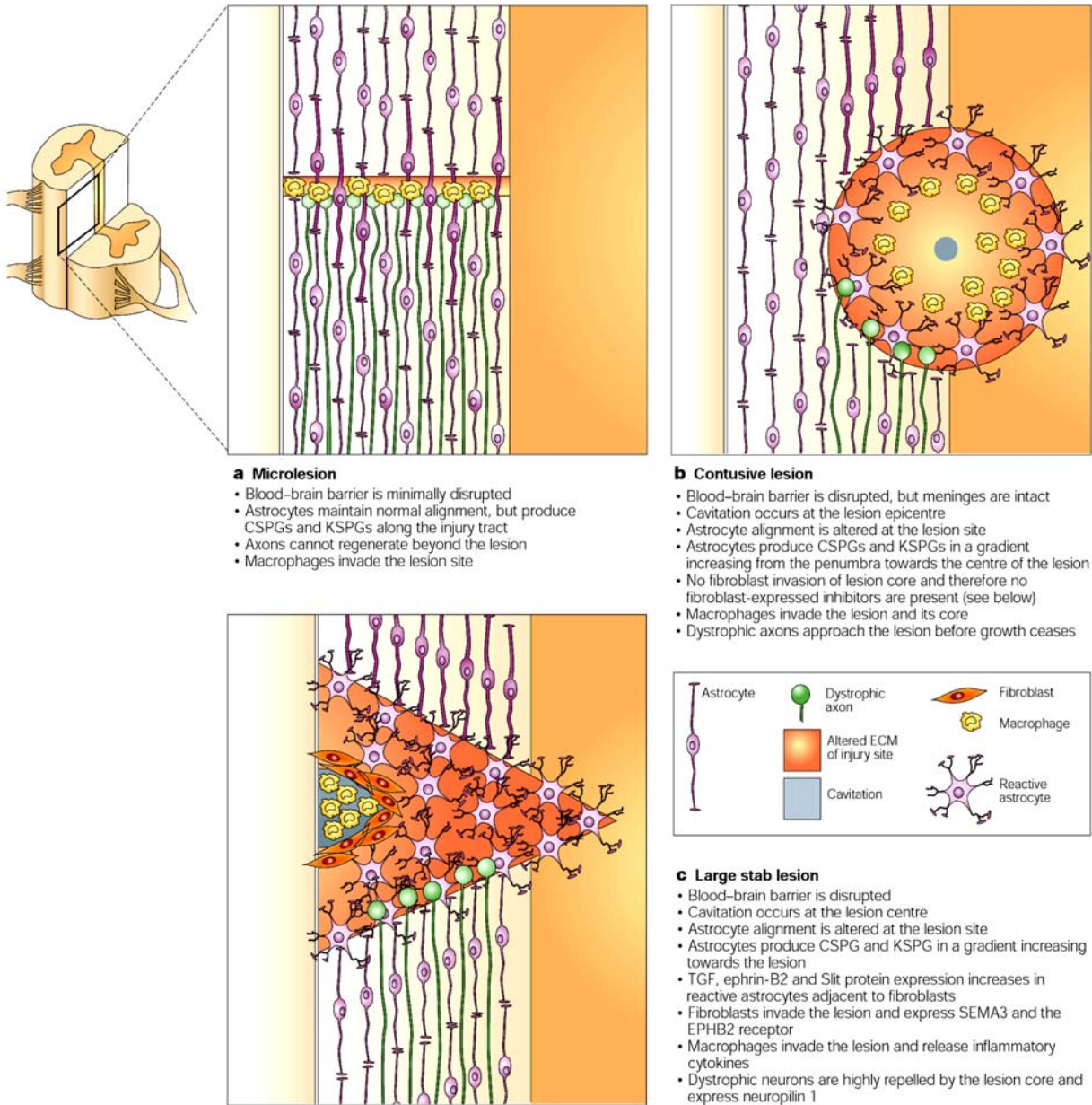
Sin embargo, además de ser un obstáculo en el camino de los nervios regenerantes, la cicatriz glial tiene una función beneficiosa para el tejido nervioso lesionado: los astrocitos reactivos sirven para reparar la barrera hematoencefálica, y así impiden la propagación de la respuesta inflamatoria generada tras la lesión, por lo que la degeneración tisular queda restringida (Silver y Miller, 2004).

**Formación de la cicatriz glial.** La formación de la cicatriz glial empieza con la alteración de la barrera hematoencefálica, que introduce en el SNC moléculas alienas. La figura 17 muestra los efectos de distintos tipos de lesiones en la medula espinal. Durante la fase aguda de la reacción tisular tras lesión (1-3 días), tienen lugar en la zona dañada procesos de muerte celular, degeneración de nervios, gliosis reactiva e infiltración de células inmunológicas y fibroblastos meníngeos. Durante la fase subaguda (3-14 días), los astrocitos proliferan y se hipertrofian para formar una red de procesos membranosos que encapsula la zona dañada, con el objetivo de impedir la entrada de fibroblastos meníngeos y de astroglía proveniente del tejido nervioso. Astrocitos y fibroblastos secretan en su interfase moléculas de matriz extracelular formando una lámina basal, que junto con las uniones intercelulares entre fibroblastos y procesos astrocíticos en forma de pie, sirven para restaurar la barrera hematoencefálica dañada y constituir de nuevo la *glia limitans* o capa más externa del tejido nervioso (formada por astrocitos y situada por debajo de la capa meníngea *pia mater*). La interacción entre EphA2 y EphB2, expresados en astrocitos y fibroblastos respectivamente, inician una cascada de señalización bidireccional que termina en la segregación entre ambos tipos celulares, y por lo tanto en la formación de la *glia limitans* y la reparación de la barrera hematoencefálica (Bundesen et al., 2003; Silver y Miller, 2004).

La barrera hematoencefálica se mantiene permeable al paso de sangre hasta 14 días tras una lesión encefálica o medular, y parece ser que componentes sanguíneos y macrófagos activados, junto con neuronas y células astrogliales, producen factores que podrían desencadenar la formación de la cicatriz glial. Entre dichos factores se encuentran TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , FGF2, CTGF e Interleuquina1; todos

ellos han sido implicados en distintos fenómenos relacionados con la cicatriz glial, como la proliferación de astrocitos, la inducción de astroglia reactiva y de la producción astrocítica de proteoglicanos, o la deposición de matriz extracelular inhibitoria (Sandvig et al., 2004; Silver y Miller, 2004).

**1.2. Astroglia reactiva**



**Figura 17. Representación esquemática de la reacción del tejido nervioso tras tres lesiones distintas en la medula espinal.**

En todos los ejemplos, macrófagos invaden la zona de lesión, y tanto proteoglicanos condroitín-sulfato (CSPGs) como queratan-sulfato (KSPGs) aumentan su nivel de expresión. **a)** Microlesión en la que la alineación astrocítica no se encuentra alterada por el proceso de lesión, y sin embargo los axones son incapaces de regenerar a través de la zona de lesión. **b)** Lesión contusiva que no altera las meninges, pero que produce cavitación y deposición de proteoglicanos; los axones son de nuevo incapaces de regenerar más allá de la lesión, aunque se observa algún axón en zonas distales a la lesión. **c)** Lesión penetrante que rompe las meninges y da lugar a la invasión de macrófagos y fibroblastos meníngeos; los axones son intensamente repelidos por CSPGs y KSPGs, y otras moléculas inhibitorias son sintetizadas, especialmente en el núcleo de la zona lesionada. ECM, extracellular matrix; TGF, transforming growth factor. (Silver y Miller, 2004)

La respuesta astrogliar a una lesión consiste mayoritariamente en la generación de astrocitos reactivos, hipertrofiados mediante la síntesis de filamentos intermedios, como GFAP o Vimentina; se produce también cierta proliferación astrocítica, aunque es minoritaria y limitada a los alrededores del

núcleo de la lesión (Silver y Miller, 2004). La astrogliá reactiva produce determinadas moléculas, como proteoglucanos condroitín-sulfato o efrinas, que incorpora a su membrana plasmática o bien secreta a la matriz extracelular; dichas moléculas tienen un efecto negativo en el crecimiento de axones y forman parte del ambiente inhibitorio de la zona lesionada.

### 1.2.1. Inhibidores derivados de astrogliá

**Proteoglucanos.** Astrocitos reactivos, fibroblastos meníngeos y oligodendrocitos sintetizan proteoglucanos, glucoproteínas altamente glucosiladas que forman parte de la matriz extracelular (Shearer et al., 2003; Silver y Miller, 2004). Consisten en un núcleo proteico al que se encuentran unidas covalentemente varias cadenas de glucosaminoglucanos (GAG), que en condiciones fisiológicas están cargadas negativamente debido a que contienen grupos sulfato o ácido úrico. Los astrocitos producen varios tipos de proteoglucanos, y entre ellos se encuentra la familia de proteoglucanos CSPG, que incluye a Neurocan, Brevican, Fosfacan, Tenascina C o NG2. Algunos miembros de la familia son secretables (Neurocan, Fosfacan), otros están anclados a la membrana mediante una molécula GPI (Brevican), o son moléculas transmembrana (NG2), otros forman parte de la matriz extracelular (Tenascina C) (Sandvig et al., 2004; Silver y Miller, 2004).

En cultivo, los CSPG resultan extremadamente inhibitorios para axones embrionarios y adultos, y actúan como potentes inhibidores de diversos promotores del crecimiento, como L1 o Fibronectina. En mamíferos adultos, y tras diversos tipos de lesiones del SNC, los CSPG son producidos y secretados por astrogliá reactiva e inhiben el crecimiento axonal y repelen al cono de crecimiento, desviando al axón hacia otra dirección (Sandvig et al., 2004); por lo tanto, CSPG tienen actividad quimiotáctica negativa. Gran parte del efecto repulsivo proviene de las cadenas GAG, ya que la inhibición de los CSPG disminuye tras la aplicación de condroitinasa ABC, un enzima sintetizado por la bacteria *Proteus vulgaris* que elimina las cadenas GAG; sin embargo, existen datos que sugieren que el núcleo proteico de los CSPG también puede provocar inhibición independientemente de las cadenas GAG (Sandvig et al., 2004; Shearer et al., 2003).

No se ha encontrado ningún receptor específico para CSPG; se cree que algunos de ellos sí lo tienen, como Versican o NG2, aunque se ha demostrado que en la señalización de Versican-V2 no interviene el complejo receptor de inhibidores mielínicos NgR/P75<sup>NTR</sup> (Schweigreiter et al., 2004). Neurocan interacciona con los sustratos de L1 y NCAM posiblemente mediante la unión directa con L1 y NCAM a través de sus cadenas condroitín sulfato (CS), y así inhibe el crecimiento neurítico. Fosfacan se une a la superficie del cono de crecimiento e interacciona con los sustratos de L1 y NgCAM, inhibiendo el crecimiento neurítico a través de su núcleo proteico y no de sus cadenas CS (Sandvig et al., 2004).

Poco se sabe de la señal intracelular desencadenada por proteoglucanos, aunque la familia de GTPasas Rho parece estar implicada: in vitro, la aplicación de inhibidores específicos de Rho o de Rock bloquean la inhibición de CSPG sobre axones retinales (Monnier et al., 2003), y la activación constitutiva de Rac1 y Cdc42, así como la inhibición de Rho mediante la toxina botulínica C3, aumenta in vitro la tasa de extensión axonal de neuronas DRG en un sustrato de CSPG (Jain et al., 2004). También la actividad de PKC es necesaria en la inhibición del crecimiento neurítico de neuronas cerebelares en presencia de CSPG; posiblemente CSPG activan PKC mediante el aumento del nivel de Ca<sup>2+</sup> intracelular o del nivel de DAG (Sivasankaran et al., 2004).

**Efrinas.** En la edad adulta, Efrinas y Eph se expresan en astrogliá y neuronas, y la función mayoritaria de las efrinas astrocíticas es la de inducir colapso o repulsión axonal; si se tiene en cuenta que, tras lesión, su expresión aumenta en astrocitos reactivos y fibroblastos meníngeos de la cicatriz glial, se puede considerar que efrinas y sus receptores Eph actúan como un elemento inhibitorio más en la zona lesionada que bloquea el crecimiento de los axones dañados (Sandvig et al., 2004). Además de su posible acción inhibitoria sobre axones regenerantes, efrinas y receptores Eph, expresados por astrocitos y fibroblastos meníngeos respectivamente, están implicados en la reconstitución de la *glia limitans* y de la barrera hematoencefálica, dañadas tras lesión (ver más arriba) (Bundesen et al., 2003; Sandvig et al., 2004). La lesión del nervio óptico en ratas adultas altera la expresión de EphA5 en la retina y de EfrinaA2 en el colículo superior, destino de los axones retinales (Rodger et al., 2001), hecho que puede influir en la distribución topográfica de los axones retinales regenerantes una vez alcancen su diana.



**Slits.** Un estudio reciente describe la expresión de todos los miembros de la familia Slit en la zona de lesión tras daño en el SNC. De todos ellos, Slit2 muestra la expresión más intensa, localizada en astrocitos reactivos positivos para GFAP que rodean al tejido necrótico, lo que sugiere que slits podrían formar parte del ambiente inhibitorio creado en la zona lesionada, que impide la regeneración de axones dañados (Hagino et al., 2003).

### **1.3. Glía NG2-positiva**

Existe en el SNC adulto un tipo de glía, con una morfología estrellada y que expresa NG2, pero distinta a los precursores de oligodendrocitos (que también expresan NG2) (Nishiyama et al., 2005); este tipo de glía responde rápidamente a un abanico de alteraciones del SNC: trauma, isquemia, excitotoxicidad, infección viral y desmielinización (Sandvig et al., 2004). Tras lesión, se produce en la glía-NG2 un aumento en la expresión de NG2 y en el número de sus procesos, que se mezclan con la astroglia reactiva y que contribuyen a la cicatriz glial; de hecho, se ha observado que células gliales NG2-positivas forman una interfase entre la astroglia y el tejido sanguíneo en el núcleo de la lesión, por lo que podrían intervenir en la estabilización de la cicatriz glial. NG2 también es inducido en macrófagos, células endoteliales y fibroblastos que invaden la zona de lesión (Sandvig et al., 2004).

**NG2.** Es un CSPG transmembrana presente en la glía-NG2 y precursores de oligodendrocitos, así como en macrófagos y en fibroblastos en el lugar de lesión. Su región extracelular contiene una secuencia diana de proteólisis cerca del dominio transmembrana, lo que permite liberar la región extracelular de la membrana celular; su región intracelular contiene en su extremo C-terminal un dominio de unión a PDZ, a través del cual une MUPP1, una proteína citoplasmática con múltiples dominios PDZ que actúa de andamio para el citoesqueleto celular. NG2 interacciona con varias moléculas extracelulares, actuando de receptor al unir directamente Colágeno, o bien potenciando la unión de algunos factores de crecimiento, como FGF2, a su receptor específico (Sandvig et al., 2004; Tan et al., 2005). El núcleo proteico de NG2 une específicamente una proteína de superficie celular, (aunque hasta la fecha, este potencial receptor de NG2 aún no ha sido identificado (Dou y Levine, 1997)) ya que la inhibición inducida por NG2 es revertida aumentando los niveles de cAMP y Ca<sup>2+</sup> intracelulares, o bien mediante la toxina pertussis (lo que sugiere la participación de proteínas G en la cascada de señalización intracelular mediada por NG2) (Dou y Levine, 1997). NG2 es un inhibidor del crecimiento neuronal, y su actividad inhibitoria probablemente no reside en sus cadenas GAG, sino en su núcleo proteico (Ughrin et al., 2003). NG2 puede ejercer su acción inhibitoria del crecimiento neurítico de distintas maneras: interrumpiendo la unión de moléculas de adhesión celular presentes en el cono de crecimiento, con sus sustratos en la matriz extracelular; interaccionando con un receptor acoplado a proteínas G; o bien uniéndose a moléculas extracelulares inhibitorias, como Colágeno y Tenascina, aumentando así la actividad inhibitoria del medio extracelular (Sandvig et al., 2004; Tan et al., 2005).

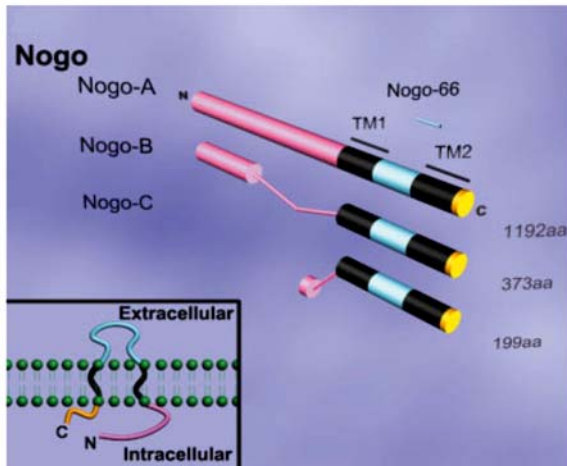
### **1.4. Oligodendroglía y mielina**

La hipótesis de una posible acción inhibitoria de la mielina sobre neuronas adultas lesionadas fue inicialmente planteada tras observar que en el SNC, fibras sin mielinizar regeneraban tras axotomía química (que permite mantener la integridad de las fibras mielinizadas colindantes) mientras que la axotomía mecánica, que dañaba en mayor o menor medida axones mielinizados, no permitía la regeneración. Posteriores estudios añadieron datos que reforzaban la premisa de que la mielina inhibe la regeneración axonal en el adulto: durante el desarrollo, el inicio de la mielinización coincide con el final del periodo permisivo para la regeneración axonal, y la mielina proveniente del SNC, a diferencia del SNP, posee una potente acción inhibitoria del crecimiento neurítico (He y Koprivica, 2004).

Actualmente se sabe que la mielina, sintetizada por oligodendrocitos en el SNC y por células de Schwann en el SNP, contiene distintas moléculas inhibitorias del crecimiento axonal. Además, la oligodendroglía produce tras lesión otros elementos inhibitorios, como proteoglicanos condroitín-sulfato, Tenascina R, o semaforinas transmembrana, que contribuyen al efecto negativo del entorno sobre los axones dañados (Sandvig et al., 2004).

### 1.4.1. Inhibidores asociados a mielina

**Nogo.** NogoA, B, C forman parte de la familia Reticulón y son inhibidoras del crecimiento axonal; las tres formas son en realidad tres variantes transcripcionales del mismo gen, y comparten una región C-terminal de 188 AA y otra N-terminal de 172 AA. Las tres formas tienen dos dominios hidrofóbicos transmembrana en su región C-terminal, flanqueando un dominio de 66 AA llamado



**Figura 18. Estructura del inhibidor asociado a mielina Nogo.**

Las tres formas de Nogo (A, B, C) tienen en común la región C-terminal, compuesta por dos dominios hidrofóbicos (TM, transmembrana) que flanquean el dominio Nogo66. La región N-terminal difiere en las tres formas debido a splicing diferencial. En Nogo A, el extremo N-terminal se le conoce como NiG, y, junto con el dominio Nogo66, tiene actividad inhibitoria. El recuadro muestra la disposición de Nogo en la membrana, con Nogo66 en la región extracelular/lumen endosomal, y NiG en el citosol (adaptado de Sandvig et al., 2004).

Nogo66 que, junto con el extremo amino-terminal de NogoA (NiG), posee actividad inhibitoria (figura 18) (Chen et al., 2000b; GrandPre et al., 2000). En el adulto, *NogoA* (pero no *NogoB* o *NogoC*) se expresa en oligodendrocitos (pero no en células de Schwann), donde en su mayor parte se encuentra asociado a membranas reticulares y orientado hacia el lumen endosomal gracias a la señal C-terminal de retención en retículo endoplasmático; debido a ello se detectan pocas cantidades en la membrana plasmática de oligodendrocitos en cultivo (GrandPre et al., 2000). Aún así, algunas moléculas de NogoA alcanzan la membrana plasmática, y se han detectado en la cubierta de membrana más interna de mielina, en contacto con el axón, donde colocaliza con otras proteínas mielínicas, como por ejemplo MAG y OMgp (He y Koprivica, 2004; Sandvig et al., 2004). NogoA también se expresa, tanto durante el desarrollo como en la edad adulta, en varios tipos de neuronas del SNC y periférico, aunque no se detecta su expresión en células de Schwann (He y Koprivica, 2004; Mingorance et al., 2004).

Diversos estudios demuestran su acción inhibitoria in vivo: la aplicación del anticuerpo IN-1 (contra NiG), que une NogoA y bloquea su efecto

inhibidor del crecimiento neurítico, estimula la regeneración axonal e incluso la recuperación locomotriz; y la expresión inducida de *NogoA* en el SNP in vivo disminuye el recrecimiento axonal tras un tipo de lesión del nervio ciático que en condiciones normales permite la regeneración (He y Koprivica, 2004). Tras una lesión en el SNC, la consiguiente lisis celular tendría como consecuencia la liberación de NogoA al medio externo, quedando los axones dañados expuestos a su acción inhibitoria, lo que explicaría que neuronas transplantadas en el SNC sin causar trauma pueden regenerarse; en una situación normal, la mayor parte de NogoA queda recluido en el interior celular (Sandvig et al., 2004). Los animales deficientes en *Nogo* no cumplieron las expectativas: usando como modelo el tracto corticoespinal descendente, únicamente una de las 4 líneas mutantes, la que suprime *NogoA/B*, dio una mejora significativa en la regeneración de la conexión estudiada, lo que subraya el hecho de que, en la mielina, otros elementos aparte de Nogo actúan como inhibidores del crecimiento axonal (Zheng et al., 2003).

**MAG.** MAG es una proteína transmembrana con gran afinidad por los gangliósidos GD1a y GT1b. Es una sialoadhesina de la familia SIGLEC, y une los residuos de ácido siálico presentes en gangliósidos y proteínas (McKerracher, 2002). Contiene una región extracelular con un dominio Ig en el extremo N-terminal tipo V, seguido de cuatro dominios Ig, y una región intracelular corta (figura 19) (Filbin, 1995). A diferencia de Nogo y OMgp, en la edad adulta MAG se encuentra exclusivamente en las cubiertas de mielina de oligodendrocitos y células de Schwann, aunque al igual que *Nogo*, *MAG* se expresa intensamente en neuronas durante el desarrollo (Vourc'h y Andres, 2004).

MAG es una proteína bifuncional, que promueve el crecimiento neurítico en neuronas jóvenes, y sin embargo induce colapso y repulsión en neuronas adultas (Cai et al., 2001; Filbin, 1996; Sandvig et al., 2004). Tras lesión en el adulto, las vainas de mielina dañadas probablemente liberan una forma soluble de MAG, llamada dMag, que bloquea la regeneración axonal (Sandvig et al., 2004). A diferencia

de *NogoA*, tanto *MAG* como *OMgp* se expresan en la membrana de oligodendrocitos, por lo que están más expuestos a la interacción con neuronas (Domeniconi et al., 2002). Al igual que ocurre con las proteínas Nogo, el ratón deficiente en *MAG* no presenta mejorías en la regeneración de la medula espinal, aunque en el SNP la regeneración sí que aumenta de forma significativa (He y Koprivica, 2004).

**OMgp.** OMgp es una proteína anclada a la membrana plasmática de oligodendrocitos y neuronas mediante una molécula GPI. Contiene un dominio rico en leucina, seguido de un dominio C-terminal con repeticiones serina/treonina. Su expresión mayoritaria en el SNC se localiza en neuronas, aunque también se expresa en oligodendrocitos a un nivel más bajo, y aumenta durante las tres primeras semanas postnatales en roedores, coincidiendo con el inicio de la mielinización (Vourc'h y Andres, 2004). En oligodendrocitos, OMgp se localiza en la membrana y en capas de mielina adyacentes a axones. Se ha demostrado su actividad inhibitoria del crecimiento neurítico in vitro, aunque in vivo no ha sido determinado (He y Koprivica, 2004; Wang et al., 2002).

#### 1.4.2. Receptores para inhibidores asociados a mielina

**NgR.** Nogo66, *MAG* y *OMgp* unen un receptor común: el receptor Nogo (NgR), una proteína asociada a membrana mediante una molécula GPI, que es requerida por los tres elementos mielínicos en su actividad de inhibición del crecimiento neurítico (figura 20) (Domeniconi et al., 2002; Fournier et al., 2001; Li et al., 2004; Wang et al., 2002). La hidrólisis de NgR a nivel de la molécula GPI bloquea la inhibición ejercida por Nogo66 en neuronas, y la expresión forzada de NgR en neuronas les confiere sensibilidad a Nogo66. NgR está formado por una secuencia señal en su extremo N-terminal, un dominio de ocho repeticiones ricas en leucina, flanqueado en el extremo C-terminal por un dominio "capping" rico en cisteínas, y en el extremo N-terminal por un pequeño dominio rico en leucinas (Barton et al., 2003). Existen tres isoformas de NgR con elevada homología entre ellas: NgR1, NgR2 y NgR3. La región N-terminal de NgR, que incluye las ocho repeticiones ricas en leucina más el dominio "capping" C-terminal, es suficiente para unir los tres ligandos, posiblemente a través de puntos distintos entre sí (He y Koprivica, 2004; Schwab et al., 2006). NgR2 es considerado un receptor específico de *MAG*, ya que NgR2 une *MAG* con mayor afinidad que NgR1, y la expresión inducida de *NgR2* en neuronas sensoriales es suficiente para producir inhibición en presencia de *MAG*; además, una forma de NgR2 soluble antagoniza el efecto inhibitorio del crecimiento neurítico generado por *MAG* (Venkatesh et al., 2005). NgR se localiza en la membrana plasmática axonal de numerosas neuronas del SNC, aunque no en todas, y también se expresa en astrocitos, pero no en oligodendrocitos ni en microglía. Al no tener una región intracelular, NgR no puede transducir la señal de inhibidores mielínicos; para ello es necesario que NgR forme un complejo receptor, interaccionando con otras proteínas transmembrana:  $P75^{NTR}$ , *Troy* y *Lingo1* (He y Koprivica, 2004).

**Receptores TNF:  $P75^{NTR}$  y *Troy*.** El receptor de neurotrofinas de baja afinidad,  $P75^{NTR}$ , es también miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR).  $P75^{NTR}$  es una proteína transmembrana con cuatro dominios ricos en cisteína extracelulares, y con una región intracelular que incluye un punto de palmitoilación (que le permite anclarse a balsas lipídicas), un dominio de muerte tipo II que a su vez contiene un dominio de interacción con Rho A, y un dominio PDZ (figura 20) (Yamashita et al., 2005).  $P75^{NTR}$  se expresa en neuronas y glía durante el desarrollo y la etapa postnatal, y en la edad adulta parece ser que solamente se expresa a un bajo nivel y en determinadas neuronas, como neuronas DRG y células ganglionares retinales; su expresión aumenta tras lesión cerebral y medular (He y Koprivica, 2004). Al igual que NgR,  $P75^{NTR}$  (y concretamente su región intracelular) es necesario para mediar la actividad inhibitoria de los tres elementos mielínicos, y los ratones mutantes deficientes en  $P75^{NTR}$  pierden la respuesta ante *MAG*. Tras unir NogoA, NgR interacciona, mediante su región extracelular entera, con los dominios ricos en cisteína 2-3 de  $P75^{NTR}$ , y es la región intracelular de  $P75^{NTR}$  la que activa la señal de Nogo en la célula (He y Koprivica, 2004; Yamashita et al., 2005).

*Troy* (otro miembro de la familia de TNFR igual que  $P75^{NTR}$ ) se expresa en neuronas de varias regiones del SNC adulto (cerebelo, corteza, retina, DRG), a diferencia de  $P75^{NTR}$ , cuyo patrón de expresión en el SNC adulto es mucho más restringido. Igual que  $P75^{NTR}$ , *Troy* interacciona in vitro con NgR y *Lingo1*, para formar un complejo receptor funcional que activa la señal intracelular de

inhibidores mielínicos (figura 20), y el bloqueo de Troy en neuronas DRG atenúa su respuesta inhibitoria ante Nogo66 (Park et al., 2005).

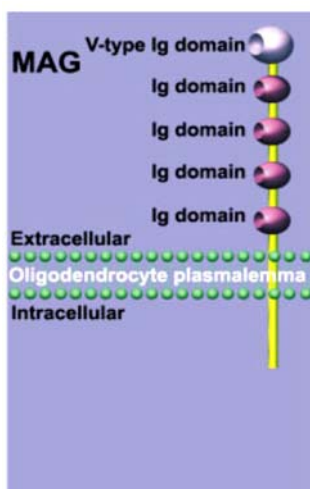


Figura 19. Estructura del inhibidor asociado a mielina MAG.

MAG contiene en su región extracelular un dominio Ig tipo V y cuatro dominios Ig más. MAG une residuos de ácido siálico presente en proteínas y gangliósidos (Sandvig et al., 2004)

por MAG (Fujitani et al., 2005; He y Koprivica, 2004; Vyas et al., 2002).

De los tres miembros que forman la familia NgR, NgR2 une solamente MAG con mayor afinidad que NgR1; la expresión forzada de *NgR2* en neuronas DRG neonatales, cuya expresión endógena de NgR es muy baja, inhibe el crecimiento neurítico ante MAG, mientras que en neuronas cerebelares, que expresan *NgR1*, la expresión de *NgR2* acentúa la respuesta ante MAG (Venkatesh et al., 2005).

Hay que tener en cuenta que el tratamiento con PLC, que elimina la unión GPI de moléculas asociadas a membrana, disminuye el efecto inhibitorio de Nogo66 en el crecimiento neurítico de células granulares, pero la respuesta ante MAG no resulta afectada; por lo tanto, las proteínas de la familia NgR no son las únicas que median en la acción de MAG (Niederost et al., 2002).

La región N-terminal inhibitoria de NogoA (NiG) no interacciona con el complejo receptor NgR/P75<sup>NTR</sup> y presenta un patrón de puntos de unión in vivo distinto del de Nogo66. Por lo tanto, y a diferencia del resto de componentes mielínicos, NiG produce inhibición a través de un receptor distinto del complejo NgR/P75<sup>NTR</sup> (Schweigreiter et al., 2004).

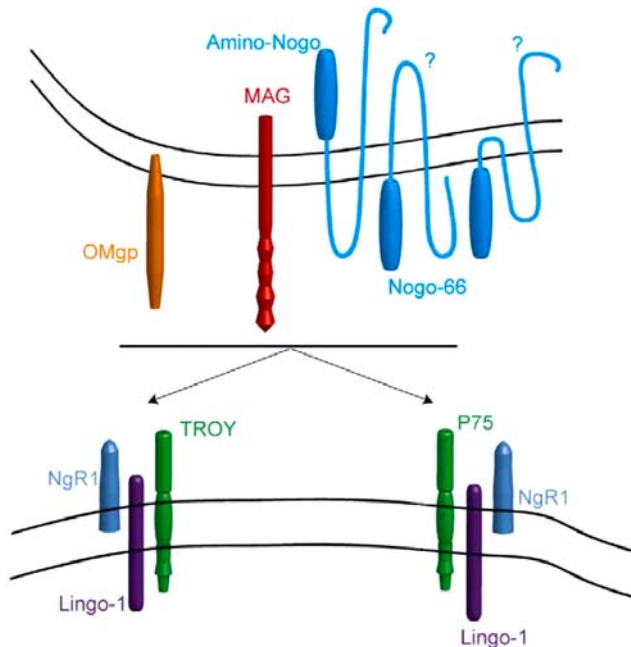
#### 1.4.3. Señalización intracelular asociada a inhibidores mielínicos

Varios estudios demuestran que la acción inhibitoria sobre neuronas que ejercen los componentes depende de la actividad de GTPasas de la familia Rho, conocidas por su papel clave en la regulación del citoesqueleto: lesiones en el SNC, así como MAG y Nogo66 inducen la activación de RhoA, de su efector Rock, y la inhibición de Rac1, a menudo a través del complejo NgR/P75<sup>NTR</sup> (Dubreuil et al., 2006; He y Koprivica, 2004; Madura et al., 2004; Niederost et al., 2002; Sandvig et al., 2004). Además de estimular la actividad quinasa de RockII, Nogo promueve la fosforilación de la cadena ligera de miosina (conocido efector de Rock), evento imprescindible para producir contracción y, por tanto, el aumento del flujo retrógrado de filamentos de actina característico de conos de crecimiento en proceso de colapso o inhibición (Alabed et al., 2006). La activación de RhoA es indirecta: la unión de inhibidores mielínicos al complejo NgR/P75<sup>NTR</sup> estimula la interacción entre P75<sup>NTR</sup> y Rho-GDI, una

**Lingo1.** Es el miembro fundador de una familia de proteínas parecidas a Slit y de expresión selectiva en cerebro. Lingo1 está formado por una región extracelular que contiene 12 motivos ricos en leucina flanqueados en cada extremo por dominios “capping”, más un dominio Ig; tiene además una región transmembrana y una región intracelular corta con un lugar de fosforilación en tirosina parecido al de EGFR (figura 20) (Yamashita et al., 2005). Se expresa únicamente en cerebro (concretamente en neuronas), y empieza en la edad embrionaria, alcanzando un nivel máximo a edades perinatales, y descendiendo progresivamente hasta llegar a un nivel de expresión baja en la edad adulta. 14 días después de lesionar la medula espinal, la expresión de *Lingo1* aumenta cinco veces en los tractos lesionados. Lingo1 interacciona directamente con NgR1 y con P75<sup>NTR</sup> o Troy formando un complejo ternario, y es responsable de parte de la señalización intracelular generada por inhibidores mielínicos, aunque continúa resultando imprescindible P75<sup>NTR</sup> (Mi et al., 2004; Park et al., 2005). Lingo1 también se expresa en oligodendrocitos, donde actúa inhibiendo la producción de mielina durante el proceso de diferenciación oligodendroglial (Mi et al., 2005).

**Otros Receptores.** Además de unir y transducir la señal mediante el complejo receptor formado por NgR, P75<sup>NTR</sup>/Troy y Lingo1, MAG puede unir el ácido siálico presente en los gangliósidos GD1a y GT1b de las membranas neuronales. GD1a y GT1b son necesarios para la actividad inhibitoria de MAG, y actúan como receptores funcionales de baja afinidad para MAG, provocando la translocación de P75<sup>NTR</sup> a balsas lipídicas y así estimulando el inicio de la cascada de señalización mediada

proteína inhibidora de RhoA, secuestrándola e impidiendo así que inactive RhoA; eso permitiría a su vez que proteínas GEF activaran RhoA (He y Koprivica, 2004; Yamashita et al., 2005). Por otra parte, moléculas de matriz extracelular, como Laminina y Colágeno, pueden antagonizar los efectos inhibitorios de MAG in vitro en líneas neuronales mediante la activación de Rac1 (Laforest et al., 2005).



**Figura 20. Complejos receptores de inhibidores asociados a mielina.**

OMgp, MAG y NogoA unen complejos receptores formados por NgR, Lingo1 y P75<sup>NTR</sup>/Troy. Nogo A une NgR a través de su extremo N-terminal o Amino-Nogo (que corresponde al dominio NiG) o bien a través de Nogo66. Los interrogantes en Nogo66 se refieren a las dos posibles disposiciones de Nogo66 en la membrana según las regiones hidrofóbicas que contiene su secuencia (adaptado de Schwab et al., 2006).

MAG, al igual que Netrin1 o BDNF, forma parte del grupo de factores con actividad quimiotáctica cuya señal intracelular depende del nivel de cAMP: la señal intracelular de MAG transcurre a través de proteínas G sensibles a la toxina pertussis y da lugar a la disminución del nivel de cAMP (Cai et al., 1999), mientras que la activación de la vía dependiente de cAMP convierte la respuesta repulsiva del cono de crecimiento desencadenada por MAG en atracción (Song et al., 1998). El aumento del nivel de cAMP puede producir la activación de ArginasaI y así estimular la síntesis de poliaminas, y se ha demostrado que la sobreexpresión de ArginasaI y la presencia de poliaminas exógenas pueden superar la inhibición generada por MAG y mielina; además, el nivel de ArginasaI disminuye con la edad, y esa caída coincide con el cambio de actividad de MAG de promoción del crecimiento neurítico a inhibición (He y Koprivica, 2004).

Se ha observado interferencias entre la señal intracelular de neurotrofinas y de MAG, que podrían ser debidas al hecho de que comparten el receptor P75<sup>NTR</sup> (He y Koprivica, 2004). Así, las neurotrofinas bloquean el efecto inhibitorio de MAG en la regeneración axonal, posiblemente porque activan PKA (quinasa dependiente de

cAMP), y ésta a su vez fosforila e inhibe RhoA (Cai et al., 1999).

Además de la regulación de las GTPasas Rho y Rac1, Nogo66 y MAG inician a través del complejo NgR/P75<sup>NTR</sup> una vía de señalización dependiente de proteínas G y PLC, que genera un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular y diverge, por un lado, en la activación de la quinasa PKC, y por otro lado, en la activación de los receptores IP3 presentes en el compartimento endosomal celular (Hasegawa et al., 2004). Hasegawa y colaboradores proponen que la acción de inhibidores mielínicos en la neurona se debe a un balance entre la activación de la vía dependiente de PKC y de la vía dependiente de IP3, de manera que la activación predominante de PKC inhibe el crecimiento neurítico, mientras que si predomina el estímulo mediado por IP3, se produce un aumento del crecimiento neurítico (Hasegawa et al., 2004). Tras una lesión medular, la infusión continuada in vivo de un inhibidor de la PKC estimula considerablemente la regeneración de algunos tractos seccionados (Sivasankaran et al., 2004).

#### 1.4.4. Otros inhibidores derivados de oligodendroglía

Además de mielina, los oligodendrocitos sintetizan otros componentes que también resultan inhibidores para el crecimiento neuronal. Por ejemplo, las variantes V2 y V3 de Versican, así como Brevican, son CSPG que se encuentran enriquecidos en oligodendroglía y en la mielina del CNS (Vourc'h y Andres, 2004).

Los oligodendrocitos también producen y secretan la glucoproteína Tenascina R, cuya expresión es estimulada en la zona lesionada. Al igual que MAG, Tenascina R es una molécula bifuncional, produciendo adhesión y desadhesión celular, y realiza su función en la neurona ligando F3/F11, un

receptor anclado a la membrana neuronal a través de GPI, mientras que interacciona con astrocitos y oligodendrocitos a través de sulfatidas asociadas a su membrana plasmática. Tenascina R inhibe la adhesión celular al interferir en la unión de integrinas de membrana plasmática a Fibronectina en la matriz extracelular (Sandvig et al., 2004).

Recientemente, se ha descrito la expresión de EfrinaB3 en oligodendroglía mielinizante postnatal; in vitro, EfrinaB3 tiene un potente efecto inhibitorio del crecimiento de neuronas, equivalente a la acción de los tres inhibidores miélinicos (Nogo, MAG y OMgp) combinados (Benson et al., 2005).

La acción repulsiva de Sema4D y Sema5A, dos semaforinas transmembrana expresadas en oligodendrocitos, ha sido relacionada con inhibición de la regeneración axonal; esta cuestión se aborda detalladamente más abajo.

## **2. FACTORES GUÍA EN REGENERACIÓN AXONAL**

La persistente expresión de diversos factores guía y de sus receptores en la edad adulta sugiere que dichas moléculas no solamente participan en el desarrollo del sistema nervioso, sino que probablemente también tengan algún papel en la función nerviosa durante el periodo adulto (de Wit y Verhaagen, 2003; Koeberle y Bahr, 2004). Uno de los aspectos característicos del sistema nervioso adulto es la regulación de su capacidad regenerativa. De hecho, en los últimos años, numerosas evidencias se han descrito involucrando a factores guía en la regulación del crecimiento axonal tras lesión. Ya ha sido mencionada la contribución de efrinas/eph y slits en la respuesta del tejido nervioso dañado (ver más arriba). En rata, *Netrin1* aumenta ostensiblemente su expresión en células de Schwann tras la lesión del nervio ciático y su posterior reparación (Madison et al., 2000), y en el mesénquima que rodea el epitelio nasal (origen de los axones olfativos) la expresión de *Netrin1* aumenta de forma transitoria tras bulbectomía unilateral (Astic et al., 2002); la expresión de *Dcc* y *Unc5h2* disminuye en células ganglionares retinales tras axotomía del nervio óptico (Ellezam et al., 2001), mientras que en planarias, homólogos de *Netrin1* y de su receptor son esenciales en el proceso de regeneración que, en los individuos de esta especie, tiene lugar a lo largo de toda su vida (Cebria y Newmark, 2005). Todos estos datos apuntan a que *Netrin1* y sus receptores *Dcc* y *Unc5h* pueden influir en el proceso de regeneración axonal tanto en el SNC como periférico. También *Reelina* parece tener alguna función en la regeneración del nervio olfativo, ya que la disminución del nivel de expresión de *Reelina* en células mitrales del bulbo olfativo tras lesión química del epitelio olfativo, y su posterior recuperación hasta alcanzar el nivel normal, previo a la lesión, coincide cronológicamente con el periodo de regeneración de los axones olfativos dañados (Okuyama-Yamamoto et al., 2005).

Sin embargo, son las semaforinas los factores guía que más atención han recibido en cuanto a su posible función en la regeneración axonal del sistema nervioso, y que se explica en detalle a continuación.

### **2.1. Semaforinas como inhibidores de la regeneración axonal**

En el SNC adulto, la acción in vivo de semaforinas secretables tras lesión parece depender de la rotura de las cubiertas meníngeas, que produce la migración de fibroblastos que expresan semaforinas clase 3 desde las meninges hasta la zona de lesión y su incorporación a la cicatriz glial (Pasterkamp et al., 1999). En el sistema olfativo adulto, la axotomía de neuronas olfativas da lugar a un aumento transitorio en la expresión de *Sema3A* en el lugar de lesión que no impide la regeneración de los axones, aunque éstos expresen *Np1*. Sin embargo, una lesión más agresiva (bulbectomía) genera la formación de una cicatriz glial que expresa *Sema3A* intensamente y que los axones *Np1*-positivos son incapaces de atravesar (Giger et al., 1998a), mientras que, tras la axotomía del nervio olfativo, la aplicación local de un inhibidor específico de *Sema3A* llamado SM-216289 en la zona lesionada estimula significativamente la regeneración de los axones olfativos lesionados (Kikuchi et al., 2003). Por otra parte, lesiones en la medula espinal producen un aumento en la expresión de todas las semaforinas secretables en fibroblastos meníngeos, que migran y se incorporan a la cicatriz glial de la zona lesionada. Tanto los tractos sensoriales ascendentes (originados en los DRG), como los tractos motores descendentes expresan distintos componentes de la vía de señalización de semaforinas clase 3 tras ser axotomizados, lo que posiblemente les hace sensibles a la acción inhibitoria de semaforinas y les impide atravesar la cicatriz glial (De Winter et al., 2002b; Lindholm et al., 2004; Pasterkamp et al., 2001). In vitro, células meníngeas que expresan *Sema3A* y *Sema3C* producen el colapso de axones DRG, que

puede ser revertido bloqueando el receptor Np1 o usando células meníngeas provenientes de ratones deficientes en *Sema3A* (Niclou et al., 2003). Por lo tanto, en lesiones en la edad adulta, la presencia de semaforinas clase 3 expresadas por fibroblastos meníngeos en la cicatriz glial probablemente contribuye al ambiente inhibitorio que distintos elementos de origen oligodendroglial y astrogial generan en la zona de lesión, y que impide el recrecimiento de los axones dañados (Sandvig et al., 2004).

Sin embargo, en el SNC joven o en el SNP, la ausencia de semaforinas secretables en el tejido nervioso lesionado está directamente relacionada con su mayor capacidad regenerativa en comparación con el SNC adulto; así, la axotomía del tracto lateral olfativo a edades postnatales, a diferencia de lo que ocurre en el adulto, no genera la formación de una cicatriz glial, ni la infiltración de fibroblastos que expresan *Sema3A* en la zona de lesión, y en esa situación los axones dañados regeneran (Pasterkamp et al., 1999). La lesión de nervios periféricos (en condiciones que permitan su posterior regeneración) produce una caída en el nivel de expresión de *Sema3A* en las motoneuronas afectadas que se recupera al restablecerse la inervación (Pasterkamp et al., 1998b), y además estimula la expresión de varias semaforinas secretables en la región perineural (Ara et al., 2004; Scarlato et al., 2003); teniendo en cuenta que las neuronas lesionadas continúan expresando neuropilinas (Pasterkamp et al., 1998b), la regulación a la baja de *Sema3A* en esas neuronas podría evitar la acumulación de un elemento inhibitorio en la zona de lesión, favoreciendo así el recrecimiento del axón, mientras que la acción repulsiva de las semaforinas alrededor del nervio regenerante impediría a éste desviarse de su trayectoria original previa a la lesión (Pasterkamp et al., 1998b; Scarlato et al., 2003).

Además de semaforinas clase 3, se ha observado que también otras semaforinas intervienen en procesos relacionados con lesión del tejido nervioso; a diferencia de las semaforinas secretables, generadas por el componente fibroblástico de la cicatriz glial, las semaforinas *Sema5A* y *Sema4D*, ambas transmembrana, son sintetizadas por oligodendroglía y posiblemente actúen como elementos inhibidores mielínicos. En el nervio óptico, *Sema5A* se expresa en oligodendrocitos antes y después de axotomía, produce el colapso y la inhibición del crecimiento de axones retinales, y el uso de anticuerpos bloqueantes de *Sema5A* mejora significativamente la regeneración de los axones retinales (Goldberg et al., 2004); *Sema4D* se expresa en oligodendrocitos en el momento en que éstos inician la producción de mielina, produce colapso y repulsión en axones, y su expresión aumenta en oligodendroglía tras lesión medular, principalmente en la zona lesionada (Moreau-Fauvarque et al., 2003).

### III. EL HIPOCAMPO

#### 1. LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL EN EL ADULTO

Según Amaral y Witter (1995), el término “formación hipocampal” incluye el hipocampo propiamente dicho (en adelante referido simplemente como “hipocampo”), el giro dentado, la corteza entorrinal y el complejo subicular.

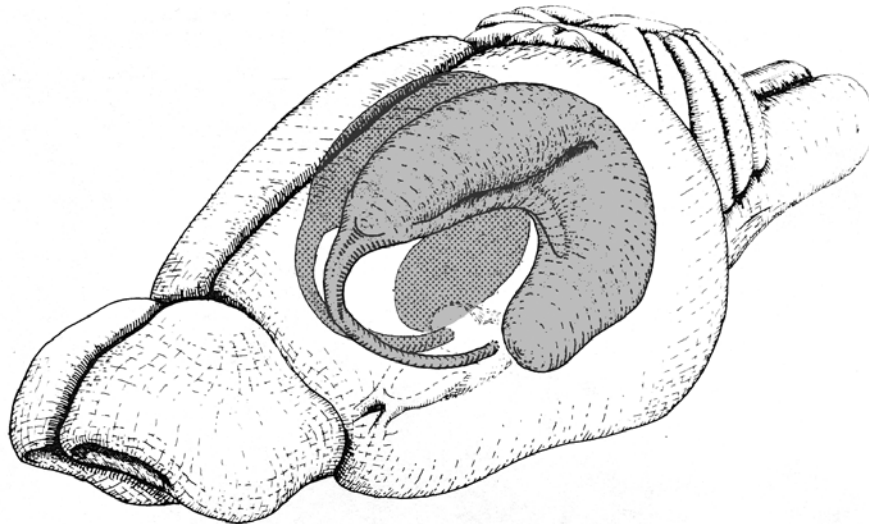


Figura 21. Estructura tridimensional del hipocampo de rata (adaptado de Amaral y Witter, 1995).

#### 1.1. El giro dentado

El giro dentado está formado por la *fascia dentata* o giro dentado propiamente dicho, y el hilus. Se le considera la primera etapa del circuito trisináptico intrahipocampal, ya que es éste el que recibe la mayoría de las conexiones de la corteza entorrinal, que envía información sensorial de distintos tipos (figura 22, 26) (Freund y Buzsaki, 1996).

##### 1.1.1. Histología del giro dentado

**Capa molecular.** Junto a la fisura hipocampal, contiene los árboles dendríticos de las células granulares, así como diversos tipos de interneuronas (Amaral y Witter, 1995).

**Capa granular o estrato granular.** Adyacente a la capa molecular, está formada por las células principales del giro dentado, las células granulares, que se agrupan en 4-8 filas densamente empaquetadas. Junto con la capa molecular forman una V o U (dependiendo de la posición septo-temporal), con el hilus en su interior. La parte de la U adyacente a la región CA1 del hipocampo se la conoce como suprapiramidal, y la parte opuesta se la denomina infrapiramidal. A lo largo de la superficie de la capa granular se encuentran otros tipos de células, la mayoría de ellos interneuronas inhibitorias (Amaral y Witter, 1995).

**Hilus o capa polimórfica.** Delimitada a un lado por la región CA3 del hipocampo, y englobada por la U que forma la capa granular, su principal componente celular son las células musgosas, aunque también presenta otros tipos celulares minoritarios. Contiene también las dendritas de las células musgosas y los colaterales axónicos de las fibras musgosas (los axones de las células granulares) (Amaral y Witter, 1995).



### 1.1.2. Tipos celulares en el giro dentado

**Células granulares.** Son las células principales del giro dentado, y se sitúan en la capa granular. Con un soma pequeño (8-12  $\mu\text{m}$  de diámetro), presentan dos árboles dendríticos, orientados radialmente y con elevada densidad de espinas, que se extienden hasta la fisura hipocampal y ocupan toda la extensión de la capa molecular. Los axones de las células granulares se llaman fibras musgosas, y surgen del polo del soma opuesto a las dendritas; conectan con las dendritas proximales de las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, formando botones sinápticos característicos por su gran tamaño y conocidos como terminales musgosos. Los terminales musgosos se concentran en el estrato lúcido de la región CA3 (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsaki, 1996).

**Células musgosas.** Situadas en el hilus, donde son el tipo celular mayoritario, presentan elevada densidad de dendritas espinosas, así como excrescencias espinosas en el soma y en el tramo proximal del árbol dendrítico. Las dendritas quedan recluidas en el hilus y, aunque ocasionalmente alcancen las capas granular y molecular, virtualmente nunca invaden la región CA3 del hipocampo. El axón sinapsa con el tercio interno de las dendritas de las células granulares, situadas en la capa molecular del giro dentado, siendo la inervación tanto ipsilateral como contralateral; las fibras contralaterales de las células musgosas forman la proyección comisural del giro dentado (Amaral y Witter, 1995). Existe un debate acerca de si se considera a las células musgosas como neuronas piramidales desplazadas y posteriormente modificadas, ya que comparten características electrofisiológicas y neuroquímicas con las células piramidales de la CA3c (zona de la CA3 más próxima al giro dentado) (Frotscher et al., 1991).

**Otros tipos celulares.** Están presentes en las tres capas del giro dentado, y son considerados minoritarios en cuanto a número de células y tipo de conexiones establecidas (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsaki, 1996). Muchos de ellos tienen en común la expresión de GABA como neurotransmisor y por lo tanto funcionan como interneuronas inhibitorias; serán tratados con detalle más adelante.

### 1.1.3. Conexiones en el giro dentado

#### **Conexiones aferentes:**

– La proyección asociacional/comisural parte de las células musgosas presentes en la capa polimórfica del giro dentado, y sus axones inervan el tercio interior de la capa molecular y sinapsan con las dendritas de las células granulares. Es una proyección glutamatérgica, y se la llama asociacional/comisural porque contiene axones tanto ipsilaterales (asociacionales) como contralaterales (comisurales), y una misma célula musgosa puede contribuir a la vez a ambos componentes de la proyección. Además de las células granulares, las células GABAérgicas en cesto presentes en la capa molecular son también diana de los axones de las células musgosas del hilus (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsaki, 1996).

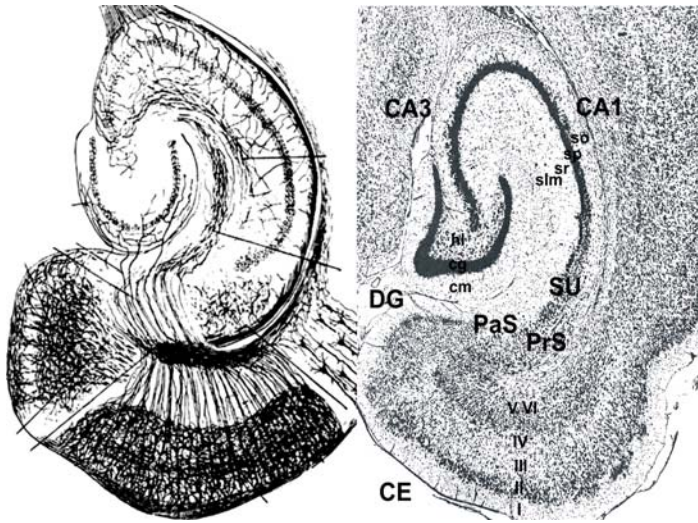
– La proyección de la vía perforante constituye la principal entrada del giro dentado. Los axones de esta conexión se originan principalmente en la capa II de la corteza entorrinal y sus terminaciones quedan restringidas en los dos tercios superficiales de la capa molecular del giro dentado (Amaral y Witter, 1995).

– El giro dentado recibe la conexión del septum, que tiene su origen en el núcleo medio y en el núcleo de la banda diagonal de Broca, y termina en todas las regiones de la formación hipocampal, pero de manera prominente en el giro dentado; en éste la conexión septal inerva de manera robusta el hilus (donde las terminaciones se concentran en una estrecha banda infragranular) y más débilmente la capa molecular (Amaral y Witter, 1995).

– El giro dentado recibe una importante proyección del hipotálamo, principalmente de la región supramamilar, que inerva densamente una estrecha franja de la capa molecular, situada justo por encima de la capa granular (Amaral y Witter, 1995).

– El giro dentado recibe una importante entrada de fibras noradrenérgicas y serotoninérgicas, que parten, respectivamente, del núcleo pontino locus coeruleus, y de varios lugares del núcleo del raphe. Ambas conexiones inervan el hilus del giro dentado, aunque las terminaciones serotoninérgicas tienden a concentrarse justo por debajo de la capa molecular. También existe una conexión dopaminérgica procedente del área tegmental ventral, aunque minoritaria y de difusa distribución (Amaral y Witter, 1995).

**Conexiones Eferentes.** El giro dentado establece una única proyección extrínseca: la formada por las fibras no-mielinizadas de las células granulares llamadas fibras musgosas, que sinapsan con las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. Por el camino, colaterales de las fibras musgosas inervan la capa polimórfica del giro dentado y contactan con las dendritas de las células musgosas, así como con interneuronas y otros tipos celulares (Amaral y Witter, 1995).



**Figura 22. Citoarquitectura de la formación hipocámpica.**

**Izquierda:** dibujo de Santiago Ramón y Cajal, representando la formación hipocámpica.

**Derecha:** imagen en blanco y negro de un corte horizontal del cerebro de rata, teñido mediante la técnica Nissl (adaptado de Amaral y Witter, 1995). CE: corteza entorrinal. cg: capa granular. cm: capa molecular. DG: giro dentado. PaS: parasubiculum. hl: hilus/capa polimórfica; PrS: presubiculum; SU: subiculum. sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunosum-moleculare. sp: estrato piramidal. so: estrato oriens. sr: estrato radiado.

existencia de esta región, el conjunto de datos indica que sí hay una región CA2 con características propias de conexión y probablemente funcionales. Al no ser objeto de estudio de este trabajo, en adelante la región CA2 no será tratada con más detalle; para más información, ver Amaral y Witter (1995).

### 1.2.1. Histología del hipocampo

Las tres regiones CA presentan una organización en capas en general parecida (Amaral y Witter, 1995):

**Capa piramidal.** Contiene las células principales del hipocampo: las neuronas piramidales.

**Estrato oriens.** Capa adyacente a la piramidal, situada en posición más profunda a ésta (cerca del ventrículo lateral); contiene las dendritas basales de las neuronas piramidales.

**Alveus.** Situada en posición más profunda al estrato oriens (justo por debajo del ventrículo lateral), es la capa más profunda del hipocampo.

**Estrato lúcido.** Presente sólo en CA3, esta estrecha capa sin células es adyacente y superficial a la capa piramidal, y contiene las fibras musgosas del giro dentado. En su extremo distal la capa se ensancha ligeramente, allí donde las fibras musgosas se curvan momentáneamente; es éste el punto que marca el límite entre CA3 y CA2/CA1.

**Estrato radiado.** Se sitúa superficial al estrato lúcido en CA3 y a la capa piramidal en CA2 y CA1, y contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales, así como las conexiones asociacionales en CA3 y las conexiones colaterales de Schaffer en CA1.

**Estrato lacunosum-moleculare.** Es la capa más superficial del hipocampo, y donde terminan, entre otras, la conexión que proviene de la corteza entorrinal, llamada vía perforante. Contiene junto con el estrato radiado las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

## 1.2. El hipocampo propio

El hipocampo consta de tres regiones, llamadas CA (por *cornu ammonis*, o cuerno de Amón): CA1, CA2, CA3 (figura 22). Entre las regiones CA1 y CA3 hay diferencias en cuanto al tamaño de sus células principales, las neuronas piramidales (más grandes en la CA3) y al patrón de conexión. En cuanto a la región CA2 existe cierta controversia; inicialmente fue definida como una estrecha zona entre las regiones CA1 y CA3, con neuronas piramidales grandes como en la CA3, pero sin la entrada de fibras musgosas como en la CA1. Aunque a menudo se haya cuestionado la

### 1.2.2. Tipos celulares del hipocampo

**Neuronas piramidales de la región CA3.** Las neuronas piramidales en CA3 presentan cuerpos celulares grandes formando una capa de entre 60 y 120  $\mu\text{m}$  de espesor. Las dendritas apicales se extienden por los estratos radiado y lacunosum-moleculare, mientras que las basales, más numerosas y cubiertas por pequeñas espinas, se encuentran en el estrato oriens. Las dendritas proximales (cerca del soma) presentan grandes excrescencias espinosas, botones sinápticos que contienen los terminales de las fibras musgosas y que forman el estrato lúcido (presente sólo en CA3). Los axones de las células piramidales emergen del polo basal de la neurona o bien de una dendrita primaria basal, y arborizan profusamente en la misma CA3 antes de abandonarla para inervar distintas regiones (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsaki, 1996).

**Neuronas piramidales de la región CA1.** Las neuronas piramidales de la región CA1 tienen un soma algo más pequeño que las de CA3, y se agrupan formando una capa también algo más estrecha, de unos 50-100  $\mu\text{m}$  de grosor. Sus dendritas apicales ocupan los dos estratos adyacentes, el estrato radiado y el estrato lacunosum-moleculare, mientras que las dendritas basales arborizan por el estrato oriens. El axón surge de la parte del soma cercana al tronco dendrítico apical o bien desde una dendrita basal, y establece muy pocas conexiones locales en la misma CA1, a diferencia de CA3 (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsaki, 1996).

**Otros tipos celulares.** Se distribuyen por todas las capas y regiones del hipocampo, y en su mayoría presentan inmunoreactividad para GABA, por lo que son consideradas neuronas inhibitorias de circuito local. Muchas de estas interneuronas GABAérgicas colocalizan con otras sustancias neuroactivas, como neuropéptidos y proteínas de unión a calcio; esta característica ha permitido la identificación y clasificación de distintas poblaciones de interneuronas en el hipocampo, que serán descritas en el siguiente apartado.

### 1.2.3. Interneuronas del hipocampo

Existen distintas clasificaciones referentes a las neuronas GABAérgicas de circuito local en el hipocampo y el giro dentado, según sus características morfológicas, conectivas o neuroquímicas. Dichas clasificaciones a menudo definen grupos de interneuronas que se solapan entre ellas, lo que indica la complejidad de esta población celular. Hay que tener en cuenta que este apartado se refiere solamente a las dos clasificaciones más utilizadas; para una revisión exhaustiva, ver Freund y Buzsaki, (1996).

#### ***Interneuronas según su morfología y conectividad:***

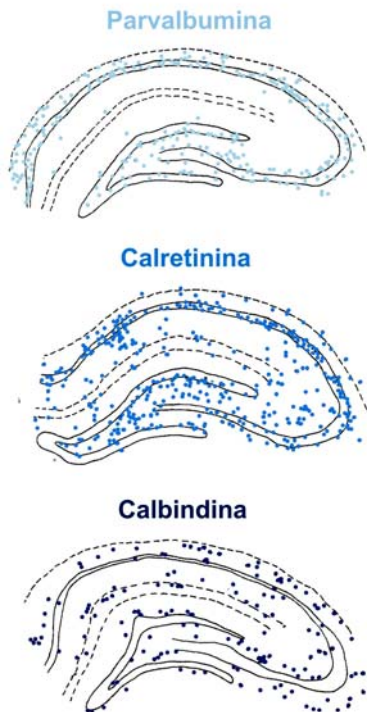
- ***Interneuronas axo-axónicas o candelabro.*** Su axón forma hileras de entre dos y treinta botones sinápticos que contactan específicamente con el segmento inicial del axón de neuronas principales, y el soma se sitúa en la capa piramidal del hipocampo y granular del giro dentado (Freund y Buzsaki, 1996).
- ***Células en cesto.*** Su terminal axónico adopta la forma de un cesto, que envuelve y contacta el soma de las neuronas principales, y el soma se localiza en las capas piramidal o granular, o en sus proximidades. De los distintos tipos de células en cesto, el mejor caracterizado es el piramidal (Freund y Buzsaki, 1996).
- ***Interneuronas que inervan las dendritas de neuronas principales.*** Existen distintos tipos según la distribución de su árbol dendrítico, todos ellos especializados en contactar con segmentos dendríticos específicos de las neuronas principales; algunos de ellos, además, contactan conjuntamente con determinados aferentes excitadores (Freund y Buzsaki, 1996).
- ***Interneuronas especializadas en inervar otras interneuronas (IS, interneurona-selectivas).*** Se describen tres tipos principales según su conectividad y características neuroquímicas: IS-1, que contienen Calretinina, IS-2 e IS-3, ambas inmunoreactivas para Calbindina y VIP (Freund y Buzsaki, 1996).

#### ***Interneuronas según su contenido en proteínas secuestradoras de calcio y neuropéptidos:***

En el hipocampo y giro dentado, la expresión de las proteínas secuestradoras de calcio Parvalbúmina, Calbindina y Calretinina, definen tres poblaciones independientes de interneuronas. También pueden identificarse distintos grupos de interneuronas según su expresión de neuropéptidos: Somatostatina, NPY, CCK y VIP (Freund y Buzsaki, 1996).

- *Parvalbumina*. Son interneuronas con somas grandes localizados en la capa piramidal y granular, y en general corresponden a células en cesto o axo-axónicas (figura 23) (Freund y Buzsaki, 1996).

- *Calbindina*. Las neuronas inmunoreactivas para Calbindina corresponden a interneuronas, neuronas granulares del giro dentado y neuronas piramidales superficiales de CA1. Una subpoblación de interneuronas que contienen Calbindina y somatostatina, situadas en el estrato oriens/alveus del hipocampo proyectan hacia el septum medial; el resto de interneuronas positivas para Calbindina se sitúan en el estrato radiado limitando con el estrato lacunosum-moleculare, así como en el estrato lacunosum-moleculare y en las capas de neuronas principales (figura 23) (Freund y Buzsaki, 1996).



**Figura 23.** Distribución de interneuronas en el hipocampo y giro dentado según su expresión de proteínas de unión a  $Ca^{+2}$  (Parvalbumina, Calretinina, Calbindina) (adaptado de Freund y Buzsaki, 1996).

- *Calretinina*. Se describen dos grupos de interneuronas GABAérgicas que contienen Calretinina: interneuronas espinosas, presentes en el hilus y el estrato lúcido de la CA3, y con grandes espinas que reciben el contacto sináptico de las fibras musgosas del giro dentado; e interneuronas no-espinosas, cuya gran mayoría corresponde al tipo de interneuronas IS, especializadas en inervar otras interneuronas (figura 23) (Freund y Buzsaki, 1996).

- *Somatostatina*. Se localizan en el hilus, en el estrato oriens de CA1, y en los estratos oriens, piramidal, lúcido y radiado de CA3 (figura 24). Las interneuronas inmunoreactivas para somatostatina del hilus corresponden a células HIPP (*hilar perforant path-associated cell*), interneuronas cuyas dendritas se restringen al hilus, y cuyo axón arboriza profusamente en los dos tercios externos de la capa molecular, donde coincide con los axones entorrinales. Las interneuronas somatostatina-positivas de CA1 y CA3 corresponden a células O-LM (*oriens-lacunosum-moleculare*), caracterizadas por tener un axón que ramifica exclusivamente en el estrato lacunosum-moleculare, coincidiendo allí con fibras entorrinales. La mayor parte de las interneuronas de CA1, situadas en el estrato oriens/alveus, colocalizan somatostatina y Calbindina, y proyectan hacia el septum medial (Freund y Buzsaki, 1996).

- *Neuropéptido Y (NPY)*. Se sitúan mayoritariamente en el hilus y la capa granular del giro dentado, en el estrato oriens y la capa piramidal de CA1, y en todas las capas de CA3 excepto el estrato lacunosum-moleculare (figura 24). Muchas de las

interneuronas inmunoreactivas para NPY comparten características con interneuronas positivas para somatostatina (células HIPP y O-LM) (Freund y Buzsaki, 1996).

- *Colecistoquinina (CCK)*. Se localizan en el hilus y la capa granular, y en el hipocampo ocupan mayoritariamente el estrato radiado. Corresponden a una subpoblación de células en cesto, independiente de la que contiene parvalbúmina, que inervan la región perisomática de neuronas granulares, piramidales, interneuronas y células musgosas (figura 24) (Freund y Buzsaki, 1996).

- *Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)*. En el giro dentado existen dos poblaciones distintas: una población localizada en la capa granular o proximidades, correspondiente a células en cesto que contactan con el soma de células granulares y que colocalizan CCK y VIP; otra población se sitúa en el hilus o estrato molecular, colocaliza Calretinina y VIP y está formada por interneuronas especializadas en inervar otras interneuronas (concretamente, del tipo IS-3). En el hipocampo se distinguen tres poblaciones de interneuronas VIP-positivas, distribuidas por todas sus capas: una población correspondiente a interneuronas tipo IS-3, inmunoreactivas para VIP y Calretinina; otra población formada por interneuronas tipo IS-2, que también colocaliza VIP y Calretinina, y que inerva interneuronas localizadas en el estrato radiado; y finalmente una población de células en cesto, que expresan VIP y CCK, y que inervan la región perisomática de las neuronas piramidales (figura 24) (Freund y Buzsaki, 1996).

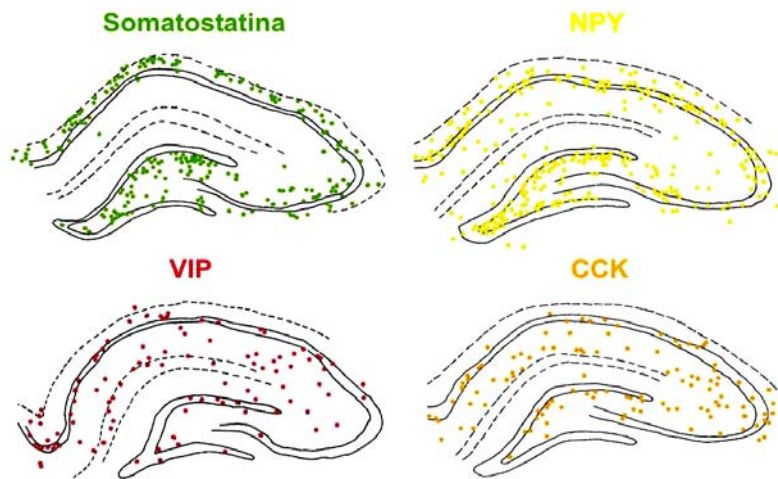


Figura 24 . Distribución de interneuronas en el hipocampo y giro dentado según su expresión de Somatostatina, Neuropéptido Y (NPY), Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y Colecistoquinina (CCK) (adaptado de Freund y Buzsaki, 1996).

#### 1.2.4. Región CA3 y sus conexiones

La región CA3 del hipocampo representa la segunda etapa del bucle trisináptico, al ser sus neuronas piramidales la principal diana de las fibras musgosas del giro dentado (figura 26). La región CA3 puede subdividirse en tres partes (Amaral y Witter, 1995):

- CA3c, o parte de CA3 adyacente al hilus;
- CA3a, o parte adyacente a CA2;
- CA3b, que se encuentra entre las dos partes anteriores

**Conexiones aferentes.** Además de la innervación por parte de las fibras musgosas originadas en el giro dentado, la región CA3 recibe otras aferencias de tipo excitatorio, todas ellas también estrictamente laminadas (Amaral y Witter, 1995):

- entradas desde otros puntos de la misma CA3 y de CA2, llamadas asociacionales (ipsilaterales) y comisurales (contralaterales), y ambas terminan en los estratos oriens y radiado;
- recibe la conexión de la vía perforante, que se origina en la capa II de la corteza entorrinal y termina en el estrato lacunosum-moleculare de CA3;
- recibe la proyección del septum, que se origina en el núcleo septal medial y en el núcleo de la banda diagonal de Broca, y una parte importante de ella la constituyen axones GABAérgicos. En CA3 inerva principalmente el estrato oriens y, en menor extensión, el estrato radiado, contactando mayoritariamente con interneuronas;
- recibe una entrada noradrenérgica desde el locus coeruleus, que contacta preferentemente con dendritas de interneuronas en el estrato lúcido y en la parte superficial del estrato lacunosum-moleculare.

**Conexiones eferentes.** La región CA3 envía proyecciones a distintas partes del hipocampo y fuera de él (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsaki, 1996):

- la principal conexión eferente la establecen en la región CA1 del hipocampo, y es conocida como asociacional o colateral de Schaffer; al igual que en la estructura dendrítica, también hay diferencias entre las tres zonas de CA3 respecto a la topografía y distribución de esta conexión. Considerando niveles septo-temporales (eje largo del hipocampo, con el extremo septal situado rostralmente) iguales o cercanos a las neuronas de origen de la proyección:
  - los axones de CA3c terminan preferentemente en la zona de CA1 más distal (cercana al área subicular) y contactan con las dendritas del estrato radiado;
  - los axones de CA3b tienen preferencia por la zona intermedia de CA1, y tienen más tendencia a innervar las dendritas del estrato radiado que las del estrato oriens;
  - los axones de CA3a sinapsan con las dendritas de los estratos oriens y radiado de la zona de CA1 adyacente a CA2.
- CA3 y CA2 proyectan a otras regiones CA3 y CA2, contactando ipsilateralmente con las dendritas de los estratos oriens y radiado; son las llamadas conexiones asociacionales.
- CA3 establece conexiones comisurales (en el hipocampo contralateral) con CA1, CA2 y CA3, terminando en los estratos oriens y radiado.
- En la parte ventral del hipocampo, las regiones CA3 y CA2 envían algunas aferencias a la capa polimórfica del giro dentado (Ishizuka et al., 1990).
- La región CA3 también proyecta a regiones extrahipocámpales, concretamente al núcleo lateral del septum (Swanson et al., 1980; Tamamaki et al., 1984).

### 1.2.5. Región CA1 y sus conexiones

La región CA1, principal diana de los axones de CA3 (colaterales de Schaffer), constituye entonces la tercera y última etapa del bucle trisináptico intrahipocámpal (figura 26). Se considera a la región CA1, junto con el subículo, como la principal emisora de proyecciones externas del hipocampo, principalmente de vuelta a la corteza entorrinal (y cerrándose así el bucle de información), pero también de forma indirecta a otras zonas neocorticales (Freund y Buzsáki, 1996).

**Conexiones aferentes.** La región CA1 establece una conexión asociacional débil, a diferencia de CA3, cuya proyección asociacional es masiva; únicamente colaterales aislados penetran en el estrato oriens y en la capa piramidal de regiones CA1 adyacentes. CA1 recibe una proyección comisural que resulta también minoritaria (Amaral y Witter, 1995) Por lo tanto, las principales conexiones de CA1 son aferencias extrínsecas a la región (Amaral y Witter, 1995):

- recibe una proyección minoritaria del septum, cuyas terminaciones se concentran en el estrato oriens;
- recibe fibras provenientes de la capa III de la corteza entorrinal, que forman parte de la vía perforante;
- recibe proyecciones noradrenérgicas y serotoninérgicas, también minoritarias;
- recibe fibras de la amígdala, que terminan en el estrato lacunosum-moleculare;
- recibe una prominente entrada desde el tálamo, que inerva el estrato lacunosum-moleculare y que se organiza topográficamente.

**Conexiones eferentes.** La región CA1 es considerada una de las estructuras del hipocampo, junto con el subículo, que más proyecta extrínsecamente (Amaral y Witter, 1995; Freund y Buzsáki, 1996):

- proyecta hacia el subículo y la corteza entorrinal, siendo la principal conexión extrínseca de la región (Freund y Buzsáki, 1996);
- también proyecta hacia otros lugares fuera de la formación hipocámpal, como zonas corticales límbicas, septum lateral, núcleo accumbens o bulbo olfativo, entre otros (Amaral y Witter, 1995).

## 1.3. Región subicular

### 1.3.1. Subículo

El subículo se sitúa adyacente a la región CA1, de manera que sus capas piramidal y molecular son continuas con la capa piramidal y el estrato radiado de CA1, respectivamente, mientras que el estrato oriens no tiene continuidad en el subículo y queda interrumpido. El subículo está compuesto por neuronas piramidales, que extienden su árbol dendrítico apical en la capa molecular, y sus dendritas basales en la propia capa piramidal. Existen otros tipos celulares mezclados entre las neuronas piramidales, entre los cuales hay interneuronas inhibitorias de circuito local (Amaral y Witter, 1995).

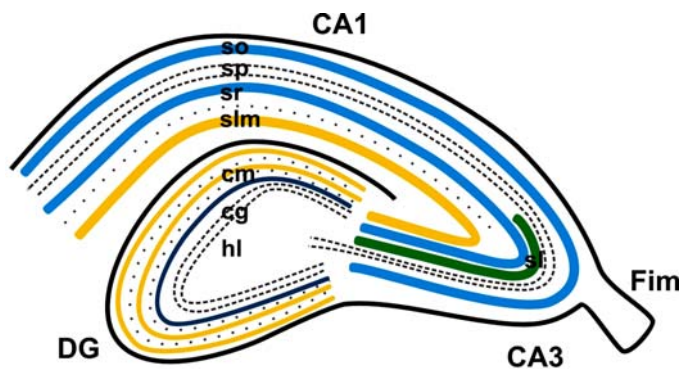
**Conexiones aferentes.** Las principales aferencias al subículo son las provenientes de la región CA1 del hipocampo y de la corteza entorrinal mediante la vía perforante. El subículo no recibe proyecciones corticales de importancia, pero diversas estructuras subcorticales sí que envían fibras al subículo, y en general son las mismas que proyectan a otras regiones de la formación hipocámpal: septum (núcleo septal medial y núcleo de la banda diagonal), complejo amigdalóide, tálamo (núcleo reuniens entre otros), hipotálamo (núcleo supramamilar y premamilar) (Amaral y Witter, 1995).

**Conexiones eferentes.** El subículo es, junto con CA1, una de las regiones de la formación hipocámpal que mayor cantidad de conexiones envía. Además de enviar fibras a la corteza entorrinal (ver más abajo), el subículo proyecta a distintas estructuras corticales: de forma prominente a la corteza prefrontal medial y núcleo olfativo anterior, a la corteza retrosplenial y perirrinal, y de forma menos intensa hacia la corteza cingular anterior (Amaral y Witter, 1995).

El subículum también envía fibras a regiones subcorticales, entre las cuales el septum y el hipotálamo son los que más axones subiculares reciben. Concretamente, el subículum inerva el septum básicamente a través de los núcleos laterales septales, el núcleo accumbens y el tubérculo olfativo; y el hipotálamo, a través de los núcleos mamilares. Otras regiones subcorticales que reciben proyecciones subiculares son el tálamo y el complejo amigdalóide (Amaral y Witter, 1995).

### 1.3.2. Presubículum

El presubículum contiene una franja celular superficial a una zona acelular profunda, continua a la capa IV de la corteza entorrinal. Dicha franja celular está compuesta por neuronas piramidales pequeñas y densamente empaquetadas, y puede dividirse en dos capas: la capa II presenta una mayor densidad celular, mientras que la capa III está por debajo de la capa II y sus células se distribuyen de forma más laxa (Amaral y Witter, 1995)



fibras comisurales (giro dentado)  
fibras comisurales (hipocampo)  
fibras entorrinales  
fibras musgosas

**Figura 25. Principales conexiones de la formación hipocampal.**

La conexión comisural del giro dentado (azul oscuro) parte de las células musgosas del hilus, y termina en el tercio interno de la capa molecular del giro contralateral. La conexión comisural del hipocampo (azul celeste) se origina en la región CA3, terminando en toda la extensión de la CA contralateral. Las fibras musgosas de las células granulares del giro terminan en la región CA3 del hipocampo (verde), formando el estrato lúcido. Por último, la proyección entorrino-hipocámpal o vía perforante (amarillo) empieza en las capas II/III de la corteza entorrinal, y terminan en los dos tercios externos del giro dentado, y en el estrato lacunosum-moleculare del hipocampo. sl: estrato lúcido. slm: estrato lacunosum-moleculare. so: estrato oriens. sp: estrato piramidal. sr: estrato radiado. cm: capa molecular. cg: capa granular. hl: hilus/capa polimórfica.

hacia la capa molecular del giro dentado (Amaral y Witter, 1995). Extrínsecamente, el presubículum inerva de forma masiva el tálamo lateral, y también conecta con la corteza retrosplenial y con el complejo mamilar del hipotálamo (Amaral y Witter, 1995).

### 1.3.3. Parasubículum

Las capas II y III del parasubículum, continuas con las del presubículum, están compuestas de grandes neuronas piramidales bastante empaquetadas. Las capas profundas del parasubículum, al igual que las del presubículum, son continuas con las de la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1995).

El parasubículum recibe una única conexión cortical desde la corteza retrosplenial y la corteza occipital visual; además, recibe aproximadamente las mismas conexiones subcorticales que el presubículum (ver más arriba) (Amaral y Witter, 1995).

En cuanto a las conexiones de salida, quizá la más importante es la que establece con la corteza entorrinal; al igual que el presubículum, la proyección parasubicular termina en la capa II, pero en este

**Conexiones aferentes.** El presubículum recibe pocas conexiones corticales; la más prominente es la originada en la corteza retrosplenial, y la corteza prelímbica también envía fibras, aunque en menor medida. Lo que caracteriza al presubículum (y también al parasubículum, ver más abajo) es la proyección que recibe desde el tálamo dorsal. Otras estructuras subcorticales también envían axones al presubículum: el septum (núcleo medial septal y núcleo de la banda diagonal de Broca), amígdala (núcleo basal), hipotálamo (región supramamilar) y tronco del encéfalo (núcleos del raphe y núcleo coeruleus) (Amaral y Witter, 1995).

**Conexiones eferentes.** El presubículum proyecta de forma prominente a la corteza entorrinal; sus fibras terminan casi exclusivamente en la capa II, y únicamente en el MEA. Además, el presubículum proyecta al parasubículum y escasamente al subículum, y envía una conexión muy débil hacia el hipocampo (donde termina en todas sus regiones) y

caso llega a ambas áreas, medial y lateral, de la corteza entorrinal. El parasubiculum también inerva la capa molecular del giro dentado, el estrato lacunosum-moleculare del hipocampo, y la capa molecular del subiculum, así como las capas celulares del presubiculum. Fuera de la formación hipocámpal, el parasubiculum únicamente envía una modesta proyección hacia el núcleo anterodorsal del tálamo (Amaral y Witter, 1995).

#### **1.4. Corteza entorrinal**

Constituye el inicio y el final del bucle trisináptico intrahipocámpal, ya que envía aferencias al giro dentado, y recibe fibras de la región CA1 del hipocampo, cerrando así el bucle de información (figura 26) (Freund y Buzsaki, 1996).

##### **1.4.1. Histología y tipos celulares de la corteza entorrinal**

El esquema de laminación de la corteza entorrinal más utilizado actualmente y en el pasado es similar al propuesto por Lorente de Nó, que distingue cinco capas celulares (capas II, III, V y VI), y dos capas acelulares (capas I y IV) (Amaral y Witter, 1995):

- **Capa I.** Es la capa más superficial, rica en fibras y con muy pocas neuronas. Contiene células GABAérgicas horizontales y estrelladas que proyectan al giro dentado y al hipocampo, así como una población neuronal que termina específicamente en las dendritas de neuronas estrelladas que proyectan al giro dentado, presentes en la misma capa II.
- **Capa II.** Contiene mayoritariamente células estrelladas (neuronas piramidales modificadas) de medio y gran tamaño, que tienden a agruparse formando islas celulares. Las células estrelladas son la principal fuente de fibras de la vía perforante, que proyecta a la región CA3 del hipocampo y al giro dentado. Incluye también otros tipos neuronales: piramidal, multipolar, horizontal, y todos ellos contribuyen a la proyección de la vía perforante. La mayoría de las neuronas de la capa II distribuyen sus dendritas en las capas I y II.
- **Capa III.** La mayoría de las células en esta capa son piramidales, y proyectan hacia el subiculum y la región CA1 del hipocampo mediante la vía perforante, mientras que sus dendritas apicales ascienden, emiten colaterales en la misma capa III y terminan en la capa I. Además de neuronas piramidales, en la capa III coexisten múltiples tipos celulares, lo que le da a la capa un aspecto heterogéneo: células multipolares, estrelladas, fusiformes, horizontales y bipolares, todas ellas contribuyendo a la vía perforante hacia el hipocampo.
- **Capa IV.** También llamada *lamina dissecans*, es una capa básicamente acelular.
- **Capa V.** La parte superior o capa Va está formada esencialmente por neuronas piramidales de gran tamaño, cuyas dendritas piramidales ascienden hasta las capas II y I, donde terminan en forma de mechón; en la capa Va también hay otras células más pequeñas, identificadas como multipolares, horizontales y estrelladas. La parte inferior o capa Vb tiene una composición celular parecida a la de la capa VI, con neuronas piramidales más pequeñas y tipos celulares polimórficos, y algunas de ellas contribuyen a la proyección hacia el hipocampo y el giro dentado.
- **Capa VI.** En cuanto a contenido celular, la capa VI es muy parecida a la capa V, con una población celular muy heterogénea en cuanto a tamaño y forma; parte de esta población también proyecta al hipocampo y giro dentado (Amaral y Witter, 1995).

##### **1.4.2. Regiones de la corteza entorrinal y sus conexiones**

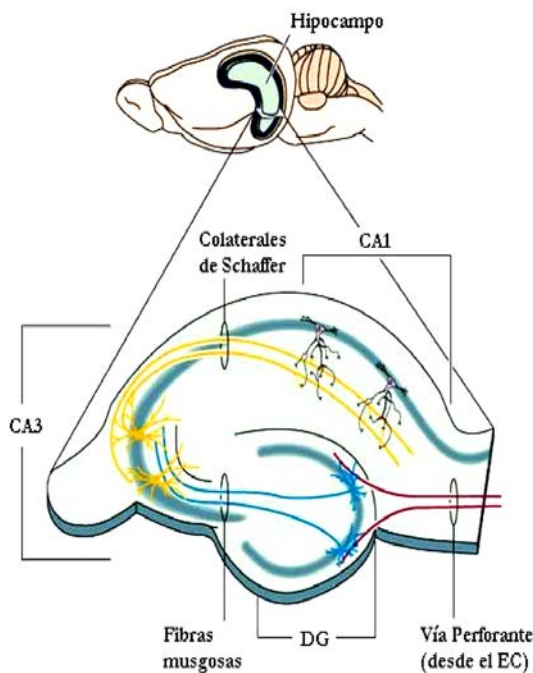
**MEA/LEA.** La corteza entorrinal se subdivide en dos partes: el área entorrinal medial o MEA, adyacente al hipocampo, y el área entorrinal lateral o LEA, adyacente a la corteza perirrinal. Existen diferencias en cuanto a la histología y al patrón de proyección (Amaral y Witter, 1995):

- en el LEA, la capa II se encuentra claramente delineada respecto a capas adyacentes, la densidad de células estrelladas es elevada, y su agrupamiento en islas es evidente. En cambio, en el MEA las células estrelladas son algo más grandes, están menos empaquetadas y no forman islas; además, el límite entre la capa II y III no está tan definido como en el LEA;



- las capas IV-VI están mejor delineadas en el MEA que en el LEA, y las células en MEA tienden a distribuirse de forma radial o columnar;
  - el patrón de proyección de la vía perforante es distinta entre las dos regiones (ver más abajo).
- 1.4.3. La proyección entorrino-hipocampal (vía perforante).

Constituye la principal aferencia del giro dentado, y una prominente aferencia del hipocampo y la región subicular. Se la denomina “perforante” porque sus fibras, una vez abandonan la corteza entorrinal, atraviesan el subículo para así entrar en el giro dentado y al mismo tiempo distribuirse por las capas moleculares del hipocampo y el subículo. Es una proyección glutamatérgica, y su fuente principal se encuentra en las capas II y III, aunque capas más profundas contribuyen en menor medida. Varios tipos neuronales envían sus axones mediante la vía perforante, entre ellos algunos GABAérgicos, siendo las células estrelladas de capa II y las neuronas piramidales de capa III los mayoritarios (Amaral y Witter, 1995).



**Figura 26. Formación hipocampal: el circuito trisináptico**

Se considera al giro dentado la primera etapa del circuito trisináptico, al recibir la conexión de la corteza entorrinal (llamada vía perforante). Las fibras musgosas, originadas en la capa granular del giro, conectan con la región CA3 del hipocampo, segunda etapa del circuito. De la región CA3 parte la conexión asociacional (también llamada colateral de Schaffer), que termina en la región CA1. La región CA1, que envía su principal proyección eferente de vuelta a la corteza entorrinal, es la tercera y última etapa del circuito.

**CA3.** Las fibras originadas en la capa II son las que principalmente terminan en el estrato lacunosum-moleculare de la región CA3. De forma análoga al giro dentado, el LEA proyecta a la zona más superficial del lacunosum-moleculare, mientras que el MEA proyecta en lugares más profundos de la misma capa. CA3, al igual que el giro, no establece proyección recíproca con la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1995).

**CA1.** A diferencia de lo que ocurre en el giro dentado y en CA3, las fibras entorrinales que llegan a la región CA1 se originan en la capa III y se distribuyen por toda la extensión radial del estrato lacunosum-moleculare. Los axones que provienen del MEA terminan en la zona proximal de CA1 (adyacente a CA3), y aquellos provenientes del LEA terminan en la zona de CA1 más distal (cerca del subículo). A diferencia del giro dentado y de CA3, CA1 sí que envía fibras de vuelta a la corteza entorrinal, que invaden la capa V (Amaral y Witter, 1995).

**Región subicular.** El subículo recibe una intensa proyección de la corteza entorrinal que, al igual que CA1, tiene su origen mayoritariamente en la capa III, aunque las fibras de la capa II, en su

Además de la vía perforante, ipsilateral en esencia, existen conexiones entorrinales cruzadas, que parten exclusivamente de la capa III e inervan principalmente el giro dentado contralateral, y en menor medida las regiones CA y el subículo (Amaral y Witter, 1995).

**La vía perforante en el giro dentado.** Las fibras de la vía perforante que proyectan al giro dentado parten básicamente de la capa II, y terminan exclusivamente en los dos tercios externos de la capa molecular del giro; contactan con espinas dendríticas de células granulares, aunque también pueden contactar con dendritas de neuronas GABAérgicas. Las fibras originadas en el LEA terminan en el tercio externo, mientras que aquellas que provienen del MEA terminan en el tercio medial de la capa molecular. No existe proyección recíproca hacia la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1995).

**La vía perforante en el hipocampo.**

camino hacia el giro dentado y las regiones CA, emiten colaterales que sinapsan en el subíulum. El componente de la proyección proveniente del LEA termina preferentemente en el subíulum proximal (adyacente a CA1), y el componente del MEA lo hace en el subíulum distal (cerca del presubíulum). El subíulum proyecta recíprocamente hacia la corteza entorrinal, y sus fibras excitatorias invaden la capa IV y capas más profundas. Por otra parte, la capa I del presubíulum y parasubíulum reciben una débil conexión entorrinal, originada básicamente en la capa Va, que contrasta con la densa proyección que envían presubíulum y parasubíulum a la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1995).

#### 1.4.4. Otras conexiones de la corteza entorrinal

**Conexiones aferentes.** Además de las fibras provenientes de la región CA1 y del subíulum en la formación hipocámpal (ver más arriba), la corteza entorrinal recibe proyecciones de distintas regiones corticales, que pueden clasificarse en dos grupos según la capa en que terminen (Amaral y Witter, 1995):

- las estructuras olfativas del telencéfalo (bulbo olfativo, núcleo olfativo anterior, corteza piriforme) y la corteza perirrinal proyectan en capas superficiales de la corteza entorrinal (capas I-III);
- varias estructuras límbicas o paralímbicas (corteza insular, corteza infralímbica y prelímbica, corteza cíngular, corteza retrosplenial) envían fibras hacia la corteza entorrinal, donde inervan capas profundas (IV-VI).
- La corteza entorrinal también recibe conexiones de varias estructuras subcorticales: el septum, el complejo amigdalóide, el tálamo, el hipotálamo y el tronco del encéfalo. Entre ellas, algunas también proyectan al hipocampo y al giro dentado (ver más arriba): el núcleo medio y el núcleo de la banda diagonal de Broca en el septum; el núcleo reuniens en el tálamo; el núcleo supramamilar y el área tegmental ventral en el hipotálamo; el núcleo del raphe y el locus coeruleus en el tronco del encéfalo (Amaral y Witter, 1995).

**Conexiones eferentes.** La corteza entorrinal envía fibras que inervan varias zonas de la corteza límbica, paralímbica y olfativa, así como estructuras subcorticales como el septum, la amígdala y el núcleo estriado (Amaral y Witter, 1995).



## **2. DESARROLLO DEL HIPOCAMPO**

### **2.1. Introducción**

Todo el sistema nervioso se desarrolla a partir del tubo neural. De su parte anterior emergen las tres vesículas que darán lugar al encéfalo: en dirección rostral-caudal, el prosencéfalo, el mesencéfalo, y el romboencéfalo. Posteriormente, el prosencéfalo se subdivide en dos vesículas telencefálicas y una vesícula diencefálica. El telencéfalo consiste en dos regiones principales: el palio o techo del telencéfalo, que da lugar a estructuras corticales superficiales y a núcleos más profundos (como el claustrum y parte de la amígdala), y el subpalio, que consiste básicamente en los ganglios basales, por ejemplo, el estriado o el globo pálido (Marin y Rubenstein, 2001, 2003). En el palio del telencéfalo pueden distinguirse tres regiones: lateral, dorsal y medial, que darán lugar, respectivamente, a las tres principales regiones de la corteza cerebral en mamíferos: corteza olfativa, neocorteza e hipocampo. La formación hipocampal (arquicorteza) y la corteza olfativa (paleocorteza) están formadas por tres capas, y se encuentran presentes en vertebrados inferiores, como reptiles, y también en superiores, como mamíferos; mientras que la neocorteza o isocorteza está compuesta por seis capas y es un rasgo característico de vertebrados superiores (Super et al., 1998b). A pesar de estas diferencias, la ontogenia de las tres regiones del palio telencefálico es similar. Siendo la neocorteza y el hipocampo las mejor estudiadas, a partir de aquí el término corteza se referirá a estas dos regiones en general (aunque en realidad también incluya la paleocorteza), distinguiendo entre neocorteza e hipocampo cuando sea necesario.

#### **2.1.1. Visión general del desarrollo de la corteza cerebral**

En la actualidad, se asume que en la formación de la corteza cerebral participan dos compartimientos distintos, que se caracterizan por proporcionar a la corteza en desarrollo linajes celulares específicos mediante procesos migratorios diferentes. Uno de ellos lo constituye la zona ventricular, situada en la superficie de los ventrículos laterales, que es la primera estructura histológica que se distingue en la región cortical; las células progenitoras pluripotenciales que la componen dan lugar básicamente a células gliales y a neuronas piramidales, glutamatérgicas que una vez abandonan el ciclo celular, se incorporan a la corteza en desarrollo mediante un proceso de migración radial a través de fibras gliales especializadas, dispuestas radialmente. El segundo compartimiento, el subpalio telencefálico, aporta la práctica totalidad de neuronas GABAérgicas y al menos una parte de otras poblaciones celulares corticales, como oligodendrocitos o células de Cajal-Retzius, y estas células alcanzan la corteza en desarrollo siguiendo trayectorias de migración tangencial (Marin y Rubenstein, 2003; Soriano y Del Rio, 2005; Super et al., 1998b).

#### **2.1.2. La migración radial**

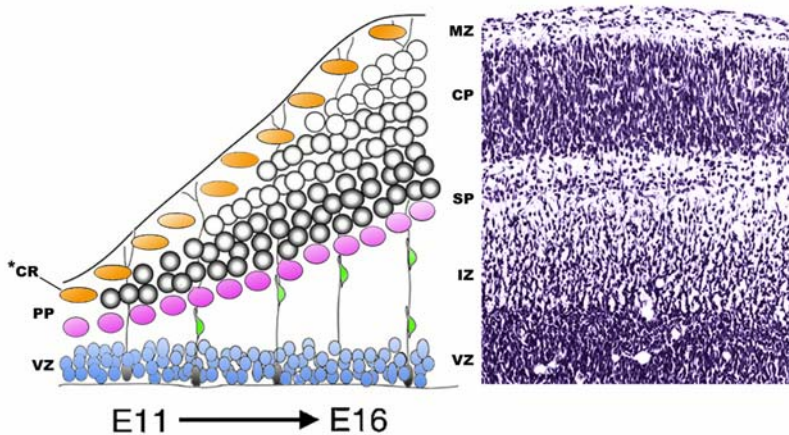
Las primeras células postmitóticas que aparecen en la corteza primordial son las que más tarde poblarán la zona marginal y subplaca, y que en los primeros estadios del desarrollo cortical forman la primera capa cortical reconocible, llamada capa plexiforme primordial o preplaca. La siguiente oleada de células postmitóticas, básicamente futuras neuronas piramidales y generadas en la zona ventricular, migra radialmente y forman la placa cortical situándose en medio de la preplaca, por lo que ésta queda dividida en la zona marginal, situada entre la superficie pial y la placa cortical, y la subplaca, situada entre la placa cortical y la zona intermedia. A partir de aquí, nuevas oleadas migran para engrosar la placa cortical inicial, siguiendo un gradiente “dentro-fuera”, de manera que células más jóvenes deben atravesar las capas de células ya establecidas. Durante la migración radial, las células usan como substrato principal las fibras de la glía radial, aunque en ocasiones se ha observado la migración de células corticales mediante otros substratos como haces axonales (figura 27) (Super et al., 1998b).

#### **2.1.3. La migración tangencial**

Actualmente se asume que la mayoría de neuronas GABAérgicas corticales, ya sean de la corteza olfativa, la neocorteza o el hipocampo, se generan en el subpalio del telencéfalo y migran siguiendo distintas vías tangenciales (figura 28) (Anderson et al., 1997; Marin y Rubenstein, 2001). El subpalio telencefálico también es fuente de oligodendrocitos que, al igual que las interneuronas

GABAérgicas, migran tangencialmente hasta la corteza (Marin y Rubenstein, 2001). Varias regiones proliferativas del subpallio son origen de las células que se desplazan tangencialmente hacia la corteza: la eminencia ganglionar media (MGE) y lateral (LGE) (Anderson et al., 2001), el área entopeduncular anterior (aep), que aporta una gran cantidad de oligodendrocitos al telencéfalo, o el área retrobulbar (Marin y Rubenstein, 2001). Se distinguen tres fases en la migración tangencial desde el subpallio hasta la corteza cerebral:

- 1) la corriente temprana de migración empieza en ratón a E11.5 desde la MGE y la aep, rodea superficialmente el núcleo estriado y entra en la zona marginal y la subplaca en la corteza;
- 2) en la segunda fase (entre E12.5 y E14.5) la MGE es la principal fuente de células que siguen un



**Figura 27. Desarrollo de la neocorteza.**

La primera oleada de progenitores provenientes de la zona ventricular (VZ) migran radialmente y se sitúan en la preplaca (PP), dividiéndola en subplaca (SP) y zona marginal (MZ). Sucesivas oleadas de neuroblastos se van añadiendo progresivamente a la placa cortical inicial (CP) en dirección “dentro-fuera”, de manera que aquellas células corticales más jóvenes se sitúan más cerca de la superficie pial. CP: placa cortical CR: células de Cajal Retzius. IZ: zona intermedia. MZ: zona marginal. PP: preplaca. SP: subplaca. VZ: zona ventricular (adaptado de Rice y Curran, 2001).

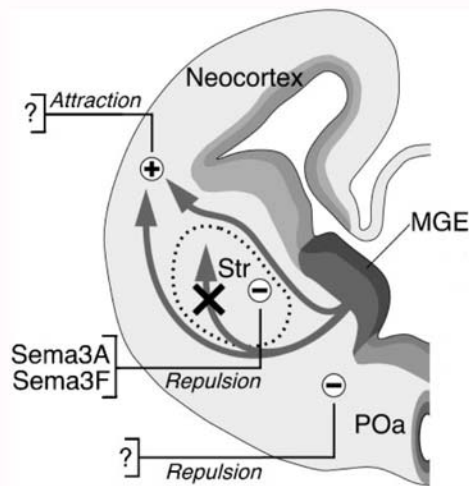
curso superficial o profundo respecto al estriado y penetran en la subplaca y en la zona subventricular/zona intermedia, extendiéndose desde ahí por toda la corteza en sentido radial;

- 3) la última fase de migración (E14.5-E16.5) es cubierta por células originadas tanto en la MGE como en la LGE que, siguiendo una ruta profunda respecto al estriado, invaden la corteza por la zona proliferativa subcortical, extendiéndose radialmente por toda la corteza las originadas en el MGE, y permaneciendo en la zona proliferativa las procedentes del LGE (Anderson et al., 2001; Marin y Rubenstein, 2001).

La migración tangencial desde estructuras subpaliales hasta la corteza depende de tres tipos de factores (Marin y Rubenstein, 2001, 2003):

- 1) factores motogénicos, como HGF/SF o neurotrofinas, que estimulan el movimiento de las neuronas para así abandonar el subpallio donde han sido generadas;
- 2) factores que actúan de sustrato para la migración tangencial, que parece ser independiente de glía radial, y que está asociada a la trayectoria de axones corticofugales pero también a rutas pobres en fibras, como la zona intermedia profunda o la zona subventricular.
- 3) factores quimiotácticos que aportan direccionalidad a las células en distintas etapas de su ruta tangencial, a) porque confieren actividad repulsiva o atractiva al tejido que rodea la ruta de migración tangencial, guiando a las células en dirección ventral-dorsal; b) porque permiten la distribución de células subpaliales entre distintas estructuras telencefálicas (función en la que participa el tándem semaforinas-neuropilinas); c) para que las células subpaliales, una vez alcanzan la corteza, se distribuyan a lo ancho de ella según el mismo gradiente “dentro-fuera” que siguen las neuronas de proyección, originadas en la zona ventricular cortical.

#### 2.1.4. Células pioneras en el desarrollo de la corteza cerebral



**Fig 28. Migración tangencial desde el subplacio hacia la corteza cerebral.**

Las interneuronas originadas en la eminencia ganglionar medial (MGE) se dirigen hacia la corteza cerebral siguiendo una orientación tangencial. Distintas regiones colindantes emiten señales quimiotácticas que dirigen a las interneuronas migrantes hacia su destino: el área preóptica (POa) ejerce un efecto quimiorrepulsivo de origen desconocido; el estriado también repele las interneuronas gracias a la expresión de *Sema3A* y *Sema3F*; y la neocorteza atrae a las interneuronas mediante un factor o factores aún sin identificar. (adaptado de Marin y Rubenstein, 2001).

La primera oleada de células postmitóticas en la corteza se las considera células pioneras, al ser las primeras en invadir la zona plexiforme primordial para formar la preplaca, que más tarde se escinde en la subplaca y la zona marginal. Dichas células pioneras desempeñan funciones específicas que resultan esenciales para el posterior proceso ontogénico tanto en la neocorteza como en el hipocampo.

**Glía Radial.** Las células de la glía radial son de las primeras células que aparecen en la preplaca. Son astrocitos convertidos transitoriamente a un fenotipo de morfología bipolar que se extiende por un lado hasta la membrana ventricular, y por otro hasta la superficie pial, abarcando así toda la pared cerebral. Esta peculiar disposición permite la migración de células postmitóticas en sentido radial, dando lugar a una distribución columnar de células emparentadas (del mismo clon) que conserva la distribución original en el ventrículo, y permite también la migración tangencial de células entre distintas fibras radiales conectadas entre sí. El sistema radial también es seguido por axones aferentes que penetran en la placa cortical.

Durante el proceso de migración radial es necesario la formación de estructuras especializadas de unión entre la neurona y el proceso glial, además de la presencia de diversas CAM, de procesos de señalización a través de las membranas, o de la expresión por parte de la neurona en migración de una glucoproteína llamada astrotactina. Una vez terminada la migración, la glía radial retrae la prolongación membranosa que la mantenía unida a la lámina basal de la superficie pial, cambia su morfología y pasa a ser astroglia. Este cambio fenotípico implica entre otras cosas la alteración en la dotación de filamentos intermedios: la astroglia deja de expresar Nestina, Vimentina y antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales RC1, 2 y 3CB2, y en cambio empieza a sintetizar GFAP. El tránsito de un fenotipo a otro es reversible, y puede ser inducido, por ejemplo, por factores difundibles o asociados a membrana, o por efectos de una lesión (Super et al., 1998b).

**La Subplaca.** La subplaca contiene una heterogénea población que queda separada de la zona marginal con la formación de la placa cortical. Dentro de una misma especie, su tamaño difiere según la región de la corteza cerebral: mientras en la neocorteza la subplaca forma una prominente capa, en hipocampo y corteza olfativa es difícil distinguirla como capa independiente. Las células de la subplaca juegan un papel clave en el desarrollo cortical; son las primeras neuronas en proyectar fuera de la neocorteza y el hipocampo, y estas proyecciones iniciales son consideradas como pioneras, ya que guían a las aferencias de la neocorteza y el hipocampo, que a su vez establecen contactos sinápticos transitorios con las neuronas de la subplaca. En roedores adultos, las células de la subplaca pasan a formar parte de la capa VIb (o VII) en la corteza cerebral, y la mayoría de las conexiones pioneras de la subplaca han desaparecido. En el hipocampo, la subplaca se convierte en el estrato oriens adulto, y mantiene casi toda su población de células GABAérgicas pioneras presentes durante el desarrollo (ver más abajo y figura 29) (Soriano et al., 1994; Super et al., 1998b).

**La Zona Marginal.** El tipo celular mayoritario de la zona marginal lo constituyen las células de Cajal-Retzius (CR). Se distribuyen de forma homogénea por toda la corteza cerebral en desarrollo, incluido el hipocampo, donde ocupan la parte más externa de la gruesa zona marginal hipocampal,

mientras que la parte interna contiene interneuronas GABAérgicas. En roedores, las células CR adoptan una morfología bipolar horizontal, la mayoría de ellas son glutamatérgicas y se pueden identificar durante toda su vida por su inmunoreactividad hacia Calretinina (figura 29). Se generan en determinados lugares (región periolfativa, regiones específicas del primordio cortical, o la eminencia ganglionar), y desde allí migran tangencialmente por la zona marginal, de manera análoga a las interneuronas GABAérgicas; sin embargo, parece ser que al menos parte de la población de CR puede originarse en el epitelio ventricular (Soriano y Del Rio, 2005).

En la corteza cerebral, las células CR son las principales productoras de Reelina. Además de la acción directa de Reelina en el desarrollo cortical, las células CR regulan la organización de la glía radial, su mantenimiento y su transformación a astrogliá (fenómenos que dependen parcialmente de Reelina), y junto con interneuronas GABAérgicas forman una red de actividad neuronal espontánea, que aparece en estadios tempranos del desarrollo, y que podría modular la maduración de la corteza cerebral, a través de conexiones de los axones de las células CR con las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Soriano y Del Rio, 2005).

La zona marginal de la neocorteza se convierte, en el adulto, en la capa I de la corteza cerebral. En el hipocampo adulto, la zona marginal interna pasa a ser el estrato radiado, y la zona marginal externa, el estrato lacunosum-moleculare, y parte de la población de células pioneras presente en la zona marginal durante el desarrollo embrionario desaparece, posiblemente por muerte celular, durante el periodo postnatal en ratón: las células GABAérgicas de la zona marginal interna mueren en un 50% aproximadamente a partir de P5, mientras que las células CR presentes en la zona marginal externa desaparecen en un 75% a partir de la segunda semana postnatal (Super et al., 1998a; Super et al., 1998b).

## **2.2. Neurogénesis y migración en la formación hipocampal**

### **2.2.1. Neurogénesis y migración en el hipocampo propio**

Al igual que la neocorteza, con la que se encuentra en directa continuidad a través del complejo subicular, el hipocampo previo al inicio de la neurogénesis está formado por un epitelio pluriestratificado columnar, llamado zona o epitelio ventricular, donde ocurre la proliferación celular que, como en la neocorteza, genera básicamente neuronas piramidales, glutamatérgicas. A medida que las células se vuelven postmitóticas, abandonan el epitelio ventricular y migran a través del primordio hipocampal para formar la placa cortical hipocampal. En la capa piramidal del hipocampo propio, se observa un gradiente de generación desde CA3 a CA1 que se aplica tanto a neuronas piramidales como a interneuronas inmunoreactivas para GAD (Soriano et al., 1986, 1989a), mientras que las neuronas de la corteza entorrinal son generadas antes que las del complejo subicular (Standfield y Cowan, 1988).

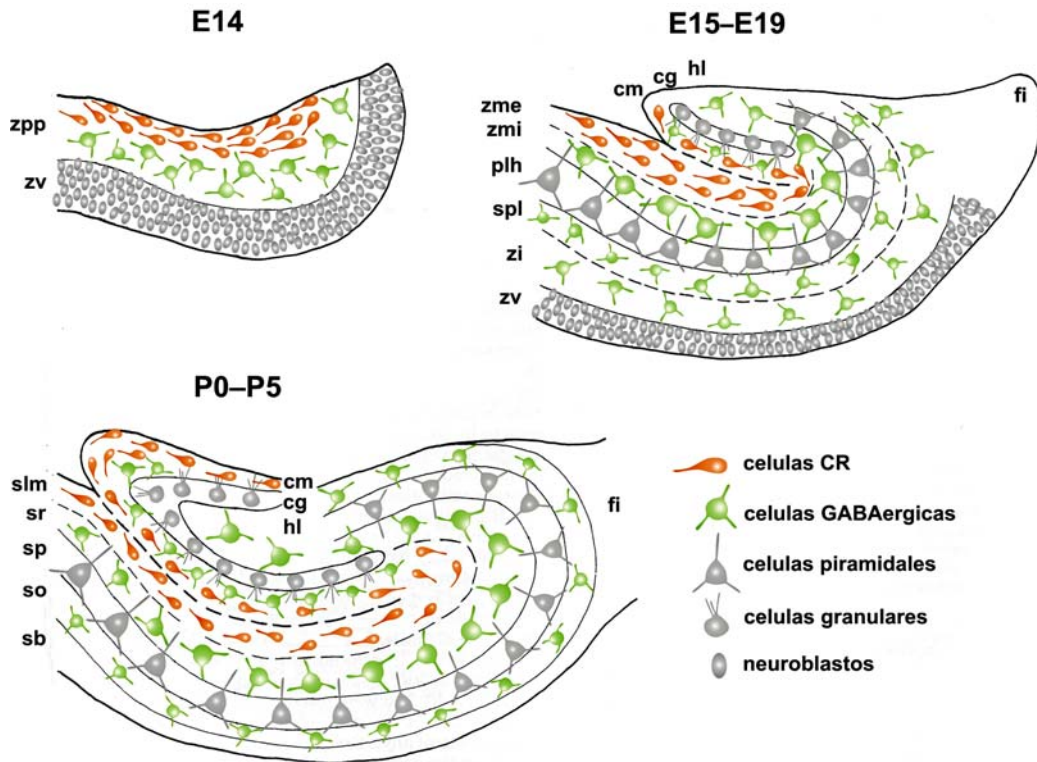
En el hipocampo propio de ratón se ha descrito una notable asincronía en la generación de neuronas piramidales y neuronas GABAérgicas: las células inmunoreactivas para GAD se generan siempre antes que las no-inmunoreactivas, que corresponden a células piramidales. Así, en CA3, las cotas máximas de producción de neuronas GABAérgicas y piramidales se alcanzan a E12-E13 y E14-15 respectivamente, mientras que en CA1, dichos periodos corresponden a E12-15 y E15-16 respectivamente (Soriano et al., 1986, 1989a). Además, la neurogénesis de las células GAD-positivas sigue una secuencia “en sándwich”, siendo generadas las pertenecientes a la subplaca (futuro estrato oriens) y a la zona marginal interna (futuro estrato radiado) antes que las destinadas a la capa piramidal (Soriano et al., 1989a; Soriano et al., 1994).

Al igual que en la neocorteza, más tarde aparece, en la región retrohipocampal (corteza entorrinal y complejo subicular), una segunda zona proliferativa por debajo del epitelio ventricular, llamada zona subventricular, que alberga actividad proliferativa cuando ésta ya ha cesado en la zona ventricular, y produce las últimas neuronas y también gran parte de la glía propia de cada región. Sin embargo, en el hipocampo propio y subículo no se observa en ningún estadio del desarrollo una zona subventricular obvia, por lo que se postula que tanto la neurogénesis como la generación de células gliales queda confinada en la zona ventricular (Standfield y Cowan, 1988).

Tanto en el hipocampo propio como en el complejo subicular y en la corteza entorrinal, las neuronas postmitóticas, ya sean piramidales o GABAérgicas, migran y se sitúan en la placa cortical hipocampal siguiendo un gradiente “dentro-fuera”, de forma análoga a lo que ocurre en la neocorteza. Las neuronas hipocampales, al igual que las corticales, migran estrechamente pegadas a fibras de la glía

radial, aunque su tasa de migración es más lenta que en la neocorteza (Soriano et al., 1989a; Standfield y Cowan, 1988).

### 2.2.2. Neurogénesis y migración en el giro dentado



**Figura 29. Células pioneras en el desarrollo del hipocampo y el giro dentado.**

Antes de la aparición del estrato piramidal (E14 en ratón), el hipocampo únicamente contiene células CR (immunopositivas para calretinina) e interneuronas GABAérgicas en la zona plexiforme primordial (zpp), además de una zona ventricular prominente. Más adelante (E15-E19 en ratón), y coincidiendo con las primeras células poblando la placa hipocámpal (plh) y la capa granular incipiente (cg), se observan varias poblaciones neuronales segregadas de forma laminar y sin solaparse: interneuronas GABAérgicas ocupan la zona intermedia (zi), la subplaca (spl) y la zona marginal interna (zmi) del hipocampo, y la capa molecular interna (cm) e hilus (hl) del giro dentado; la zona marginal externa (zme) del hipocampo y la capa molecular externa (cm) del giro dentado contienen células CR. Esta distribución neuronal se mantiene a edades postnatales tempranas (P0-P5): las células GABAérgicas se sitúan en los estratos oriens (so) y radiado (sr) del hipocampo, y en la capa molecular interna (cm) e hilus (hl) del giro dentado, mientras que la población de células CR ocupa el estrato lacunosum-moleculare del hipocampo y la capa molecular externa del giro dentado. cg: capa granular. cm: capa molecular. plh: placa hipocámpal. sb: sustancia blanca. slm: estrato lacunosum-moleculare. so: estrato oriens. sp: estrato piramidal. sr: estrato radiado. zi: zona intermedia. zme: zona marginal externa. zmi: zona marginal interna. zpp: zona plexiforme primordial. zv: zona ventricular (adaptado de Soriano et al., 1994).

En el giro dentado del ratón se observa una asincronía en la generación de células GABAérgicas y células granulares aún más elevada que en el hipocampo propio; las primeras neuronas en generarse son GAD-positivas, y lo hacen entre E12 y E16 (coincidiendo aproximadamente con las neuronas más tempranas del hipocampo propio), mientras que las neuronas no-immunoreactivas para GAD, que corresponden a células granulares, se producen durante un largo periodo que tiene su punto máximo durante la primera semana postnatal (Soriano et al., 1989b). Al igual que en el hipocampo propio, se observa en el giro dentado una secuencia de generación “en sándwich”: las primeras neuronas que aparecen se sitúan en el hilus y en la capa molecular (Soriano et al., 1994). Existe un gradiente radial en la generación de células granulares del giro dentado, pero a diferencia del hipocampo propio, dicho gradiente es en sentido contrario, o sea, “fuera-dentro”, y no se observa en las neuronas immunopositivas para GAD presentes en la parte profunda de la capa granular, que forman parte de la población celular de aparición más temprana del giro dentado. También se observa un gradiente en el



plano transversal, de manera que la región suprapiramidal del giro dentado se forma antes que la región infrapiramidal (Soriano et al., 1989b; Standfield y Cowan, 1988).

En un principio, la proliferación celular en el giro dentado se concentra en el neuroepitelio ventricular; algo más tarde, se desarrolla una segunda zona proliferativa por debajo de la superficie pial, que aporta junto con la zona ventricular, neuronas postmitóticas al primordio dentado. Posteriormente, cuando ya es posible reconocer la capa de células granulares, un grupo de células proliferantes permanece por algún tiempo a lo largo de la cara hilar de la capa granular. Como en roedores la actividad proliferativa de la zona ventricular ya ha cesado durante la primera semana postnatal (momento en que se alcanza la cota máxima de generación de células granulares), se postula que la gran mayoría de células granulares proviene de la zona proliferativa extraventricular. Tras la neurogénesis granular, la producción de neuronas en el giro dentado continúa a un ritmo lento durante algún tiempo, y en roedores hasta la edad adulta. Parece ser que, en el adulto, las nuevas células granulares desplazan a las ya existentes hacia el hilus, por lo que la neurogénesis en el giro dentado adulto no tiene como objetivo el reemplazar células granulares degeneradas, sino que produce un incremento progresivo de la capa granular al añadir nuevas células granulares que además son capaces de proyectar hacia el estrato musgoso en la CA3 del hipocampo propio (Standfield y Cowan, 1988)

En el giro dentado, la formación de la segunda zona proliferativa extraventricular muy probablemente se realice por parte de los precursores ventriculares simplemente mediante la translocación del soma hacia su polo basal y la posterior retirada de su proceso apical. Una vez situados en la zona proliferativa secundaria, y tras volverse postmitóticas, se observa en la migración de las células granulares una fase inicial, en la que se extienden ampliamente lejos de la futura fimbria siguiendo una trayectoria no-radial, paralela a la superficie pial; y una segunda fase en la que utilizan las fibras de glía, dispuestas en una orientación no estrictamente radial, para situarse en la emergente capa granular. Después de alcanzar la cota máxima de producción granular, el lugar de proliferación queda confinado a la región interna de la capa granular, por lo que las últimas células granulares generadas no pasan por la fase de migración postmitótica, sino que simplemente se desplazan hacia la superficie a medida que nuevas neuronas granulares se van acumulando por debajo (Standfield y Cowan, 1988).

### 2.2.3. Origen de las interneuronas de la formación hipocampal

Se suponía que las células GABAérgicas del hipocampo seguían la misma secuencia ontogénica que el resto de células GABAérgicas de la corteza cerebral, es decir, se generaban en el subpallio telencefálico y migraban tangencialmente hasta el hipocampo en desarrollo. Pleasure y colaboradores (Pleasure et al., 2000) demostraron tal presunción, al mostrar la total deficiencia de células GABAérgicas en el hipocampo postnatal de ratones mutantes en los genes *homeobox dlx1/2*, caracterizados por presentar anomalías en la migración celular desde la eminencia ganglionar medial y lateral (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2001). Por lo tanto, las interneuronas GABAérgicas del hipocampo y neocorteza tienen el mismo origen: las eminencias ganglionares (MGE y LGE). El mismo estudio propone que las tres principales poblaciones de neuronas GABAérgicas de la corteza, caracterizadas por la distinta expresión de Calretinina, Parvalbúmina y Somatostatina, provienen de regiones específicas del subpallio, lo que sería confirmado en un estudio posterior (Anderson et al., 2001). Así, en el ratón mutante en el gen *Nkx2.1* (que se distingue por una MGE con características propias de la LGE), Pleasure y colaboradores observan una disminución del 50% de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo, que afecta dramáticamente a la población positiva para Somatostatina y NPY, con lo que concluyen que dicho subgrupo de interneuronas inhibitoras en el hipocampo se genera en la MGE (Pleasure et al., 2000).

## **2.3. Desarrollo de las principales conexiones de la formación hipocampal**

### 2.3.1. Descripción general

En ratón, las aferencias entorrinales llegan al hipocampo por primera vez a E15, y empiezan a invadir las capas del hipocampo a E16, formando una densa inervación en la zona marginal externa (futuro estrato lacunosum-moleculare) entre E17 y E19; en el giro dentado, los axones entorrinales aparecen por primera vez a E19 (figura 30) (Super et al., 1998a; Super y Soriano, 1994).

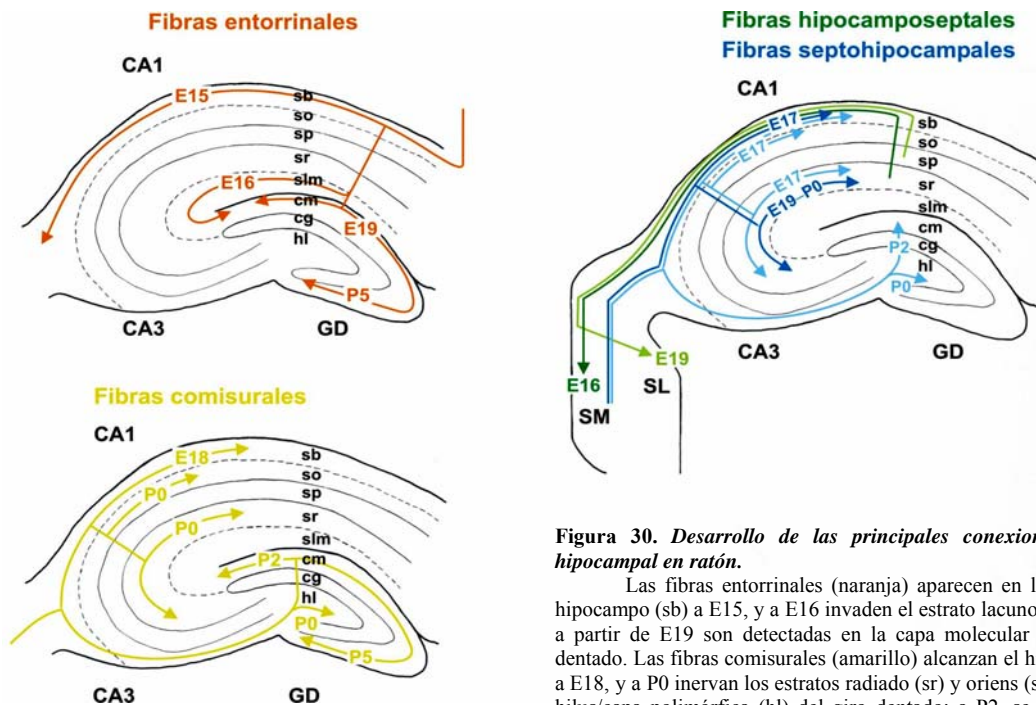


Figura 30. Desarrollo de las principales conexiones de la formación hipocámpal en ratón.

Las fibras entorrinales (naranja) aparecen en la sustancia blanca del hipocampo (sb) a E15, y a E16 invaden el estrato lacunosum-moleculare (slm); a partir de E19 son detectadas en la capa molecular externa (cm) del giro dentado. Las fibras comisurales (amarillo) alcanzan el hipocampo contralateral a E18, y a P0 inervan los estratos radiado (sr) y oriens (so) del hipocampo, y el hilus/capa polimórfica (hl) del giro dentado; a P2, se observan las primeras fibras comisurales invadiendo la capa molecular externa (cm) del giro. Las fibras hipocamposeptales originadas en neuronas GABAérgicas de los estratos oriens y radiado (verde oscuro) llegan al septum a E16 e inervan profusamente el septum medial un día más tarde; estas fibras posiblemente actúen de pioneras dirigiendo a los axones septohipocampales colinérgicos (azul celeste) hacia el hipocampo, invadiéndolo a partir de E17. A E19-P0 se detectan en el hipocampo las primeras fibras septales provenientes de neuronas GABAérgicas (azul oscuro). Por último, la proyección piramidal que termina en el septum lateral (verde claro) se observa por primera vez a E19. CA: región CA del hipocampo. cg: capa granular. cm: capa molecular. GD: giro dentado. hl: hilus. sb: sustancia blanca. slm: estrato lacunosum- molecular. so: estrato oriens. sp: estrato piramidal. sr: estrato radiado (adaptado de Super y Soriano, 1994).

Las primeras fibras hipocámpales que invaden el septum medial a E15 provienen de neuronas piramidales situadas en la subplaca y en la zona marginal; estas neuronas posiblemente actúen de pioneras guiando a los axones septohipocámpales que se originan en el septum medial y alcanzan el hipocampo dos días más tarde, a E17. A partir de P0, las fibras septales empiezan a ramificarse por todas las capas del hipocampo, con cierta preferencia por el estrato oriens y la interfase entre los estratos radiado y lacunosum-moleculare (Soriano et al., 1994). Las primeras fibras septales aferentes corresponden a neuronas colinérgicas, mientras que a partir de P0, fibras septales GABAérgicas invaden el hipocampo. En estadios perinatales, la proyección hipocamposeptal inicial, que termina en el septum medial, se hace menos conspicua, y en cambio empieza a formarse la conexión hipocámpal que termina en el septum lateral, originada en neuronas piramidales. Algunas de las fibras hipocamposeptales pioneras podrían mantenerse en el adulto, ya que a esa edad se ha observado una proyección escasa en el septum medial originada en el hipocampo (figura 30) (Super y Soriano, 1994).

Los axones comisurales/asociacionales originados en la CA3 aparecen por primera vez en el hipocampo contralateral a E18, y más tarde (P0) invaden el alveus, el estrato oriens (o subplaca) y el estrato radiado (o zona marginal interna), formando así la proyección comisural; la proyección asociacional inerva la CA1 ipsilateral a partir de E16-17. En el giro dentado, la proyección comisural/asociacional llega por primera vez al giro dentado contralateral a P2, y a P5 la inervación comisural es ya más densa (figura 30) (Chedotal et al., 1998; Super y Soriano, 1994).

### 2.3.2. Mecanismos implicados

Desde etapas tempranas del desarrollo hipocámpal, se observa una clara segregación laminar de las principales conexiones aferentes; así, las fibras entorrinales inervan, a partir de E16, específicamente en la zona marginal externa, mientras que las fibras comisurales/asociacionales invaden a E18-P0 la

zona marginal interna sin apenas sobrepasar sus límites (Super et al., 1998a). Dicha especificidad de capa que muestran ambos sistemas de fibras aferentes refleja en realidad la invasión de dominios dendríticos independientes en las mismas células piramidales, y coincide con la presencia de dos poblaciones neuronales distintas en la zona marginal del hipocampo, que también se restringen a una capa específica y que por tanto, no se solapan entre ellas: son las células de Cajal-Retzius (CR) en la zona marginal externa, y células GABAérgicas en la zona marginal interna (Soriano et al., 1994; Super et al., 1998a). Ambos tipos neuronales forman parte del conjunto de células pioneras del hipocampo: se posicionan y maduran precozmente, apareciendo en la subplaca y zona marginal del hipocampo a partir de E14, antes que las primeras neuronas piramidales formen la placa hipocampal, y la mayoría de ellas desaparece por muerte celular a partir de P5 (Soriano et al., 1994; Super et al., 1998a). Teniendo además en cuenta que las fibras aferentes entorrinales y comisurales/asociacionales forman contactos sinápticos con células CR y GABAérgicas respectivamente (Super et al., 1998a), y que la presencia de las células CR resulta imprescindible para la correcta formación de la proyección entorrino-hipocampal in vitro (Del Rio et al., 1997), Soriano y colaboradores proponen:

- 1) que las poblaciones de células pioneras en el hipocampo actúen como guías para las fibras aferentes, mediante la síntesis de moléculas que atraen a dichas fibras hasta su capa de destino, produciendo así su segregación laminar temprana;
- 2) que constituyan dianas de sinapsis transitorias, a la espera del completo desarrollo y maduración de las dendritas de las células piramidales, últimas y definitivas estructuras postsinápticas para las aferencias entorrinales y comisurales/asociacionales (Del Rio et al., 1997; Super et al., 1998a).

Sin embargo, un estudio cuestiona el papel de las células GABAérgicas como pioneras en el establecimiento de la conexión comisural: en dicho estudio trazan las principales aferencias de la formación hipocampal en animales genéticamente deficientes en los genes *dlx1/2*, que presentan una completa falta de células GABAérgicas en el hipocampo, y demuestran que tanto la proyección entorrinal como la comisural/asociacional se forman correctamente en ausencia de células GABAérgicas pioneras, terminando de forma separada en los estratos lacunosum-moleculare y radiado respectivamente (Pleasure et al., 2000). Hay que tener en cuenta que en los mutantes *dlx1/2*, la población de células CR continúa en su posición habitual (zona marginal externa-estrato lacunosum-moleculare), y se ha sugerido que las células CR ejercen un efecto inhibitorio sobre fibras comisurales in vivo, restringiéndolas al estrato radiado (Borrell et al., 1999b). Por lo tanto, es posible asumir que las células CR sean las únicas responsables de la segregación laminar de distintas aferencias, atrayendo a fibras entorrinales hacia el estrato lacunosum-moleculare (Del Rio et al., 1997), y al mismo tiempo impidiendo que dicha capa sea anormalmente invadida por axones comisurales, obligándoles a permanecer en el estrato radiado (Borrell et al., 1999b).

Además de la influencia que puedan ejercer células pioneras, también se ha observado que el tejido colindante al hipocampo o al septum ejerce un efecto quimiotáctico sobre axones hipocampales y septales en edades embrionarias y perinatales, periodo en el que las principales aferencias al hipocampo se encuentran en plena formación. Así, la neocorteza y la corteza entorrinal repelen axones hipocampales embrionarios, y dicha acción repulsiva desaparece durante el periodo postnatal; la fimbria, en cambio, atrae axones hipocampales embrionarios (Barallobre et al., 2000; Chedotal et al., 1998; Pozas et al., 2001). Por otra parte, la corteza cingulada y el estriado repelen axones septales embrionarios, mientras que la fimbria los atrae (Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005). En general, se asume que la acción quimiotáctica del tejido sobre las fibras hipocampales y septales en plena migración sirve para impedir la invasión aberrante de regiones vecinas, y al mismo tiempo para empujar a los axones hacia una dirección concreta, obligándoles a abandonar su lugar de origen (Chedotal et al., 1998; Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005).

## **2.4. Factores guía en el desarrollo de la formación hipocampal**

### **2.4.1. Netrina1**

Netrina1 interviene en la proyección de las principales conexiones de la formación hipocampal. La expresión de Netrina1 en la fimbria durante el desarrollo embrionario y postnatal puede in vivo atraer a los axones de CA y del giro dentado, y junto con la repulsión ejercida por la corteza entorrinal y neocorteza probablemente mediante la secreción de Sema3A (ver más arriba), facilitar la salida de los axones de proyección fuera del hipocampo y giro dentado, iniciándose de este modo la trayectoria de las

conexiones comisurales e hipocampo-septales (Barallobre et al., 2000; Steup et al., 2000). La misma acción conjunta de Netrina1 y semaforinas secretables podrían in vivo establecer también la proyección septo-hipocampal, ya que, en etapas embrionarias y postnatales tempranas, Netrina1 expresada en la fimbria atraería axones septales e hipocampales, mientras que la presencia de Sema3A y Sema3F en el septum y regiones colindantes (estriado, corteza cingulada) estimularía, mediante quimiorepulsión, la proyección de las fibras septales hacia el hipocampo, además de impedir la invasión ectópica a lo largo de su trayectoria (Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005).

Una vez iniciada su proyección hacia el hipocampo contralateral, la presencia de Netrina1 en la línea media podría in vivo atraer a las fibras comisurales originadas en la CA3 y facilitar su entrada en el hemisferio contralateral, ya que la ausencia de Netrina1 en el ratón mutante homocigoto impide la formación de la comisura hipocampal (igual que ocurre con otras comisuras, como el cuerpo caloso o la comisura ventral anterior (Serafini et al., 1996)), y produce además la inervación excesiva del septum, fruto de la proyección normal desde la CA1 más la proyección aberrante desde la CA3 (Barallobre et al., 2000). Por último, Netrina1 expresada en el hipocampo y giro dentado interviene in vivo en la correcta especificación laminar de las proyecciones asociacional y entorrinal (Barallobre et al., 2000), y probablemente también en la formación de la proyección musgosa desde el giro dentado a CA3 (Steup et al., 2000).

#### 2.4.2. Semaforinas

Las semaforinas secretables Sema3A y Sema3F, a través de sus respectivos receptores Np1 y Np2, participan en la guía de interneuronas GABAérgicas, desde las eminencias ganglionares hasta la neocorteza y el hipocampo siguiendo rutas tangenciales de migración (Marin et al., 2001; Tamamaki et al., 2003). Las interneuronas derivadas de la MGE son inicialmente distribuidas en dirección a la corteza o al estriado: aquellas destinadas a la corteza expresan Np1 y Np2 y evitan la región del estriado, que expresa Sema3A y Sema3F, mientras que las interneuronas que se incorporan al estriado no expresan neuropilinas (Marin et al., 2001). Las interneuronas que viajan hacia la corteza, a su vez, son redistribuidas entre la placa cortical y la zona intermedia, según si expresan respectivamente Np1 (y responden a Sema3A expresada en la zona ventricular) o Np2 (y son repelidas por Sema3F presente en la placa cortical) (Tamamaki et al., 2003).

La persistente expresión de distintas semaforinas secretables y de sus receptores, neuropilinas y plexinas, en la región hipocampal in vivo durante su desarrollo (Chen et al., 2000a; Chen et al., 1997; Giger et al., 1998b; Giger et al., 1996), ha dado lugar a varios estudios focalizados en la posible acción de las semaforinas en el establecimiento y maduración de las principales conexiones de la formación hipocampal:

- Sema3A, a través de su receptor Np1, es probablemente el factor que confiere a neocorteza y corteza entorrinal la actividad repulsiva que empuja a los axones hipocampales embrionarios hacia la fimbria; así, impiden que los axones hipocampales invadan regiones erróneas y al mismo tiempo les inducen a iniciar su trayectoria hacia regiones diana (Chedotal et al., 1998). El efecto quimiorepulsivo de Sema3A sobre axones entorrinales a edades embrionarias sugiere que Sema3A también podría tener un efecto análogo al que ejerce sobre axones hipocampales: dirigir a los axones entorrinales hacia el hipocampo para iniciar así la vía perforante (Pozas et al., 2001). Además, Sema3A, expresada en el borde subículum/CA1 y en la capa granular del giro dentado, podría influir in vivo en la formación de la vía perforante y de la proyección musgosa del giro dentado mediante la repulsión de sus respectivos axones (Steup et al., 2000; Steup et al., 1999). Sema3A participa in vivo en la correcta especificación de las terminaciones entorrinales en el hipocampo, ya que en el animal deficiente en *Sema3A*, se observan fibras entorrinales ectópicas en el estrato radiado (Pozas et al., 2001).

- Sema3F repele axones hipocampales a edades embrionarias y postnatales; sin embargo, el hecho de que anticuerpos bloqueantes contra Np2 no supriman el efecto quimiorepulsivo que ejerce la corteza entorrinal sobre el hipocampo sugiere que, a diferencia de Sema3A (ver párrafo anterior), Sema3F presente en la corteza entorrinal no dirige a los axones hipocampales hacia la fimbria. Sema3F y Sema3A repelen axones entorrinales postnatales, y sin embargo Sema3F no tiene efecto sobre axones entorrinales embrionarios. El conjunto de datos sugiere que Sema3F probablemente influye sobre axones entorrinales e hipocampales participando en procesos tardíos del desarrollo neuronal, como la especificación de terminación en capa/célula diana o la ramificación axonal (Pozas et al., 2001).

- Sema3C repele axones del septum medial in vitro, y expresada en las capas piramidal del hipocampo y granular del giro dentado su función in vivo podría ser la de restringir a dichos axones a sus regiones de terminación: estratos oriens y radiado en el hipocampo, e hilus en el giro dentado (Steup et al., 2000).
- El efecto repulsivo de Sema3A y Sema3F sobre axones septales embrionarios in vitro posiblemente permite la acción cooperativa de estas dos semaforinas, a través de Np1 y Np2, en impedir in vivo la invasión aberrante de regiones colindantes, además de empujar a los axones del septum medial fuera de la región para así iniciar su trayectoria hacia el hipocampo y otros lugares de destino (Pascual et al., 2004b; Pascual et al., 2005).
- Parece ser que la poda de fibras musgosas es secundaria a la eliminación de sinapsis excesivas propia del proceso de maduración de las conexiones; en el ratón deficiente en *PlexA3*, las sinapsis que deberían ser eliminadas continúan madurando, por lo que el recorte de los terminales correspondientes queda suprimido (Liu et al., 2005).

#### 2.4.3. Slits

Slit1 y 2, así como sus receptores Robo1 y 2, han sido implicados en el desarrollo de la formación hipocampal (Andrews et al., 2006; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999):

- todos ellos se expresan en el hipocampo, el giro dentado y la corteza entorrinal en etapas embrionarias y postnatales tempranas (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999), y tanto el patrón de expresión como el periodo en que se expresan dan a entender que podrían participar en la guía de las principales conexiones de la formación hipocampal;
- Slit2 repele axones de giro dentado embrionarios en el ensayo de explantes en matriz de colágeno (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999); este dato, junto con la expresión de Slits y Robos en el giro dentado durante la etapa embrionaria, refuerza la hipótesis de que dichas proteínas ayudan in vivo a establecer las principales proyecciones del giro dentado;
- la zona marginal del hipocampo y giro dentado expresa Robo2, posiblemente por parte de células de Cajal-Retzius; teniendo en cuenta que en el mismo periodo hay expresión de Slits en la corteza entorrinal, CA y capa granular del giro dentado (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999), Slits podrían tener alguna función sobre las células de Cajal-Retzius (como por ejemplo mantenerlas confinadas en la zona marginal externa);
- se observa una conspicua expresión de Slit2 en la zona ventricular del hipocampo en un periodo de elevada actividad neurogénica de futuras células piramidales (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999), por lo que Slit2 podría influenciar el proceso de división celular o bien en la migración de los precursores postmitóticos fuera del epitelio neurogénico;
- En el ratón deficiente en *Robo1* se observan malformaciones en el cuerpo calloso y la comisura hipocampal, así como un exceso (aproximadamente el doble) de interneuronas en la neocorteza rostral y parietal. Dichos defectos no se observan en el ratón mutante en Slit2 ni en el ratón doble mutante en Slit1 y 2; además, se ha demostrado que la migración tangencial de interneuronas corticales desde el subpallio no depende de Slit1 ni de Slit2 (Marin et al., 2003). Por lo tanto, Robo 1 podría actuar en determinados aspectos del desarrollo transduciendo la señal de un ligando distinto a Slit (Andrews et al., 2006).

#### 2.4.4. Efrinas/Eph

Efrinas y sus receptores eph parecen tener un papel in vivo en la formación de las principales conexiones hipocampales, a juzgar por su patrón de expresión en la formación hipocampal, por datos in vitro sobre su efecto en el crecimiento de axones hipocampales y por el fenotipo de ratones mutantes (Martinez y Soriano, 2005):

- durante el periodo embrionario tardío y postnatal temprano, los receptores EphA3-A7 se expresan en el hipocampo según un gradiente ascendente desde la región lateral hasta la región medial, mientras que sus ligandos EfrinaA2, A3 y A5 forman en el septum lateral un gradiente complementario al de Eph en el hipocampo: ascendente desde la región dorso-medial hasta la región ventral-lateral; la distribución de ambos gradientes coincide con la topografía de la conexión hipocampo-septal (Martinez y Soriano, 2005). In vitro, EfrinaA2, A3 y A5 disminuyen el número de neuritas únicamente en neuronas hipocampales de la región medial (donde más presencia hay de receptores EphA) (Brownlee et al.,

2000), y en el ratón transgénico para una forma dominante negativa del receptor *EphA5*, la terminación de axones hipocamposeptales originados en la región medial del hipocampo se encuentra alterada (Yue et al., 2002). Por otra parte, el hipocampo expresa EphB2 y B3, mientras que el septum lateral produce la proteína EfrinaB3, y en los ratones deficientes en EphB2 y B3, los axones hipocampales que invaden el septum permanecen anómalamente fasciculados (Chen et al., 2004). Por lo tanto, las proteínas eph presentes en axones hipocampales y sus ligandos efrinas expresadas en el septum lateral probablemente funcionen in vivo en la formación de la conexión hipocamposeptal: la clase A de receptores y ligandos en su topografía, y la clase B en su correcta defasciculación al penetrar en la región diana.

- La corteza entorrinal embrionaria expresa receptores EphA, mientras que sus ligandos las efrinas A se localizan en la fracción de las dendritas piramidales y granulares que ocupan el estrato radiado y la capa molecular interna, respectivamente; además, EfrinaA3 inhibe el crecimiento neurítico de neuronas entorrinales in vitro (Martínez y Soriano, 2005; Stein et al., 1999). Todo ello apunta a que el sistema efrinaA/EphA interviene en la formación de la vía perforante, manteniendo restringidas las terminaciones entorrinales en láminas específicas mediante mecanismos repulsivos. Sin embargo, la especificidad laminar de la proyección entorrinohipocampal no se encuentra alterada en el ratón deficiente en *EfrinaA5*, ni tampoco en el ratón transgénico que sobreexpresa una forma soluble de EphA5 (*EphA5-Fc*), diseñado para que todas las interacciones entre efrinas A y Eph A resulten bloqueadas (Martínez et al., 2005; Martínez y Soriano, 2005; Stein et al., 1999).

- En el ratón deficiente en *EfrinaA5*, la proyección comisural del giro dentado termina de forma anómala en todo lo ancho de la capa molecular interna contralateral, cuando en el animal salvaje lo hace ocupando únicamente la parte superior de dicha capa; en el mismo ratón mutante también se observan ectopias en las terminaciones de la proyección comisural del hipocampo propio, aunque resultan temporales y son posteriormente corregidas (Martínez y Soriano, 2005). Parece que *EfrinaA5* podría estar relacionada con el correcto establecimiento de las conexiones comisurales del hipocampo y giro dentado; curiosamente, el ratón transgénico en el que todas las interacciones entre efrinas A y Eph A están inhibidas no muestra alteraciones en cuanto a la especificidad laminar de la vía perforante ni de las conexiones comisurales (Martínez et al., 2005).

Efrinas y receptores eph de las clases A y B han sido relacionadas con el proceso de sinaptogénesis en el hipocampo, ya sea por datos in vitro, en los que se observa la promoción o retracción de espinas en neuronas hipocampales tras la aplicación de efrinas, o bien por los fenotipos de distintos ratones mutantes, que muestran un número de sinapsis disminuido en varias conexiones de la formación hipocampal (Martínez y Soriano, 2005). De forma análoga a lo que ocurre en el ratón deficiente en *PlexA3* (Liu et al., 2005), el ratón transgénico con la supresión funcional de las interacciones entre efrinas y Eph clase A muestra un exceso de terminaciones y de contactos sinápticos en la parte infrapiramidal de la proyección musgosa, lo que hace que posteriormente no tenga lugar el proceso de poda axonal (Martínez et al., 2005).

Varios estudios muestran la expresión diferencial de efrinas y receptores eph en el hipocampo adulto, además de la acción de efrinas/eph en diversos procesos relacionados con maduración sináptica y plasticidad: pueden, por ejemplo, modular la función sináptica mediante cambios en el transporte o agrupación de vesículas sinápticas, la agrupación de receptores de neurotransmisor, la alteración de la estabilidad de las sinapsis debida a cambios en el citoesqueleto neuronal, o la regulación de la actividad de receptores NMDA. Efrinas/eph también pueden regular el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo tanto in vitro como in vivo (Martínez y Soriano, 2005)

#### 2.4.5. Reelina

En el hipocampo en desarrollo, Reelina se expresa en células CR, situadas en la zona marginal externa/futuro estrato lacunosum-moleculare (Soriano et al., 1994), y en células GABAérgicas dispersas por todas las capas hipocampales aunque con tendencia a concentrarse en el estrato oriens y en el hilus (Alcantara et al., 1998); en el hipocampo adulto, la mayor parte de la expresión de Reelina se encuentra en una fracción de células GABAérgicas localizadas mayoritariamente en el estrato oriens, en el hilus y en la capa granular del giro dentado, aunque también se observa expresión de Reelina en células CR supervivientes presentes en el estrato lacunosum-moleculare (Alcantara et al., 1998; Pesold et al., 1998). Al igual que en la corteza y el cerebelo, el animal reeler presenta defectos de migración en el hipocampo

y giro dentado: las neuronas piramidales y granulares se encuentran esparcidas, sin formar capas compactas y definidas (D'Arcangelo y Curran, 1998).

La presencia de Reelina durante el periodo embrionario y postnatal influye en la correcta formación de conexiones en el hipocampo, aunque no parece intervenir en la guía de sus fibras. Así, la falta de Reelina en el ratón reeler no impide la llegada de fibras entorrinales y comisurales a sus capas de destino habituales (el estrato lacunosum-moleculare y la capa molecular externa del giro para la proyección entorrinal, y los estratos oriens y radiado, junto con la capa molecular interna del giro dentado para los axones comisurales), aunque sí produce anomalías que incluyen, en la proyección entorrinal, menor inervación, menor extensión y ramificación axonal y mayor número de fibras ectópicas, así como la invasión aberrante de capas incorrectas en las proyecciones entorrinal y comisural (Borrell et al., 1999a; Borrell et al., 1999b; Del Rio et al., 1997). La proyección septohipocampal, al igual que la entorrinal y comisural, también conserva la especificidad de terminación en el ratón reeler, en el que el componente GABAérgico inerva somas de interneuronas y el componente colinérgico termina en neuronas piramidales de forma similar al animal salvaje; sin embargo, se observa en el animal reeler la invasión aberrante de la región cercana a la fisura hipocampal por parte de fibras GABAérgicas y colinérgicas septales, probablemente un defecto secundario debido a que la incorrecta escisión de la preplaca cortical e hipocampal en ausencia de Reelina produce la anómala acumulación, cerca de la fisura hipocampal, de células normalmente destinadas a la subplaca, entre las que se encuentran interneuronas diana de los axones septales GABAérgicos (Pascual et al., 2004a).

En el hipocampo, al igual que en la corteza, Reelina es determinante en el correcto posicionamiento de neuronas tanto piramidales como GABAérgicas (Nakajima et al., 1997; Pascual et al., 2004a; Yabut et al., 2005), y también actúa sobre los procesos neuríticos de ambos tipos neuronales, aunque parece que de forma antagónica: la inhibición funcional de Reelina *in vivo* e *in vitro* produce un exceso de ramificación neurítica en interneuronas GABAérgicas corticales (Yabut et al., 2005), y un desarrollo anómalo e incompleto de las dendritas piramidales del hipocampo (Niu et al., 2004). Reelina también estimula la maduración sináptica de neuronas hipocampales (Sinagra et al., 2005), y en el animal reeler se observa un menor número de contactos sinápticos por parte de las fibras entorrinales en el hipocampo *in vivo* e *in vitro* (Borrell et al., 1999a; Del Rio et al., 1997).

La expresión de Reelina en el hipocampo adulto, localizada mayoritariamente en interneuronas GABAérgicas (Alcantara et al., 1998), junto con el hallazgo de deficiencias en varios procesos neurológicos hipocampales en el ratón reeler heterocigoto, como memoria, aprendizaje, plasticidad a largo plazo e inhibición sináptica funcional (Qiu et al., 2005), han relacionado a Reelina con enfermedades como Alzheimer, esquizofrenia o trastornos bipolares, caracterizadas por alteraciones en procesos cognitivos o conductuales. Así, Reelina modula la actividad sináptica del hipocampo del ratón adulto a través de sus receptores VLDLR y ApoER2, y podría estar implicada en la disfunción cognitiva típica de la enfermedad de Alzheimer, ya que se ha demostrado que la isoforma ApoE4, ligando de ApoER2, está genéticamente ligada a la forma tardía de dicha enfermedad (Weeber et al., 2002). De hecho, un reciente estudio demuestra que la isoforma larga de ApoER2 (contiene el exón 19, sensible a *splicing* alternativo) forma parte del complejo receptor NMDA presente en el elemento postsináptico de sinapsis excitadoras, y que la unión de Reelina a su receptor provoca la fosforilación y consiguiente activación de receptores NMDA, lo que representa la demostración del efecto de Reelina en la función sináptica, y por tanto, en procesos de plasticidad y memoria en el hipocampo (Beffert et al., 2005). Por otra parte, el ratón reeler heterocigoto (haploinsuficiente para el gen de Reelina) comparte características morfológicas y bioquímicas con pacientes que sufren esquizofrenia y otras enfermedades bipolares, incluyendo la disminución de los niveles de mRNA y proteína Reelina en la formación hipocampal (Fatemi et al., 2000) o la disminución del número de espinas dendríticas en neuronas corticales e hipocampales (Pappas et al., 2001).

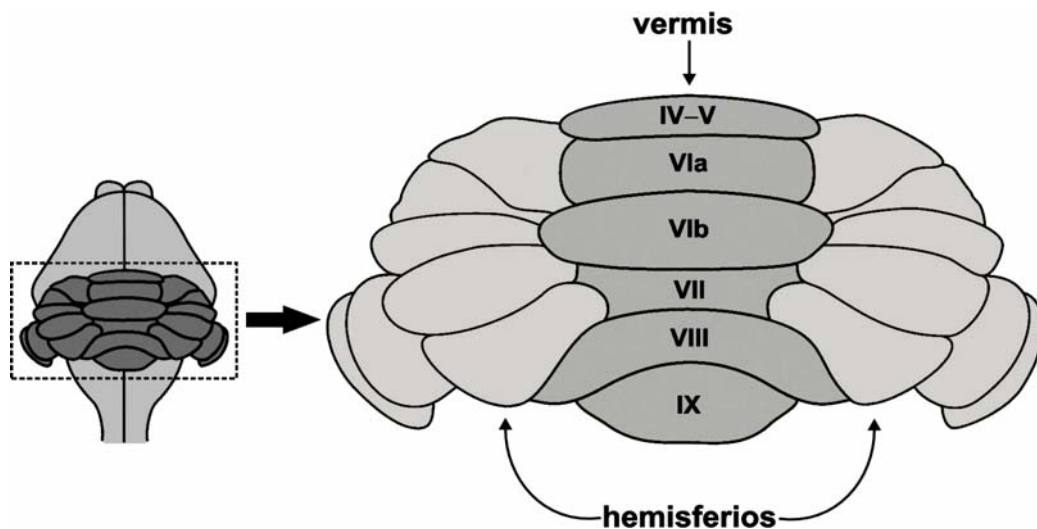
## IV. EL CEREBELO

### 1. EL CEREBELO ADULTO

#### 1.1. Organización anatómica

El cerebelo está formado por tres regiones:

- *la corteza del cerebelo*, que corresponde a la capa de materia gris más externa, es la región donde terminan las conexiones de entrada al cerebelo y donde se originan sus conexiones de salida;
- *la sustancia blanca*, situada por debajo la corteza y zona de tránsito de axones mielinizados aferentes y eferentes;
- *los núcleos cerebelares profundos*, localizados en la sustancia blanca del cerebelo, en el techo del 4º ventrículo, que reciben la conexión de parte de la corteza cerebelar y a su vez establecen la conexión de salida del cerebelo. Hay tres pares de núcleos profundos: fastigial, interpósito (compuesto a su vez por los núcleos globoso y emboliforme) y dentado (Kandel et al., 1993).



**Figura 31. Vista dorsal del cerebelo de ratón.**

Se puede observar la organización longitudinal o sagital del cerebelo, que distingue una zona central llamada vermis y dos regiones laterales o hemisferios. Los números romanos indican los lobulillos transversales visibles dorsalmente.

Las conexiones de entrada y salida del cerebelo discurren a través de tres pares de vías simétricas, que conectan al cerebelo con el tronco del encéfalo: son conocidas como pedúnculos cerebelares, y constan del *pedúnculo inferior* (o cuerpo restiforme), *pedúnculo medial* (o brachium pontis), y *pedúnculo superior* (o brachium conjunctivum). La mayoría de las fibras que contiene el pedúnculo superior cruzan la línea media a través de la comisura cerebelar (Kandel et al., 1993).

#### 1.1.1. Organización transversal o coronal

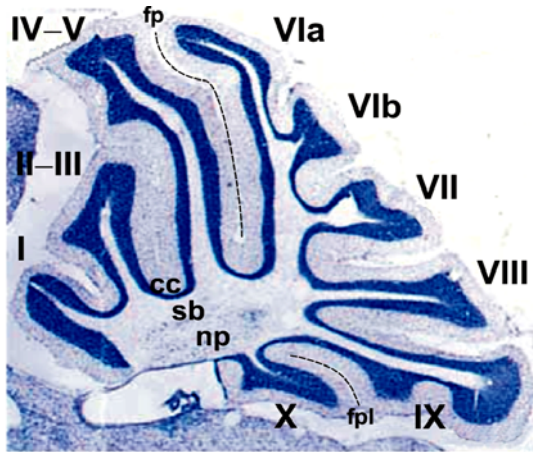
La principal característica anatómica del cerebelo es el conjunto de pliegues transversales que lo atraviesan desde un lateral al otro, y que se agrupan en tres grandes lóbulos separados por fisuras transversales (Kandel et al., 1993):

- *el lóbulo flocculonodular*, en la parte caudal del cerebelo, se le llama arquicerebelo por ser la región filogenéticamente más antigua;
- *el lóbulo anterior*, en la parte rostral del cerebelo, es conocido como paleocerebelo por ser evolutivamente de aparición más reciente que el arquicerebelo;
- *el lóbulo posterior*, situado entre los dos anteriores y separado del lóbulo anterior por la fisura primaria, y del flocculonodular por la fisura posterolateral. También llamado neocerebelo, es el lóbulo de



aparición filogenética más reciente. Junto con el lóbulo anterior, ambos están subdivididos mediante fisuras superficiales en distintos lobulillos, cada uno de ellos con un nombre distinto (figura 32).

### 1.1.2. Organización longitudinal o sagital



**Figura 32. Organización histológica del cerebelo.**

Sección parasagital del cerebelo de ratón adulto, teñido mediante la técnica de Nissl, que muestra los distintos lobulillos transversales (designados con numeración romana), las fisuras transversales (fisura primaria y posterolateral, líneas discontinuas), los núcleos profundos, la sustancia blanca y la corteza cerebelar. Anterior es a la izquierda. cc: corteza cerebelar. fp: fisura primaria. fpl: fisura posterolateral. np: núcleos profundos. sb: sustancia blanca.

El cerebelo también presenta distintas regiones longitudinales, separadas por dos surcos: una banda central que constituye el vermis, y dos hemisferios cerebelares situados a cada lado (figura 31); cada hemisferio a su vez se divide en una parte intermedia, al lado del vermis, y una parte lateral. Estas tres regiones longitudinales, vermis, hemisferio intermedio y hemisferio lateral, representan divisiones funcionales que establecen conexiones distintas (Kandel et al., 1993):

- el vermis conecta con el núcleo fastigial y éste a su vez con regiones de la corteza cerebral y del puente del encéfalo que da lugar a las vías motoras descendentes mediales, por lo que controla la musculatura proximal.
- La zona intermedia de los hemisferios proyecta a través del núcleo interpósito con las vías motoras descendentes laterales, controlando la musculatura de las extremidades.
- La zona lateral de ambos hemisferios conecta con el núcleo dentado y de ahí con regiones motoras y premotoras de la corteza cerebral, relacionadas con la planificación de movimientos voluntarios.

## 1.2. Organización funcional

A nivel funcional, el cerebelo presenta tres grandes áreas, cada una de ellas con conexiones principales de entrada y salida específicas (Kandel et al., 1993):

- *el cerebelo vestibular* corresponde al lóbulo floculonodular. Recibe la proyección de los núcleos vestibulares del bulbo raquídeo (situados rostral y ventralmente respecto a los núcleos profundos), y proyecta directamente de vuelta a los núcleos vestibulares. En humanos, el cerebelo vestibular controla el movimiento ocular y el equilibrio corporal postural y en movimiento.
- *El cerebelo espinal* incluye el vermis y la zona intermedia de los hemisferios. Recibe información sensorial de la periferia mediante su principal conexión, originada en la médula espinal, los núcleos de la columna dorsal y los núcleos de la formación reticular en el bulbo raquídeo; regula, a través de la proyección a los núcleos fastigial e interpósito, los componentes lateral y medial de las vías motoras descendentes, controlando así el movimiento de las extremidades. El cerebelo espinal se encarga del ajuste de los movimientos y del mantenimiento del tono muscular postural.
- *El cerebelo cerebral* corresponde a la región lateral de ambos hemisferios. Su entrada proviene exclusivamente de los núcleos pontinos en el bulbo raquídeo, los cuales le aportan información desde la corteza cerebral, y su proyección pasa a través del núcleo dentado hasta el tálamo y de ahí a la corteza cerebral motora y premotora, por lo que participa en la planificación e iniciación del movimiento.

### 1.3.1. Aferencias a la corteza cerebelar

La corteza cerebelar recibe dos principales aferencias excitadoras (Kandel et al., 1993):

- las conexiones de entrada de las tres grandes regiones funcionales del cerebelo (descritas en el párrafo anterior) terminan en forma de fibras musgosas en la corteza del cerebelo. Las fibras musgosas representan la principal aferencia excitadora, y contactan con las células de Purkinje de forma indirecta, a través de las células granulares.

– La oliva inferior del bulbo raquídeo envía conexiones hacia la corteza cerebelar, que terminan en sinapsis excitadoras directas con las células de Purkinje; se las conoce como fibras trepadoras porque a medida que ascienden por la corteza, envuelven el soma y las dendritas de las células de Purkinje. Las fibras trepadoras, que terminan en las tres áreas funcionales del cerebelo, están implicadas en el aprendizaje de habilidades motoras, mediante la modulación de la conexión de las fibras musgosas con las células de Purkinje.

Fibras musgosas y trepadoras envían axones colaterales hacia los núcleos cerebelares profundos, que establecen la proyección de salida del cerebelo; dichos colaterales excitadores forman el circuito cerebelar primario, y éste resulta posteriormente modulado por la corteza cerebelar, mediante la conexión inhibitoria que realizan los axones de las células de Purkinje con los núcleos profundos.

### **1.3. Histología y conexiones de la corteza cerebelar**

Se distinguen tres capas en la corteza cerebelar adulta: la capa molecular, la capa de células de Purkinje y la capa granular. La mayoría de células que componen el corteza del cerebelo disponen sus arborizaciones dendríticas o axonales de dos modos: paralelos al eje largo de la folia o a las fisuras transversales (o sea, en el plano coronal), o perpendiculares al eje largo de la folia o paralelos a la línea media (o sea, en el plano parasagital) (figura 34) (Nieuwenhuys et al., 1998).

#### 1.3.1. Neuronas y sus conexiones en la capa molecular

La capa molecular es la más superficial de la corteza cerebelar, y en ella existen dos tipos de neuronas, ambas interneuronas GABAérgicas: las células estrelladas, situadas en la superficie de la capa molecular, y las células en cesto situadas en zonas profundas de la capa molecular. Ambas tienen arborizaciones dendríticas y axonales orientadas en el plano parasagital (igual que el árbol dendrítico de las células de Purkinje). El axón de las células estrelladas termina en dendritas proximales lisas de las células de Purkinje, mientras que las células en cesto tienen un axón arborizado que rodea el soma de la célula de Purkinje como si fuera un cesto, y forma sinapsis axosomáticas. Las dendritas de ambos tipos celulares reciben la conexión de las fibras paralelas de las células granulares (ver más abajo y figura 33) (Nieuwenhuys et al., 1998).

#### 1.3.2. Células de Purkinje y sus conexiones

Las células de Purkinje tienen un soma de gran tamaño formando una monocapa entre la capa molecular superficial y la capa granular interna. El denso árbol dendrítico de las células de Purkinje se extiende por toda la capa molecular y se ubica en el plano parasagital. El axón de las células de Purkinje abandona la corteza y establece contactos GABAérgicos con células de los núcleos cerebelares, siendo ésta la única conexión de salida de la corteza. Las células de Purkinje reciben dos aferencias distintas que terminan en distintos compartimientos de su árbol dendrítico: las fibras paralelas procedentes de las células granulares en la capa granular (ver más abajo), y las fibras trepadoras, que tienen su origen en la oliva inferior contralateral, situada en el bulbo raquídeo (figura 33). Cada célula de Purkinje recibe la conexión de una única fibra trepadora, y sus terminales sinapsan con espinas de dendritas proximales. Las fibras paralelas contactan con espinas situadas en las ramificaciones de las dendritas distales. Ambas aferencias son excitadoras y glutamatérgicas (Nieuwenhuys et al., 1998).

#### 1.3.3. Neuronas y sus conexiones en la capa granular

**Células granulares.** Situadas en la capa granular (por debajo de la capa de Purkinje) son pequeñas y redondas. Emiten cuatro o cinco dendritas terminadas en forma de zarpa (*claw-like*) que quedan recluidas en la capa granular, y su axón asciende siguiendo una trayectoria vertical hacia la capa molecular, donde se divide en dos ramas, llamadas fibras paralelas, que recorren considerables distancias de forma paralela a la superficie pial. Tanto la parte ascendiente del axón como las fibras paralelas muestran pequeñas varicosidades, que son puntos de sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje o de las interneuronas de la capa molecular. Las células granulares reciben la conexión de las fibras musgosas, que terminan en complejas sinapsis en las dendritas de las células granulares formando los glomérulos (figura 33). Las fibras musgosas, que tienen su origen principalmente en distintos

núcleos de la médula espinal y del tronco del encéfalo, se ramifican extensamente en la sustancia blanca del cerebelo, y sus ramas terminales, acabadas en complejos botones que forman parte del glomérulo, se orientan principalmente en el plano parasagital. Los glomérulos se sitúan por toda la capa granular, en los espacios vacíos entre células granulares (Nieuwenhuys et al., 1998).

**Células grandes de la capa granular.** El término “células grandes” se utiliza para diferenciar a las células granulares, que tienen un soma pequeño y son excitadoras (con el glutamato como neurotransmisor), del resto de neuronas, que en general poseen un soma de mayor tamaño y son inhibitoras.

– **Células de Golgi.** Representan otro tipo de interneurona GABAérgica, con su soma situado en la capa granular, que extiende su árbol dendrítico por todas direcciones en la capa molecular (figura 33). El axón cursa una trayectoria inicial en el plano coronal, para luego terminar en un denso plexo en la capa granular, y contactar con las dendritas de las células granulares en la periferia de los glomérulos (Nieuwenhuys et al., 1998). Las dendritas de las células de Golgi reciben la conexión de las fibras paralelas, por lo que proporciona una retroalimentación inhibitora a las células granulares (Wang y Zoghbi, 2001).

– **Células de Lugaro.** Son interneuronas GABAérgicas con un soma fusiforme localizado en la interfase entre la capa granular y la capa de Purkinje. Del soma emergen dendritas poco ramificadas que se extienden horizontalmente en el plano parasagital por debajo de las células de Purkinje, y el axón forma dos tipos de proyecciones en la capa molecular: una proyección proximal densa en el plano parasagital que establece contactos inhibitorios con células estrelladas y en cesto, y una proyección distal poco ramificada en el plano coronal o transversal que forma sinapsis GABAérgicas con dendritas de células de Golgi, así como con el soma y las dendritas proximales de las células estrelladas y en cesto (Laine y Axelrad, 1998). Como aferencias reciben numerosas sinapsis de colaterales axonales de las células de Purkinje, y al igual que las células granulares y sus fibras paralelas, contienen un nivel elevado de Calretinina citoplasmática. Por lo tanto, las células de Lugaro se pueden considerar interneuronas inhibitoras encargadas de regular la actividad de otras interneuronas inhibitoras (Laine y Axelrad, 2002). Existe otro tipo de interneuronas GABAérgicas recientemente definido: las células globulares. Representan un subgrupo dentro de las células de Lugaro, y ambas son similares en cuanto a localización, conexiones axonales establecidas, aferencias recibidas e inmunoreactividad contra Calretinina, pero difieren en su árbol dendrítico, siendo el de las células globulares más parecido al de las células de Golgi (Laine y Axelrad, 2002).

– **Células en candelabro.** Recientemente Lainé y Axelrad descubrieron mediante impregnación de plata una nueva interneurona, con el soma situado entre los de las células de Purkinje, y dos árboles dendríticos: uno de ellos se extiende por toda la capa molecular y el otro queda restringido a la zona superior de la capa granular. La característica principal de este tipo celular es el axón, que se ramifica y se distribuye por la capa molecular adoptando la forma de un candelabro; de ahí que fueran bautizadas como células en candelabro (Laine y Axelrad, 1994). Son positivas para GAD, al igual que el resto de “grandes neuronas” de la capa granular del cerebelo (Flace et al., 2004). Por la distribución de sus colaterales axónicas, parece ser un tipo de interneurona que inhibe a otras interneuronas presentes en la capa molecular, similar a la célula de Lugaro (Flace et al., 2004).

- **Células en cepillo.** Fue identificada a finales de los años 80 en la corteza cerebelar de diversos mamíferos. Posee un soma de medio tamaño localizado en la capa granular, y se caracteriza por tener una única dendrita que en su extremo se ramifica en forma de cepillo, y que sinapsa con terminales de fibras musgosas; el axón se extiende tortuosamente por la capa granular, y específicamente a través de engrosamientos en forma de roseta, establece contactos excitadores (a diferencia del resto de “células grandes”) con dendritas de células granulares y de otras células en cepillo. Al igual que las células granulares, muestran una elevada expresión de Calretinina, y se distribuyen principalmente por el cerebelo vestibular (lóbulo floculonodular) (Berthie y Axelrad, 1994; Laine y Axelrad, 2002; Nieuwenhuys et al., 1998).

### 1.3.4. Células de la glia

En el cerebelo existen varios tipos de células gliales, distribuidas por todas las capas de la corteza y por la sustancia blanca: los astrocitos velados, cuyos procesos ramificados le dan forma estrellada, es muy común en la capa granular; los astrocitos lisos, menos comunes que los anteriores y situados tanto en la capa granular como en la molecular, tienen procesos largos y radiales respecto al soma, sin apéndices laminares; los astrocitos fibrosos, típicos de la sustancia blanca, emiten procesos no muy largos pero profusamente ramificados; los oligodendrocitos, presentes principalmente en la sustancia blanca, forman varios procesos que corresponden a vainas de mielina y que recorren largas distancias siempre alineados con axones (Yamada y Watanabe, 2002; Zhang y Goldman, 1996b).

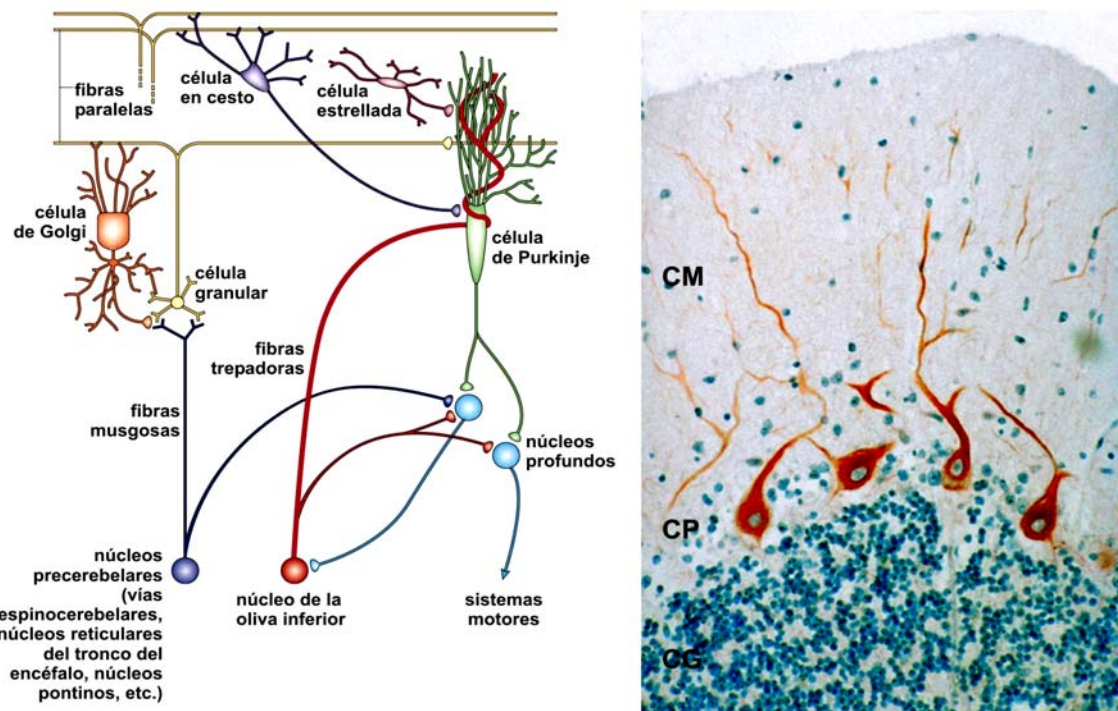


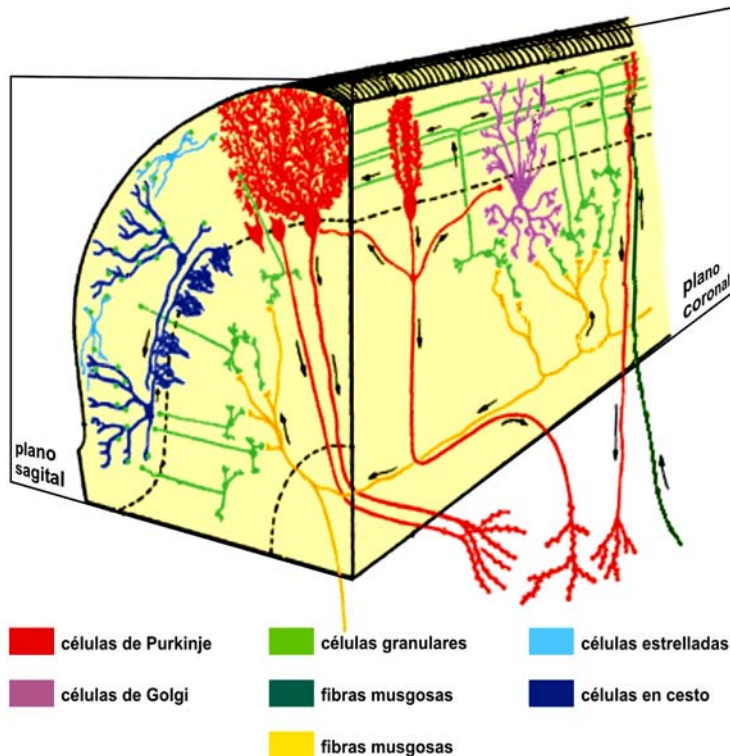
Figura 33. Tipos neuronales en el cerebelo.

**Izquierda:** esquema que representa los principales tipos neuronales del cerebelo y sus conexiones extrínsecas (fibras trepadoras, fibras musgosas) y locales (fibras paralelas, conexiones de células estrelladas, en cesto y de Golgi) (adaptado de Wang y Zoghbi, 2001).

**Derecha:** sección coronal del cerebelo de ratón, procesada mediante una combinación de inmunocitoquímica contra Neurofilamento (que marca el citoplasma de las células de Purkinje en marrón) y de tinción histoquímica nuclear (azul). CG: capa granular. CP: capa de células de Purkinje. CM: capa molecular.

**Glia de Bergmann.** Pero el tipo de célula glial que más repercusión tiene en el cerebelo (tanto durante su desarrollo como en su citoarquitectura y fisiología adulta) es la glia de Bergmann. Está compuesta por astrocitos unipolares con el cuerpo celular localizado en la capa de células de Purkinje, que extienden prolongaciones hasta la superficie pial atravesando toda la capa molecular y, durante el desarrollo, también la capa granular externa. Estos procesos se conocen como fibras de Bergmann. Por cada célula de Purkinje hay aproximadamente ocho células de Bergmann, y sus fibras se sitúan en el plano perpendicular al de las dendritas de Purkinje. Cada célula de Bergmann da lugar a varias fibras de Bergmann, que ascienden en forma de varas rectas y emiten numerosos apéndices o excrecencias laterales por el camino; a partir de estos apéndices se genera una red de procesos gliales, provenientes de distintas células de Bergmann, que envuelven totalmente los árboles dendríticos de las células de Purkinje por toda la extensión de la capa molecular. La unidad más pequeña de esta red glial es conocida como microdominio glial de Bergmann, y está compuesta por una protuberancia en forma de calabaza, que envuelve varias sinapsis entre los terminales de las fibras paralelas y las espinas dendríticas de las células de Purkinje, y una pequeña prolongación que conecta la protuberancia al tallo de la fibra de Bergmann (Yamada y Watanabe, 2002).

Esta íntima asociación estructural entre la glia de Bergmann y las células de Purkinje tiene repercusión a nivel funcional. Por ejemplo, la estimulación por parte de las fibras paralelas produce en las regiones de las fibras de Bergmann que forman los microdominios un aumento del nivel de  $Ca^{+2}$ , regulando así la transmisión sináptica. La glia de Bergmann también puede influir en la sinapsis mediante el intercambio de metabolitos, como la recaptación de glutamato o la secreción de cofactores de neurotransmisores. Otros factores secretados por células astrocíticas como la glia de Bergmann estimulan la supervivencia de las células de Purkinje, así como el crecimiento dendrítico y el desarrollo de espinas (Yamada y Watanabe, 2002).



**Figura 34.** Disposición tridimensional de la corteza cerebelar.

Las células de la corteza cerebelar disponen sus sistemas dendríticos y axonales según dos planos perpendiculares entre sí: las células de Purkinje (rojo) y las interneuronas de la capa molecular (células estrelladas y en cesto, azul celeste y oscuro respectivamente) se sitúan en el plano sagital, mientras que las fibras paralelas corren a través del plano coronal; las células de Golgi extienden sus dendritas en todas direcciones. Las flechas indican la dirección de las proyecciones (aférentes/eférentes)

#### **1.4. Histología de los núcleos profundos**

En los núcleos cerebelares profundos se distinguen varias poblaciones celulares, según el tamaño del soma, el neurotransmisor expresado y la distribución de sus axones (Nieuwenhuys et al., 1998; Sultan et al., 2002):

- la población de neuronas principales, supuestamente glutamatérgicas y de tamaño grande o medio, son consideradas neuronas de relevo o repetidoras y envían sus axones al tálamo y a otros núcleos motores del tronco del encéfalo;

- una población de neuronas similar en número a la de neuronas principales, tienen un soma pequeño, expresan GABA y en su mayoría proyectan a la oliva inferior; en parte de dicha población colocan los neurotransmisores inhibidores GABA y glicina, y está formada por neuronas de proyección local (interneuronas).

### **1.5. La compartimentalización del cerebelo**

#### **1.5.1. Compartimientos sagitales**

La conexión eferente del cerebelo (proyección cortico-nuclear) se organiza en un patrón específico de bandas longitudinales paralelas a la línea media, de manera que las células de Purkinje pertenecientes a una banda, o a un par de bandas no contiguas, proyectan a un mismo núcleo cerebelar o vestibular. El patrón de bandas o compartimientos longitudinales muestra simetría bilateral, y algunas de las bandas ocupan unos pocos lobulillos, mientras que otras se extienden por toda la longitud del eje rostro-caudal (Voogd y Glickstein, 1998).

Durante el primer periodo del desarrollo del cerebelo, y antes de la aparición de las fisuras transversales, las células de Purkinje en la incipiente placa cortical se agrupan en varias zonas orientadas

longitudinalmente y localizadas debajo de la capa granular externa. Más tarde, la aparición de las fisuras transversales que dividen el cerebelo en lóbulos y lobulillos, así como la migración de las células granulares hacia el interior para formar la capa granular, producen un gran aumento del tamaño de la corteza cerebelar, así como la desaparición de los grupos de células de Purkinje, que pasan a formar una capa con sus somas alineados. Se consideran estos grupos de células de Purkinje como los precedentes de las bandas longitudinales en el cerebelo adulto (Nieuwenhuys et al., 1998).

Las aferencias al cerebelo también se organizan siguiendo bandas longitudinales o sagitales. Así, respecto a la proyección olivo-cerebelar (cuyos terminales forman las fibras trepadoras) determinadas regiones de la oliva inferior proyectan a una única banda sagital de células de Purkinje, o bien a un par de bandas no contiguas que tienen como diana el mismo núcleo cerebelar, y estas mismas regiones olivares envían colaterales al núcleo cerebelar correspondiente (Voogd y Glickstein, 1998).

Por lo tanto, la conexión eferente del cerebelo se organiza de manera modular, siendo un módulo una o varias bandas longitudinales de células de Purkinje, su correspondiente núcleo cerebelar o vestibular, y su correspondiente sistema aferente de fibras trepadoras (conexión olivo-cerebelar). Las fibras pertenecientes a módulos contiguos no se solapan (Nieuwenhuys et al., 1998).

Las fibras musgosas espino-cerebelares, reticulo-cerebelares y ponto-cerebelares distribuyen sus terminales en agregados longitudinales, topográficamente relacionados con las bandas longitudinales de células de Purkinje que forman los módulos de salida mencionados en el anterior párrafo (Herrup y Kuemerle, 1997; Nieuwenhuys et al., 1998). Los agregados longitudinales de fibras musgosas originadas en distintas regiones pueden alternarse, o bien solaparse (Nieuwenhuys et al., 1998).

La estructura anatómica del cerebelo adulto no muestra la presencia de bandas longitudinales. Sin embargo, mediante métodos de tinción adecuados, se pueden apreciar los módulos longitudinales en la sustancia blanca, que contiene los axones de las células de Purkinje y sus correspondientes aferencias trepadoras y núcleos cerebelares. Además, se ha observado que distintas proteínas expresadas por las células de Purkinje o por la glía de Bergmann se distribuyen en el cerebelo adulto siguiendo un patrón de bandas longitudinales que se corresponden con los módulos de eferencias y aferencias trepadoras, aunque la relación entre ambas no es estricta. Entre el conjunto de marcadores moleculares que atestiguan la división longitudinal de la corteza cerebelar adulta están el enzima 5'-nucleotidasa (presente en la glía de Bergmann) y los estudiados de forma más extensiva: las zebrinas (Herrup y Kuemerle, 1997; Nieuwenhuys et al., 1998; Voogd y Glickstein, 1998). También existen patrones longitudinales de expresión de determinados genes que son momentáneos durante el desarrollo del cerebelo, y que en la edad adulta no se perciben, ya sea porque hayan desaparecido totalmente o porque su expresión sea uniforme; entre estos genes se encuentran varios homólogos de genes de segmentación en *Drosophila*, como *Engrailed* (*En1* y *2*), *Pax2* o *Wingless* (*Wnt*), los cuales muestran una expresión en distintas bandas sagitales durante el desarrollo embrionario (Herrup y Kuemerle, 1997).

### 1.5.2. Compartimientos transversales

Existen evidencias que apuntan a la presencia de límites que demarcan compartimientos a lo largo del eje rostro-caudal del cerebelo, de forma similar a lo que ocurre en el plano sagital (comentado en el anterior apartado). Estos compartimientos transversales coinciden aproximadamente con las tres regiones del cerebelo separadas por las dos grandes fisuras transversales (fisura primaria, fisura posterolateral; ver más arriba), y que corresponden a tres regiones de distinta edad evolutiva (Herrup y Kuemerle, 1997):

- el límite entre la región anterior y posterior del cerebelo, marcado anatómicamente mediante la fisura primaria, se podría situar en el lado anterior del lobulillo VI. Esta hipótesis se basa en varias evidencias, como por ejemplo, la existencia de tres animales mutantes: los ratones *meandertail* y *leaner*, ambos con la región anterior del cerebelo alterada pero las regiones posterior y floculonodular normales, y el ratón mutante en el gen *Engrailed2* (*En2*), cuyo cerebelo presenta anomalías en la región posterior, mientras que las regiones anterior y floculonodular son normales. Además, la expresión en el adulto de los antígenos Hsk1 y TH, así como la expresión transitoria de los genes *En2* y *Wnt7B* durante la etapa postnatal joven, apoyan la hipótesis de que el lóbulo VI actúe de límite entre dos compartimientos transversales. Por último, dicho límite coincide con la frontera entre la parte del cerebelo que tiene un origen mesencefálico (región rostral respecto al lobulillo VI) y el cerebelo de origen metencefálico (región caudal respecto al lobulillo VI).

– El límite entre la región posterior y la región floclonodular se podría situar en el lado posterior del lobulillo IX, coincidiendo con la frontera anatómica: la fisura posterolateral. Entre ambos putativos compartimientos existen diferencias funcionales evidentes (ver más arriba), además de diferencias en el patrón de expresión de los genes *L7* y *En2*. Además, la alteración citoarquitectónica del cerebelo en el ratón mutante *En2* termina caudalmente en ese límite, y no afecta a la región floclonodular.

## 2. DESARROLLO DEL CEREBELO

### 2.1. Especificación territorial del cerebelo en el tubo neural: el organizador ístmico

Durante la formación del tubo neural aparecen en su parte anterior las tres vesículas primordiales, las vesículas prosencefálica, mesencefálica y romboencefálica, que darán lugar a todo el conjunto del encéfalo. Tradicionalmente se ha situado el origen del cerebelo en el romboencéfalo, y concretamente en la zona dorsolateral del metencéfalo, que compone la porción anterior de la vesícula romboencefálica. Se postula que a partir de sus dos placas alares se genera el cerebelo de forma bilateral, y posteriormente se fusiona a nivel de la línea media dorsal y en dirección rostrocaudal para formar así un único primordio cerebelar (Sotelo, 2004).

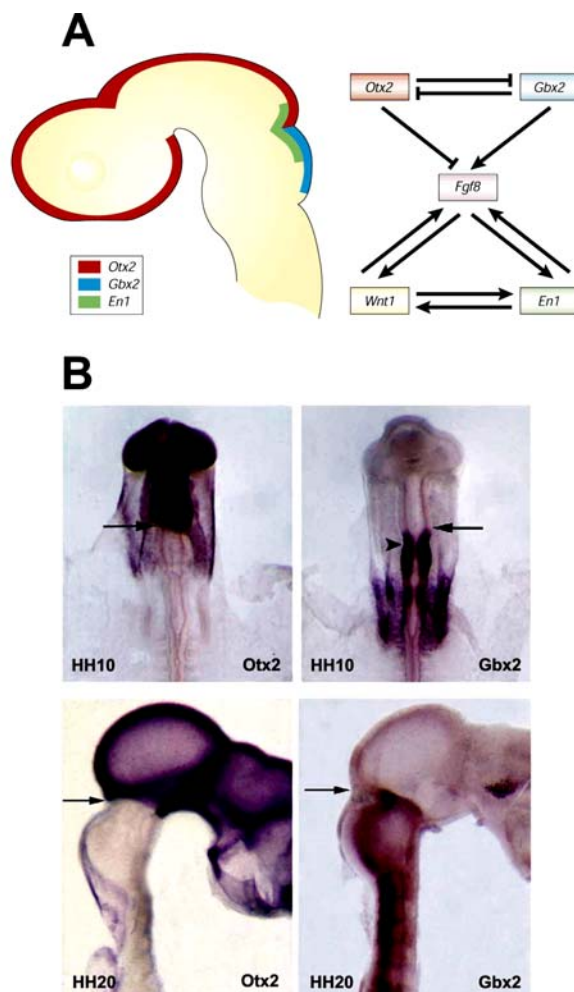


Figura 35. El organizador ístmico.

(A) La formación del cerebelo depende del organizador ístmico, que se forma en el territorio de expresión del gen *En2*. La mutua represión de los genes *Otx2* y *Gbx2* determina la expresión de *Fgf8* en el límite mesencefalo/metencéfalo, *Fgf8* regula a su vez la expresión de distintos genes, entre ellos *En2* (adaptado de Wang y Zoghbi, 2001).

(B) La mutua represión de *Otx2* y *Gbx2* determina el lugar de formación del cerebelo. Sin embargo, en un principio (HH10 en pollo) el límite de expresión de *Gbx2* (flecha) queda por delante del MHB (punta de flecha), la constricción anatómica que inicialmente se consideraba el origen del cerebelo; a partir de HH20, el MHB coincide con el límite de expresión de *Otx2* y *Gbx2* (adaptado de Sotelo, 2004).

**Especificación rostral-caudal.** A partir de transplantes quimera pollo/codorniz, que siguen criterios anatómicos para definir territorios en el tubo neural, se concluyó que la región cerebelar no se genera únicamente a partir del romboencéfalo como se creía, sino que aparece a partir de tejido mesencefálico y romboencefálico (Hatten y Heintz, 1995; Sotelo, 2004). Sin embargo, el uso de mapas basados en dominios de expresión génica han puesto de manifiesto que los límites anatómicos no siempre son auténticos límites territoriales; por ejemplo, la constricción anatómica entre las vesículas mesencefálica y romboencefálica, que en los experimentos de transplantes mencionados más arriba era considerado como la frontera mesencefalo-romboencefalo, se mueve en dirección rostral durante el desarrollo del pollo, para más adelante coincidir con el límite caudal de la expresión del gen *Otx2*, un marcador molecular del límite caudal del mesencéfalo que se mantiene siempre en la misma posición (figura 35) (Wingate, 2001). Por lo tanto, según un criterio génico de especificación territorial se considera: a) que el límite de expresión caudal de *Otx2* es también la frontera entre el mesencéfalo y el romboencéfalo; b) que el cerebelo tiene su origen únicamente en el romboencéfalo, concretamente en el rombómero 1 del metencéfalo (Wingate, 2001).

**El organizador ístmico.** *En2* se expresa intensamente en el área que contiene el primordio del cerebelo (el límite mesencefalo/metencéfalo) y muestra un doble gradiente decreciente, rostral en dirección al mesencéfalo (que no expresa *En2*) y caudal en dirección al metencéfalo. Cuando un pedazo del primordio del cerebelo de codorniz es transplantado en el diencefalo de pollo, el trasplante no solamente mantiene la elevada expresión de *En2* (y, por consiguiente, continua destinado a ser tejido cerebelar), sino que también induce, en el tejido diencefálico de pollo colindante, la expresión de *En2* en forma de gradiente decreciente, similar al que aparece en el mesencéfalo caudal. El gradiente decreciente de *En2* produce el desarrollo de tejido con



características mesencefálicas (tectum) en el diencéfalo. A partir de tales evidencias experimentales, se considera el límite mesencéfalo/metencéfalo (MHB) como un tejido organizador secundario, ya que, transplantado a un lugar distinto del tubo neural, es capaz allí de emitir señales morfogenéticas que inducen el desarrollo de un primordio cerebelar (figura 35). Fue bautizado como organizador ístmico (IsO) (Alvarado-Mallart, 2005; Sotelo, 2004).

Hacia el final del proceso de gastrulación, la placa neural del embrión de ratón (E7-E8) expresa en su región prosencefálica y mesencefálica el gen *Otx2*, y su límite caudal coincide con el límite rostral de expresión de otro gen, *Gbx2*. Estudios genéticos en ratones knock-in y knock-out han demostrado que la mutua represión de los genes *Otx2* y *Gbx2* determina la posición del IsO, y que la expresión de *Gbx2* en la región caudal al IsO es responsable de destinar ese territorio al desarrollo del cerebelo, al reprimir la expresión de *Otx2*. La expresión de *FGF8* es activada por *Gbx2* y reprimida por *Otx2*, por lo que *Fgf8* aparece en el límite mesencéfalo/metencéfalo (destinado a ser primordio cerebelar) y regula directa o indirectamente la expresión de un conjunto de genes: *En1* y *2*, *Pax2* y *5*, y *Wnt1*. Todos ellos resultan necesarios para la especificación del dominio mesencéfalo/metencéfalo, así como para la supervivencia de sus células (figura 35) (Alvarado-Mallart, 2005; Sotelo, 2004; Wang y Zoghbi, 2001). *Hoxa2* es el gen de la familia Hox cuya expresión es más rostral, este hecho junto con el fenotipo de ratones deficientes en el gen *Hoxa2* (que desarrollan un cerebelo más grande en sentido caudal) permiten sugerir que *Hoxa2* delimita el dominio cerebelar por su parte posterior (Wang y Zoghbi, 2001).

**Especificación dorsal-ventral.** El diseño de la región cerebelar en su eje dorsoventral es menos conocido. La familia de proteínas Bmp y Shh controla los procesos de especificación neuronal en la médula espinal, y parece ser que también participan en la determinación dorsoventral del límite mesencéfalo/metencéfalo: estudios de expresión ectópica en ratón muestran que los genes *Bmp* inducen la expresión de *Math1* un marcador de células granulares, y que *Shh* es capaz de producir un fenotipo “ventralizado” en la región dorsal del límite mesencéfalo/metencéfalo, y de ese modo alterar el desarrollo cerebelar (Wang y Zoghbi, 2001).

## **2.2. Neurogénesis e histogénesis en el cerebelo**

Después de este conjunto de acontecimientos que permiten el establecimiento del territorio cerebelar, le sigue la fase de histogénesis con la proliferación de precursores que, a partir de E10 en ratón, empieza a engrosar la zona. A diferencia de otras regiones del SNC, en la formación del cerebelo participa no solamente el neuroepitelio germinativo del cuarto ventrículo, que aporta neuronas y glía por migración radial, sino también una zona especializada, llamada labio rómbico, que genera neuronas que, mediante corrientes migratorias tangenciales, se incorporan tanto al sistema cerebelar (cerebelo y núcleos precerebelares), como a otros núcleos del cerebro posterior. Además, el cerebelo presenta como segunda característica la existencia de dos zonas germinales secundarias, que actúan principalmente durante edades postnatales: la capa granular externa (EGL) y la sustancia blanca, que proporcionan a la corteza cerebelar neuronas granulares, e interneuronas inhibitorias y glía, respectivamente.

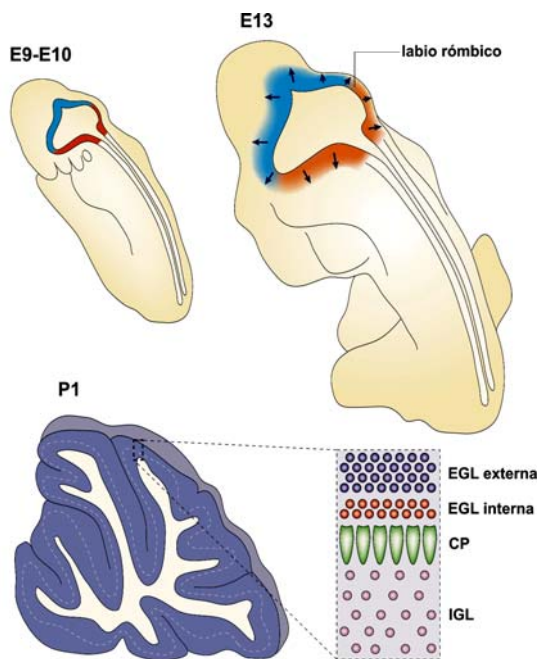
**Labio rómbico.** Consiste en la interfase entre la placa del techo del cuarto ventrículo (cerebro posterior) y el tubo neural. En el eje rostro-caudal se extiende entre los rombómeros 1 y 8 del metencéfalo, y es fuente de neuronas que abandonan dicho neuroepitelio y se incorporan en el cerebelo y en distintos núcleos del cerebro posterior mediante corrientes migratorias tangenciales que siguen rutas muy específicas (figura 36). La opinión general divide el labio rómbico en superior o cerebelar, situado en el rombómero 1 y origen únicamente de las células de la EGL, y inferior o posterior, que se extiende entre los rombómeros 2 y 8 y espina dorsal superior, y que produce precursores para los núcleos precerebelares (de donde parten las fibras musgosas que conectan indirectamente con las células de Purkinje a través de las células granulares) y para la oliva inferior (origen de las fibras trepadoras que conectan directamente con las células de Purkinje); el labio rómbico inferior también genera neuronas de otros núcleos del cerebro posterior, como los acústico-vestibulares (Wingate, 2005; Wingate, 2001).

**Neuroepitelio ventricular.** A partir del uso experimental de mapas genéticos de destino celular, la visión actual del origen del sistema cerebelar ha cambiado: las neuronas inhibitorias de la corteza cerebelar (Purkinje, interneuronas de la capa molecular y de la IGL, y pequeñas neuronas de los núcleos profundos) provienen de una porción del neuroepitelio en el rombómero 1 definido por la expresión de

*Ptf1* (Hoshino et al., 2005; Kawaguchi et al., 2002), mientras que las neuronas excitadoras (granulares y neuronas grandes de los núcleos profundos) se originan en otra zona del neuroepitelio del mismo rombómero donde se expresa *Math1* (Wang et al., 2005); ambos genes, *Ptf1* y *Math1*, codifican para factores de transcripción con un dominio bHLH, y sus dominios de expresión son mutuamente excluyentes (Wingate, 2005). El labio rómbico también ha sido redefinido: ahora corresponde a aquél dominio del neuroepitelio romboencefálico que expresa *Math1* y que da lugar al sistema musgoso de entrada excitatoria a la corteza cerebelar (células granulares y sus aferencias, los núcleos precerebelares), a las neuronas excitadoras de los núcleos profundos, y a otras neuronas que forman parte del sistema propioceptivo-vestibular-auditivo (donde también interviene el cerebelo). En cambio, el circuito de fibras trepadoras en la corteza del cerebelo (células de Purkinje y sus aferencias directas, las neuronas de la oliva inferior, así como interneuronas inhibitoras de la corteza cerebelar y de los núcleos profundos) proviene de un dominio del neuroepitelio romboencefálico cercano al labio rómbico y caracterizado por la expresión de *Ptf1* (Wingate, 2005).

### 2.3. Desarrollo de los núcleos profundos

Las primeras neuronas cerebelares en salir del ciclo celular (entre E9,5 y E10,5 en ratón (Wang et al., 2005)) son las precursoras de los núcleos cerebelares profundos. Hasta fechas recientes, se les atribuía una trayectoria migratoria un tanto especial, que desde la región del neuroepitelio ventricular cerebelar donde se generaban, proseguía hasta alcanzar la región rostradorsal de la placa cerebelar. Es ahí donde constituyen la llamada zona nuclear transitoria (NTZ), una agregación celular situada por debajo de la superficie pial que desaparece cuando sus neuronas migran translocándose a zonas más profundas del primordio cerebelar, para así ocupar su posición definitiva en el cerebelo adulto (Hatten y Heintz, 1995; Sotelo, 2004). Sin embargo, datos recientes apuntan a que parte de las neuronas de los núcleos profundos (aquellas que expresan *Math1* durante el desarrollo y un neurotransmisor excitador en la etapa adulta) provienen del labio rómbico rostral; una vez postmitóticas, constituyen el avance inicial de la llamada corriente migratoria rostral, una trayectoria de migración tangencial específica que partiendo del labio rómbico en E10 en ratón, sigue un curso dorsal o superficial por encima del primordio cerebelar; dicha corriente proporciona inicialmente neuronas de los núcleos profundos a la zona nuclear transitoria y, más adelante, precursoras de células granulares a la EGL (Wang et al., 2005; Wingate, 2005). Las neuronas inhibitoras de los núcleos profundos, junto con las células de Purkinje y las interneuronas inhibitoras de la corteza del cerebelo, se originan en el neuroepitelio ventricular cerebelar y expresan *Ptf1* (figura 37) (Wingate, 2005).



**Figura 36. Desarrollo del cerebelo en ratón.**

El labio rómbico (una zona proliferativa situada entre el cuarto ventrículo y el tubo neural) proporciona a partir de E9 células granulares y de los núcleos profundos al cerebelo (azul), y diversos tipos neuronales a otras regiones (como el núcleo de la oliva inferior, naranja). Los precursoras granulares colonizan la superficie cerebelar para formar la EGL, donde continúan proliferando en su región externa durante las dos primeras semanas postnatales. CP: capa de células de Purkinje. EGL: capa granular externa. IGL: capa granular interna (adaptado de Wang y Zoghbi, 2001).

## **2.4. Desarrollo de las células de Purkinje**

### 2.4.1. Neurogénesis, migración y diferenciación inicial

Entre E11 y E13 en ratón (ligeramente más tarde que los precursores de los núcleos profundos), una segunda oleada de precursores (entre los que se incluyen los de las células de Purkinje, interneuronas corticales y células gliales) se vuelven postmitóticos, abandonan el neuroepitelio ventricular cerebelar, migran a través del sistema de fibras gliales radiales y forman una densa capa en el medio del primordio cerebelar. A medida que se establecen en esa capa, los precursores corticales coinciden en el trayecto con los precursores de los núcleos profundos que, desde la zona nuclear transitoria en la región rostródorsal del primordio cerebelar, migran hacia la región rostromedial del primordio en sentido contrario al de los precursores corticales. Éstos quedarán, por lo tanto, formando una ancha capa situada por encima de los futuros núcleos profundos, y que dará lugar a la corteza del cerebelo (Hatten y Heintz, 1995; Sotelo, 2004).

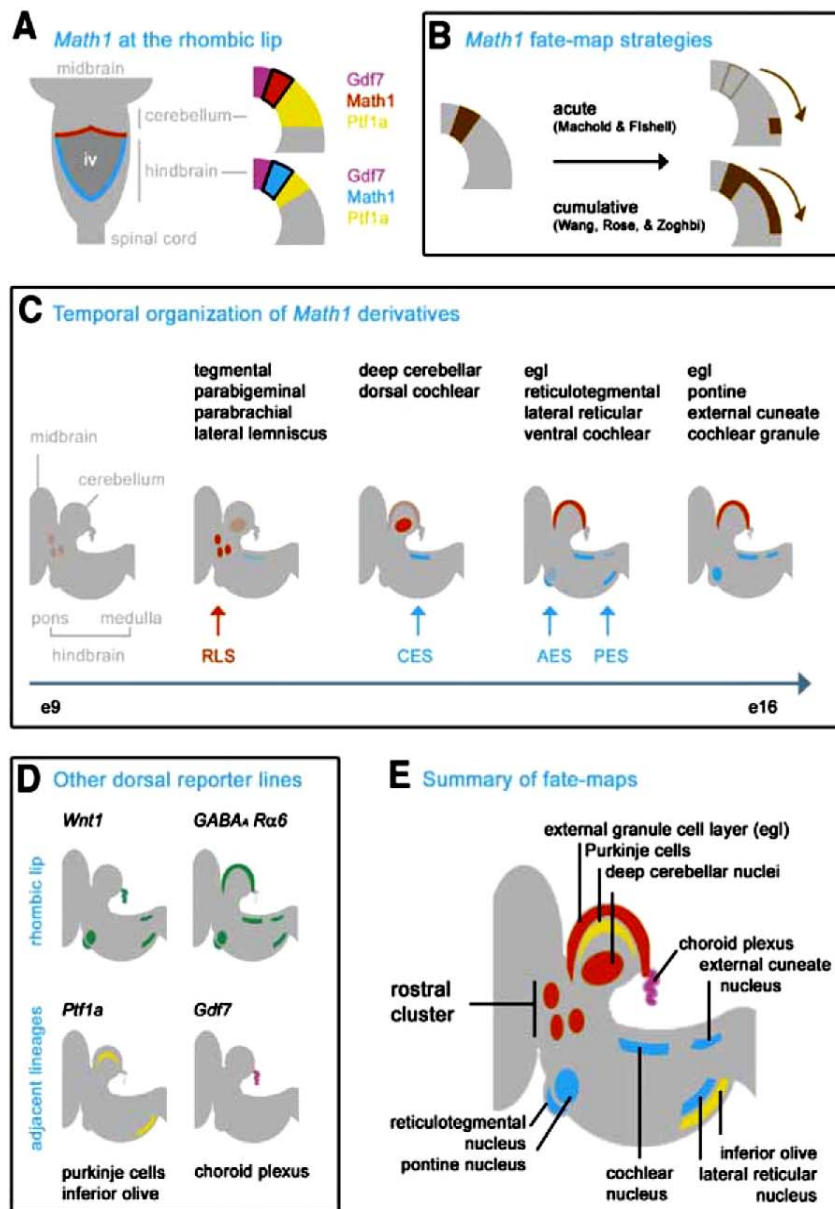
Poco tiempo después de su última mitosis (E13), los precursores de Purkinje empiezan a expresar marcadores específicos (por ejemplo Calbindina). Una vez situados formando una masa por encima de los núcleos profundos y por debajo de la EGL incipiente (que empieza a visualizarse aproximadamente a E17 en ratón), los precursores permanecen detenidos, esperando a la migración hacia el interior de las células granulares para formar la capa granular (IGL). Más adelante, y a medida que los precursores ya postmitóticos se van desplazando hacia la IGL, las células de Purkinje pasan de una distribución en varias capas en edades perinatales, a alinearse durante la etapa postnatal y formar una única capa. Pero aunque dependan de factores producidos por las células granulares para su migración y posicionamiento, las células de Purkinje no parecen necesitar a las células granulares en las primeras etapas de su programa de diferenciación (pero sí para el correcto desarrollo de su árbol dendrítico, ver más adelante), ya que animales mutantes como el ratón weaver o el ratón deficiente en el gen *Math1*, ambos caracterizados por la ausencia de precursores de las células granulares, muestran numerosas células de Purkinje diferenciadas (Hatten y Heintz, 1995; Wang y Zoghbi, 2001). Otros genes, en cambio, sí influyen en la supervivencia y maduración de las células de Purkinje, todos ellos con autonomía celular (Sotelo, 2004):

- mutaciones en *Rora* (un miembro de la familia de receptores nucleares que ligan hormonas esteroideas) producen el fenotipo característico del ratón staggerer (“tambaleante”) (Steinmayr et al., 1998);
- una mutación espontánea en el gen *Grid2* (que codifica la subunidad  $\delta 2$  del receptor de glutamato) que da lugar a una ganancia de función en la proteína, es la causante del fenotipo del ratón lurcher (que también significa “tambaleante”) (Zuo et al., 1997);
- el ratón mutante *Pcd* (*Purkinje Cell Degeneration*) tiene afectado el gen *Nnal*, que corresponde a un receptor nuclear cuya expresión es inducida durante la regeneración axonal (Fernandez-Gonzalez et al., 2002);
- mutaciones en el gen *src* de ratón (codifica una proteína nuclear que estimula la actividad transcripcional de receptores nucleares) produce anomalías motoras (Nishihara et al., 2003).

Existen otros genes que afectan mayoritariamente a la capacidad de supervivencia de las células de Purkinje durante su desarrollo: los correspondientes a factores de crecimiento como NGF, BDNF o NT4 y 5, entre otros, aumentan el número de células de Purkinje in vitro, mientras que NT3 reduce su supervivencia. Animales transgénicos para el gen *Bcl2*, que codifica un factor protector contra la apoptosis, muestran un mayor número de células de Purkinje (Sotelo, 2004; Wang y Zoghbi, 2001).

### 2.4.2. Diferenciación terminal

Diversos estudios sugieren que, en el proceso final de maduración de las células de Purkinje, el contacto sináptico con sus aferencias ejerce un papel importante. El período del contacto de las fibras trepadoras con las células de Purkinje empieza a partir de E18 en ratón (Hatten y Heintz, 1995). Durante la primera semana postnatal, las células de Purkinje presentan contactos de múltiples fibras trepadoras, y posteriormente parte de ellas degeneran, dejando en la tercera semana postnatal la característica conexión de una única fibra trepadora con una única fibra de Purkinje (Sotelo, 2004). El proceso de eliminación de fibras trepadoras sobrantes depende de la actividad sináptica a través de las fibras



**Figura 37. Linajes dorsales que contribuyen a los sistemas cerebelar y precerebelar.**

**A)** Vista dorsal esquemática a E9.5 en ratón. *Math1* se expresa en todo el labio rúbico, tanto en su parte cerebelar (rojo) como en su parte correspondiente al cerebro posterior (azul); la expresión de *Math1* define el borde de la placa del techo del cuarto ventrículo (iv).

**B)** Dos aproximaciones distintas generan un mapa molecular de destino de derivados del labio rúbico de tipo agudo (Machold & Fishell, 2005) o de tipo acumulativo (Wang et al., 2005). Ambos mapas establecen la identidad y el momento de producción de los distintos tipos neuronales, aunque el mapa agudo, además, demuestra la expresión transitoria y caracteriza los tipos neuronales que migran fuera del labio rúbico.

**C)** Derivados del labio rúbico que componen las distintas corrientes migratorias definidas por Wang y colaboradores (Wang et al., 2005). Dichas corrientes (RLS, CES, AES, PES) están cronotópicamente distribuidas. En las trayectorias más largas, los derivativos distales (aquellos que migran más lejos) son los que primero se generan.

**D)** Otros mapas moleculares de destino han identificado subconjuntos de los linajes originados en el labio rúbico que expresa *Math1*. Los derivados cocleares y cerebelares no proceden de la región del labio rúbico que expresa *Wnt1*. El factor de transcripción pancreático *Ptf1a* identifica precursores de células de Purkinje, de interneuronas inhibitorias de la corteza cerebelar y de los núcleos profundos, y de la oliva inferior (Hoshino et al., 2005; Wingate, 2005). La expresión de *Gdf7* define precursores de los plexos coroideos.

**E)** Composición que resume los distintos mapas moleculares de destino, mostrando la diversidad de estructuras relacionadas funcionalmente gracias a la específica organización espaciotemporal de la región dorsal del tubo neural. RLS, rostral rhombic lip; CES, caudal rhombic lip; AES, anterior extramural stream; PES, posterior extramural stream (adaptado de Wingate, 2005).

paralelas (ver más adelante) y de la presencia de receptores NMDA (Wang y Zoghbi, 2001). La ablación de las fibras trepadoras no afecta al tamaño del árbol ni a la estructura dendrítica general de las células de Purkinje, pero sí altera el compartimiento dendrítico proximal (allí donde normalmente contactan las fibras trepadoras) que resulta invadido por sinapsis de fibras paralelas; por lo tanto, el contacto de las fibras trepadoras permite la correcta segregación de las dos aferencias en el árbol dendrítico de Purkinje (Sotelo, 2004).

El contacto por parte de las fibras paralelas determina el desarrollo dendrítico de las células de Purkinje, así como la formación de espinas dendríticas, especializaciones de la membrana donde se efectuarán los contactos sinápticos con las fibras aferentes (sinapsis que se generan a partir de la primera semana postnatal en el ratón (Sotelo, 2004)); de hecho, el cultivo de células de Purkinje requiere la presencia de células granulares para la adecuada formación de su característico árbol dendrítico (Wang y Zoghbi, 2001). Además, las dendritas de Purkinje muestran alteraciones cuando se han desarrollado en ausencia de células granulares (que aportan un 90% del total de sus contactos sinápticos), como es el caso de los ratones mutantes *weaver* o *reeler*, o el de los ratones irradiados

con rayos X durante la etapa postnatal (Sotelo, 2004). La actividad sináptica a través de las fibras paralelas es necesaria para que se produzca la regresión de las fibras trepadoras sobrantes: cuando se desarrollan en ausencia de células granulares, las células de Purkinje mantienen la inervación múltiple de fibras trepadoras (Sotelo, 2004). Concretamente, los receptores glutamatérgicos mGluR1 y GluR $\delta$ 2 expresados por las células de Purkinje están implicados en la activación de las sinapsis establecidas por las fibras paralelas y, de forma indirecta, en la eliminación de las fibras trepadoras sobrantes (Sotelo, 2004). El gen *Wnt3*, cuya función en axogénesis y dendritogénesis es conocida, se expresa en las células de Purkinje y su expresión es modulada por las células granulares (Wang y Zoghbi, 2001). Sin embargo, la expresión en células de Purkinje de determinados genes durante el periodo de desarrollo dendrítico (por ejemplo, el gen *Kv3.3b*, que codifica un canal de potasio) es controlada por las propias células de Purkinje, independientemente de las células granulares (Hatten y Heintz, 1995).

## **2.5. Desarrollo de las células granulares**

### 2.5.1. Neurogénesis y migración

Las células granulares se originan en el labio rómbico rostral, donde, al igual que el resto de precursores del labio rómbico, empiezan a expresar *Math1*. A partir de E12.5 en ratón los precursores granulares salen del ciclo celular y se incorporan a la corriente migratoria rostral, la misma que en su viaje inicial había generado la NTZ con la aportación de precursores de los núcleos profundos (Wingate, 2005). Mediante dicha corriente los precursores de las células granulares colonizan progresivamente toda la superficie dorsal del primordio cerebelar y forman la EGL en dos oleadas secuenciales: la primera, generada alrededor de E12.5, ocupa el cerebelo anterior y la segunda, generada entre E15.5 y E16.5, ocupa el cerebelo posterior (Machold y Fishell, 2005).

El ratón deficiente en *Math1* tiene como principal alteración fenotípica la ausencia de EGL durante el desarrollo, lo que comporta la falta total de células granulares en el cerebelo adulto; en un principio se concluyó que *Math1* era necesario para la generación y diferenciación temprana de las células de la EGL (Wang y Zoghbi, 2001), aunque datos experimentales recientes apuntan a que otros tipos celulares también requieren *Math1*, entre ellos parte de los núcleos profundos y todos los núcleos precerebelares (Wang et al., 2005). *Math1* se expresa en los precursores granulares de la EGL hasta la segunda semana postnatal (Machold y Fishell, 2005).

Desde que abandonan el labio rómbico, los precursores de las células granulares empiezan a expresar otros factores de transcripción aparte de *Math1* (como por ejemplo *RU49/Zipro1*, *Zic1* y *Zic3*), y durante el periodo de emigración expresan *Nestina*, un tipo de filamento intermedio específico de precursores neuronales (Wang y Zoghbi, 2001).

### 2.5.2. Formación de la EGL

Desde edades embrionarias tardías (E17 en ratón (Miyata et al., 1996)) y durante las dos primeras semanas postnatales, los precursores de las células granulares continúan proliferando en la parte de la EGL más externa (EGL proliferativa) (Sotelo, 2004). Distintos genes participan en el proceso de división celular, entre ellos: *RU49/Zipro1*, *Zic1*, *GC34*, *CyclinD2*. (Wang y Zoghbi, 2001). También hay que mencionar la interacción local entre células en la EGL como fenómeno estimulador de la proliferación y como inductor del avance en el programa de diferenciación de las células granulares (Hatten y Heintz, 1995; Schilling, 2000).

La presencia de las células de Purkinje resulta imprescindible para la proliferación celular que se produce en la EGL externa, ya que su ablación específica in vivo provoca en regiones contiguas la reducción e incluso la total eliminación de células granulares (Sotelo, 2004). Shh parece ser el factor secretado por las células de Purkinje que regula la proliferación de los precursores granulares adyacentes (Sotelo, 2004; Wang y Zoghbi, 2001).

Una vez han salido del ciclo celular, los precursores de las células granulares ocupan la mitad interna de la EGL (EGL premigratoria) donde se desplazan considerables distancias tangencialmente, siguiendo el eje transversal (Sotelo, 2004). El tránsito del estado proliferativo al postmitótico requiere la acción de diversos productos génicos:

- la mutación del gen *Girk2* (que codifica un canal de potasio presente en la membrana plasmática) es responsable del fenotipo del ratón mutante weaver, en el que, tras una etapa de proliferación en la

EGL normal, las células granulares postmitóticas mueren prematuramente debido a un proceso de diferenciación defectuosa (Mjaatvedt et al., 1995). Los canales de potasio *Girk2* generan corrientes rectificantes que compensan la despolarización producida por los receptores NMDA activados justo antes de la migración hacia la IGL; cuando dichos canales no son funcionales, la despolarización no es corregida y eso provoca la muerte de los precursores postmitóticos. Sin embargo, la alteración en el gen *Girk2* no actúa con autonomía celular en el ratón *weaver*, por lo que se ha propuesto que los defectos sean secundarios a anomalías en una posible interacción entre células granulares y/o sus precursores, y determinados elementos de la matriz extracelular, o bien a alteraciones en la glía de Bergmann (Schilling, 2000).

- Inhibidores del ciclo celular como p27/Kip1 parecen ser necesarios en la transición del estado de proliferación al de diferenciación (Wang y Zoghbi, 2001).
- SDF1 y su receptor CXCR4 impiden la prematura migración de los precursores granulares, previa a la detención del ciclo celular (Schilling, 2000).
- Vitronectina, una glucoproteína de matriz extracelular presente exclusivamente en la EGL proliferativa, actúa sobre los precursores proliferantes activando en ellos el programa de diferenciación, y antagonizando así la señalización de Shh (Sotelo, 2004).
- Los precursores postmitóticos que componen la EGL premigratoria ya no expresan *Math1*, pero expresan otros dos factores de transcripción similares, pertenecientes a la familia bHLH: *NeuroD1* (que resulta determinante para la supervivencia celular) y *Nscl1* (que actúa como regulador del ciclo celular) (Wang y Zoghbi, 2001).
- Factores tróficos como BDNF o IGF1 parecen ser moduladores de la apoptosis en los precursores granulares (Wang y Zoghbi, 2001).

La EGL, que continúa proliferando hasta P15, desaparece a partir de esa edad debido a la migración de los precursores hacia la IGL. El largo periodo de expansión clonal de los precursores en la EGL, desde E10 hasta P15, produce una gran población de células granulares en la IGL, que en la corteza cerebelar adulta sobrepasa en número a las células de Purkinje en aproximadamente 250 a 1 (Hatten y Heintz, 1995; Sotelo, 2004).

### 2.5.3. Migración radial: formación de la IGL

Las células granulares ya postmitóticas inician la migración hacia capas profundas de la corteza cerebelar para formar la IGL, y lo hacen siguiendo el eje radial mediante fibras gliales (migración gliofílica). Desde su posición en la EGL premigratoria, las células granulares emiten dos axones, dispuestos formando un ángulo de 180°, que se extienden en sentido contrario uno del otro y de forma paralela a la superficie pial: son las futuras fibras paralelas. A partir de entonces, aparece otra neurita que desciende en ángulo recto respecto a los dos axones, y que dirige al soma hacia el interior de la corteza cerebelar siguiendo las fibras de la glía de Bergmann, atravesando la capa molecular incipiente y situándose por debajo de las células de Purkinje para formar la IGL (figura 38) (Hatten y Heintz, 1995).

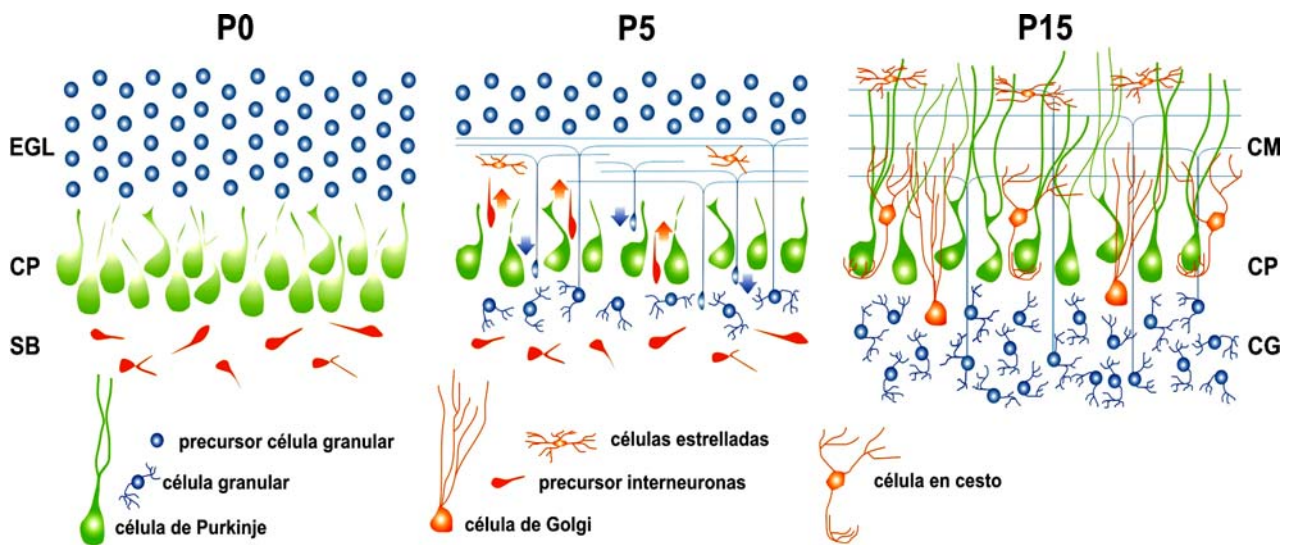
En esta etapa de migración radial, las células granulares empiezan a expresar nuevos genes, como *Tag1*, una proteína de adhesión neuronal perteneciente a la superfamilia de Ig, o TUJ1, un antígeno correspondiente a la tubulina III $\beta$  expresado únicamente en neuronas. Alteraciones en el gen *Pax6* (de la familia de proteínas Paired) da lugar a una EGL premigratoria desorganizada; y formas dominantes negativas de *Unc51.1* y *Unc51.2* inhiben la formación de neuritas en las células granulares, fenómeno inicial e imprescindible en el proceso de migración (Wang y Zoghbi, 2001).

Las células granulares descienden mediante las fibras de la glía de Bergmann, y lo hacen interaccionando directamente mediante estructuras especializadas llamadas uniones intersticiales, engrosamientos del espacio intercelular rellenos de material filamentoso que conecta el citoesqueleto de neurona y célula glial (Hatten, 1999). Varias proteínas participan en la interacción entre células granulares y fibras de Bergmann, y la alteración de su función compromete la correcta migración de las células granulares (Wang y Zoghbi, 2001):

- Astrotactina, una proteína transmembrana con varias repeticiones EGF y Fibronectina, se sitúa en la superficie de las células granulares, y une un receptor aún no identificado en la membrana de las fibras gliales (Adams et al., 2002).

- Neuregulina (también llamada GGF), con varias repeticiones EGF y un dominio Ig, es expresada por las células granulares y une ErbB4, un receptor tirosina-quinasa presente en la membrana de la glía de Bergmann (Rio et al., 1997).
- Trombospondina y Tenascina, dos proteínas de matriz extracelular, están implicadas en la migración de las células granulares, así como en la extensión de sus neuritas (Husmann et al., 1992; O'Shea et al., 1990).
- El bloqueo de receptores NMDA y de un canales de  $Ca^{+2}$  tipo N disminuye la tasa de migración granular (Sotelo, 2004).

#### 2.5.4. Maduración de las células granulares



**Figura 38. Desarrollo postnatal de la corteza cerebelar: las dos zonas germinativas secundarias.**

Durante las dos primeras semanas postnatales en el ratón, dos zonas germinativas se mantienen activas en la corteza cerebelar: en la capa granular externa (EGL) los precursores granulares proliferan en su región más externa, y posteriormente migran radialmente hacia el interior de la corteza cerebelar para formar la capa granular (CG). Al mismo tiempo, células con capacidad mitótica situadas en la sustancia blanca (SB) generan interneuronas inhibitorias (células estrelladas, células en cesto y células de Golgi) y células gliales, que migran en dirección contraria a la de las células granulares, o sea, en dirección pial, para ocupar su lugar a lo ancho de la corteza cerebelar. CG: capa granular. CM: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. EGL: capa granular externa. SB: sustancia blanca.

En la última etapa en la diferenciación de las células granulares, que tiene lugar en la IGL, influyen los dos tipos de conexiones sinápticas que dichas células generan durante este periodo: las sinapsis de sus axones, las fibras paralelas, con las dendritas de las células de Purkinje en la capa molecular, y los contactos de sus dendritas con sus aferencias, las fibras musgosas. Éstas llegan a la corteza del cerebelo al tiempo que las células granulares comienzan su migración desde la EGL premigratoria, y reciben una señal de detención por parte de las células granulares en la IGL (Hatten y Heintz, 1995). En P15 en ratón, las fibras musgosas han empezado a desarrollar los terminales que contactan con las dendritas de las células granulares en la IGL, formando las estructuras sinápticas especializadas conocidas como glomérulos (ver más arriba). Se cree que astrocitos velados también forman parte de los glomérulos, envolviendo a la célula granular y al terminal axónico de la fibra musgosa una vez se ha establecido la sinapsis entre ellos (Hatten y Heintz, 1995). Diversos estudios señalan la participación de muchos genes en esta etapa terminal del desarrollo de las células granulares, y entre ellos destacan tres (Hatten y Heintz, 1995; Wang y Zoghbi, 2001):

- la subunidad  $\alpha 6$  del receptor GABA A, que representa un marcador de madurez en las células granulares y que únicamente se expresa en la IGL;
- la proteína de adhesión neuronal F3/contactina, que al igual que TAG1 pertenece a la superfamilia Ig, y cuya supresión génica produce en el ratón un fenotipo atáxico severo y alteraciones en la posición de los axones de las células granulares, así como defectos dendríticos tanto en las células granulares como en las células de Golgi;

- Wnt7a, que es expresado por las células granulares y actúa como un factor sinaptogénico en los terminales de las fibras musgosas que forman los glomérulos de la IGL.

## **2.6. Desarrollo de las interneuronas**

### 2.6.1. Neurogénesis: la sustancia blanca

Durante el desarrollo postnatal de la corteza, y a medida que las células de Purkinje se alinean en una única capa y la EGL disminuye de grosor (debido a la migración de las células granulares hacia el interior), aparece entre ambas la capa molecular, que es paulatinamente ocupada por las fibras paralelas de las células granulares en migración, por las dendritas de las células de Purkinje y sus aferencias, las fibras trepadoras, y por dos tipos de interneuronas inhibitorias: las células estrelladas y en cesto. Junto con las células de Golgi (y probablemente también con el resto de interneuronas GABAérgicas de la IGL), al menos una parte de ellas tienen su origen en una población de precursores situados en la sustancia blanca, que durante la etapa postnatal continúan proliferando tanto en la misma sustancia blanca como durante su trayecto a través de la corteza cerebelar hasta sus destinos en la IGL y la capa molecular. La sustancia blanca es, pues, otra zona germinal secundaria (análoga a la EGL) que aporta a la corteza del cerebelo no sólo interneuronas, sino también astroglia y oligodendroglia (figura 38) (Schilling, 2000; Sotelo, 2004; Zhang and Goldman, 1996a; Zhang and Goldman, 1996b).

### 2.6.2. Migración y maduración

Se asume que interneuronas y sus precursores en la sustancia blanca postnatal se originan durante el periodo embrionario en la zona ventricular del cerebelo, junto con las células de Purkinje; desde allí, los precursores migran en dos etapas: durante la etapa embrionaria, hasta la incipiente sustancia blanca, y en las primeras semanas postnatales, hasta las capas molecular y granular. Se sugiere que las interneuronas de la capa molecular sigan un patrón de migración “dentro-fuera” igual que los neuroblastos en la neocorteza, es decir, colonizan lugares cada vez más superficiales en la capa molecular. De hecho, las células en cesto, que ocupan la mitad profunda de la capa molecular adulta, se generan antes que las células estrelladas, que se sitúan en la mitad superficial (en rata, P6-7 y P8-11, respectivamente) (Yamanaka et al., 2004; Zhang y b, 1996).

Varios estudios apuntan a que las interneuronas pueden usar tres sustratos distintos durante su migración a través de la corteza cerebelar:

- los axones mielinizados, ya que la ablación selectiva de oligodendrocitos durante la primera semana postnatal produce una disminución en el número de células estrelladas y en cesto (Mathis et al., 2003).
- Las fibras de glía de Bergmann son candidatas a sustentar la migración de las interneuronas, ya que éstas siguen una migración radial igual que las células granulares (aunque en sentido contrario), y teniendo en cuenta que la ablación selectiva de astrocitos durante el desarrollo postnatal altera la formación normal de la capa molecular (Delaney et al., 1996). En cultivos cerebelares se han observado interneuronas que migran siguiendo fibras astrogliales (Magyar-Lehmann et al., 1995; Schilling, 2000).
- Las fibras paralelas también podrían ser un sustrato permisivo para la migración, ya que se ha observado en las interneuronas una dispersión significativa en el plano sagital, el mismo plano en el que se elongan las fibras paralelas (Zhang y Goldman, 1996b) y en cultivos disociados de cerebelo, las interneuronas pueden migrar mediante axones de células granulares (Magyar-Lehmann et al., 1995; Schilling, 2000).

Parece ser que las células granulares ejercen una influencia quimioattractiva sobre las interneuronas en migración: en el mutante weaver, hay interneuronas ectópicas mezcladas entre los precursores granulares; cuando la migración de las células granulares hacia la IGL es alterada experimentalmente, obligándolas a diferenciarse dentro de la EGL, también se observan interneuronas entre las células granulares maduras y ectópicas; por último, en el ratón mutante mea (donde los precursores granulares en migración tangencial desde el labio rómbico no colonizan el cerebelo anterior) las interneuronas tampoco migran correctamente en esa zona (Schilling, 2000).

In vitro, la supervivencia y maduración de las interneuronas de la capa molecular (que expresan Parvalbúmina) depende de actividad sináptica. Además, BDNF tiene un efecto negativo sobre estas



células, ya que su adición al cultivo produce una disminución en el número de células positivas para parvalbúmina (Koscheck et al., 2003).

Se ha descrito cierto grado de muerte neuronal en la población de interneuronas de la capa molecular; durante las dos primeras semanas postnatales, aproximadamente un 6% de dichas interneuronas entra en apoptosis (Yamanaka et al., 2004).

***Pax2 como marcador de interneuronas cerebelares.*** Pax2, un miembro de la familia de factores de transcripción con un dominio Paired de unión a DNA, es considerado un marcador tanto de interneuronas inhibitoras durante todo el desarrollo del cerebelo, como de sus precursores en la sustancia blanca durante la etapa postnatal. Se expresa a partir de E13 en el primordio cerebelar en un conjunto de células situadas fuera de la zona ventricular, que corresponden a interneuronas en los núcleos profundos, células de Golgi en la IGL, e interneuronas de la capa molecular (células estrelladas y en cesto). La expresión de Pax2 declina a partir de P15, coincidiendo con la última etapa de diferenciación de las interneuronas inhibitoras de la corteza: el establecimiento de sinapsis (Maricich y Herrup, 1999).

## **2.7. Desarrollo de la glía de Bergmann**

### **2.7.1. Etapa embrionaria: glía radial**

En E13 en ratón, los astrocitos están restringidos a la zona ventricular del cerebelo, y tanto la densa capa de células de Purkinje como la incipiente EGL carecen de células astrocíticas a esa edad. A partir de E14 empiezan a abandonar la zona ventricular, y aparecen mezclados con las células de Purkinje; en ese momento del desarrollo, prácticamente todos los astrocitos presentan una morfología típica de glía radial: el soma se ubica dentro de la zona ventricular o adyacente a ella, las fibras se extienden radialmente por el primordio cerebelar hasta la superficie pial y expresan marcadores típicos de glía embrionaria, como Glast (transportador de glutamato) y Tenascina (una molécula de matriz extracelular con propiedades de adhesión neurona-glía) (Yamada y Watanabe, 2002). Existen datos obtenidos en inmunohistoquímica y microscopía electrónica que demuestran que en la etapa embrionaria las células de Purkinje se encuentran yuxtapuestas a las fibras de la glía radial, y que estructuras especializadas se desarrollan en los puntos de unión entre ambos tipos celulares (Yuasa et al., 1996).

A partir de E15, las células de glía radial (que fuera de la zona ventricular todavía conservan actividad mitótica) se dividen rápidamente al mismo tiempo que migran en dirección a la capa de células de Purkinje, por lo que durante esta etapa su número aumenta considerablemente, distribuyéndose por todo el primordio cerebelar pero siempre por detrás del frente de migración de las células de Purkinje. Por lo tanto, la migración glial parece estar, al menos en parte, correlacionada con el avance de las células de Purkinje (Yamada y Watanabe, 2002).

### **2.7.2. Etapa postnatal: glía de Bergmann**

Durante la primera semana postnatal, y a medida que las células de Purkinje se alinean para formar una monocapa, las células gliales se condensan para formar algo parecido a una capa pseudoestratificada alineada con la capa de Purkinje. Durante este periodo, las células de la glía de Bergmann empiezan a adquirir características propias, que las diferencian del resto de células astrocíticas: mientras éstas disminuyen la expresión de determinados antígenos (como, por ejemplo, Glast o Vimentina) para iniciar la síntesis de moléculas típicas astrogiales (por ejemplo, GFAP), la glía de Bergmann adulta conserva la inmunogenicidad propia de la glía radial embrionaria (es positiva para Glast y Vimentina) y a la vez expresa marcadores de astrocitos maduros (como GFAP) (Yamada y Watanabe, 2002).

A partir de la segunda semana postnatal, la glía de Bergmann sufre cambios citoarquitectónicos: desde el tallo principal de las fibras inmunopositivas para GFAP empiezan a aparecer expansiones laterales o excrecencias que concentran el antígeno Glast. A lo largo de las siguientes dos semanas de desarrollo postnatal, la glía de Bergmann paulatinamente reemplaza las fibras gliales en forma de empalizada radial por una formación reticular que envuelve las dendritas en desarrollo de las células de Purkinje (Yamada y Watanabe, 2002).

Durante este periodo las células granulares, que atraviesan la capa molecular en su viaje hacia el interior de la corteza, aparecen por microscopía electrónica estrechamente adyacentes a las fibras de Bergmann, lo que sugiere que existen moléculas específicas presentes en las membranas gliales que permiten el contacto con las células granulares. En ese sentido, se ha demostrado que la expresión por parte de la glía de Bergmann de un conjunto de genes, como por ejemplo *Nestina*, *BLBP*, o los antígenos Rc1, Rc2 y D4, es necesaria para permitir la migración neuronal (Sotelo, 2004). Neuregulina y su receptor ErbB4 parecen estar implicados en la inducción de glía radial por parte de las células granulares (Rio et al., 1997). La expresión de este conjunto de genes es transitoria, y desaparece cuando la migración de las células granulares finaliza (Sotelo, 2004).

También durante esta etapa se registra actividad mitótica por parte de la glía de Bergmann, y muy probablemente dicha actividad se ubica en la sustancia blanca, cuyos precursores también dan lugar a interneuronas y oligodendroglía, así como a otros tipos de astroglia (Zhang and Goldman, 1996a; Zhang and Goldman, 1996b). El aumento de la tasa de proliferación de la glía de Bergmann posiblemente tenga el objetivo de suplir de infraestructura glial y nutrientes a una corteza cerebelar que se ha expandido considerablemente, debido al aumento de la capa molecular y de la capa granular interna (Yamada y Watanabe, 2002).

### 2.7.3. Glía de Bergmann adulta

A partir de la tercera semana postnatal, la glía de Bergmann ya ha alcanzado su total madurez: la actividad mitótica desaparece, sus fibras envuelven la porción ascendente de los axones de las células granulares, y las excrescencias que envuelven las dendritas de las células de Purkinje han evolucionado para formar los llamados microdominios de Bergmann. Estos se componen de estructuras en forma de calabaza conectada al tallo principal de la fibra glial; cada una de ellas envuelve pequeños grupos de sinapsis entre terminales de fibras paralelas y dendritas de Purkinje, y constituye un compartimiento que permite mantener el elevado nivel local de calcio que provoca la estimulación por parte de las fibras paralelas, aumentando así la eficiencia del contacto sináptico. La glía de Bergmann madura se la considera un satélite de la célula de Purkinje; sin embargo, aún en la edad adulta sigue manteniendo una gran plasticidad que le permite ajustar su fenotipo bajo la influencia de las células de Purkinje (Yamada y Watanabe, 2002). Por ejemplo, el trasplante de células de Purkinje embrionarias en ratones adultos induce en la glía de Bergmann un fenotipo embrionario, identificado por la expresión de *Nestina* (marcador de glía inmadura), lo que permite a las células de Purkinje transplantadas migrar a través de la capa molecular huésped; una vez las células de Purkinje detienen la migración, la glía de Bergmann recupera su fenotipo maduro inicial (negativa para *Nestina*) (Sotelo, 2004).

## 2.3. Factores guía en la formación del cerebelo

### 2.3.1. Netrina1

Netrina1 y sus receptores *Dcc* y *Unc5h3* están directamente implicados en la formación del sistema cerebelar; así, en el ratón mutante nulo para *Netrina1*, las neuronas de los núcleos pontinos no se generan, el número de neuronas en la oliva inferior se encuentra enormemente disminuido, y la proyección olivocerebelar es anómala (Serafini et al., 1996; Sotelo, 2004). El ratón deficiente en *Dcc* muestra defectos similares aunque menos severos (Fazeli et al., 1997; Sotelo, 2004). En el ensayo de matriz de colágeno, explantes de labio rómbico inferior que contienen células de los cuatro tipos de núcleos precerebelares (oliva inferior, núcleo reticulado lateral o LRN, núcleo cuneado externo o ECN, y núcleos pontinos) muestran una clara quimioatracción, tanto axonal como de sus somas, hacia agregados de células que secretan Netrina1 (Alcantara et al., 2000; Bloch-Gallego et al., 2005). Por lo tanto, Netrina1 parece ser in vivo el factor quimiotáctico que atrae a somas y axones de los núcleos precerebelares hacia la línea media, posiblemente a través de *Dcc* (Bloch-Gallego et al., 2005).

A edades postnatales, Netrina1 repele a los axones y los somas de las células granulares en el ensayo de matriz de colágeno. *Netrina1* es expresado por las células de la EGL durante el desarrollo postnatal (Alcantara et al., 2000), y es posible que funcione empujando a las células granulares fuera de la EGL, para iniciar su migración hacia el interior de la corteza cerebelar. Dicha hipótesis es reforzada por la expresión de los receptores de Netrina1 *Dcc*, *Unc5h2* y *Unc5h3* en la EGL durante el periodo postnatal (Alcantara et al., 2000).

Diversos estudios implican a *Netrin1* y su receptor *Unc5h3* en la creación de fronteras en el primordio cerebelar. *Unc5h3* es expresado por las células granulares (tanto en el labio rómbico como más tarde en la EGL y la IGL) y por las células de Purkinje embrionarias y postnatales, y la expresión de *Netrin1* es complementaria a la de *Unc5h3*: en las regiones rostral, ventral y medial respecto al primordio cerebelar (donde se expresa *Unc5h3*) (Przyborski et al., 1998). Existen dos líneas de animales con mutaciones que afectan al gen *Unc5h3*: el ratón *rcm*, la rata *cvd* y la rata *hobble* (que significa “cojear”). Las mutaciones en *Unc5h3* se caracterizan por la presencia de tejido cerebelar ectópico en regiones anteriores y ventrales respecto al cerebelo, que corresponden a los colículos y la región pontina respectivamente (Kuramoto et al., 2004; Przyborski et al., 1998). La causa directa de las ectopias es la anómala migración de los precursores granulares, que secundariamente provoca el posicionamiento ectópico de las células de Purkinje (Goldowitz et al., 2000). Por lo tanto, las células granulares serían pioneras en establecer, durante la colonización de la EGL, los límites del cerebelo en formación (Goldowitz et al., 2000). *Netrin1* crearía entonces territorios restringidos para las células granulares en migración, que responderían al factor guía a través del receptor *Unc5h3* (Przyborski et al., 1998).

Pero el papel de *Netrin1* en la delimitación del cerebelo ha sido cuestionado: en el ratón deficiente en *Netrin1* no aparecen semejantes ectopias (Serafini et al., 1996), y en experimentos usando matrices de colágeno, agregados de células que expresan *Netrin1* no producen ningún efecto quimiotáctico en explantes de labio rómbico que contienen precursores granulares (Sotelo, 2004).

### 2.3.2. Semaforinas

Se detecta la expresión de *Sema3A* en el primordio cerebelar a etapas embrionarias tempranas, y durante el desarrollo postnatal la expresión de *Sema3A* se localiza en células de Purkinje y de los núcleos profundos, distribuyéndose inicialmente en bandas sagitales para más adelante mostrar un patrón homogéneo; las células de Purkinje adultas retienen la expresión de *Sema3A* (Giger et al., 1996; Rabacchi et al., 1999). In vitro, *Sema3A* induce el colapso y la retracción neurítica de gran parte de axones postnatales de los núcleos pontinos basilares, donde se originan la mayoría de las aferencias musgosas al cerebelo en mamíferos, y que expresan *Np1* (Kawakami et al., 1996; Rabacchi et al., 1999); *Sema3A* no afecta, en cambio, a fibras de la oliva inferior embrionarias (Rabacchi et al., 1999). Teniendo en cuenta la heterogeneidad de la respuesta repulsiva de las fibras pontinas ante *Sema3A*, la expresión postnatal temprana de *Sema3A* en forma de bandas parasagitales permitiría establecer el inicio del patrón de inervación de las fibras musgosas, en función de su sensibilidad a *Sema3A*, en compartimientos sagitales tal y como se observa en el cerebelo adulto (Herrup y Kuemerle, 1997; Nieuwenhuys et al., 1998). Por otra parte, la expresión de *Sema3A* homogénea en células de Purkinje puede determinar la especificidad de inervación de las aferencias a la corteza cerebelar, ya que las fibras de la oliva inferior, que terminan en células de Purkinje, no responden a *Sema3A*, mientras que las fibras musgosas, que contactan con células granulares, sufren colapso ante *Sema3A* (Rabacchi et al., 1999).

*Sema6A*, una semaforina transmembrana de tipo I, se sintetiza únicamente en células granulares postmitóticas situadas en la región profunda de la EGL, y el ratón deficiente en *Sema6A* muestra anomalías en el proceso migratorio de las células granulares, con un 10% de reducción de la IGL y numerosas células granulares maduras (expresan marcadores exclusivos de IGL) dispersas por la capa molecular, a menudo formando grupos cerca de la superficie pial. Se ha propuesto que *Sema6A* actúa como un factor repelente de contacto que genera la interacción entre células granulares, estimulándolas a iniciar la migración en dirección a la IGL (Kerjan et al., 2005).

### 2.3.3. Slits

Los núcleos precerebelares, originados en el labio rómbico, migran hasta la placa del suelo en la línea media del encéfalo siguiendo rutas específicas. Una vez allí, la mayoría de células pertenecientes al núcleo de la oliva inferior y a los núcleos pontinos se detienen cerca de la línea media sin atravesarla, y son sus axones los que cruzan la placa del suelo para inervar el cerebelo contralateral; las células de los núcleos reticular lateral (LRN) y cuneato externo (ECN), en cambio, sí cruzan la placa del suelo, mientras que sus axones invaden el cerebelo ipsilateral (Bloch-Gallego et al., 2005). Únicamente las células de la oliva inferior expresan *Robo2*, e in vitro, explantes de labio rómbico que contienen células destinadas a la oliva inferior muestran una ligera repulsión ante *Slit*, mientras que ante *Netrin1* responden con extensivo crecimiento axonal y migración nuclear; sin embargo, cuando ambos factores

son combinados, Slit antagoniza el efecto estimulador de Netrina1. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que *Netrina1* y *Slit* se expresan in vivo en la placa del suelo, Slit podría contrarrestar el efecto atractivo de Netrina1 únicamente en células de la oliva inferior, que expresan *Robo2*, y no en células LRN y ECN, que atravesarían la línea media gracias en parte al efecto atractivo de Netrina1 sobre ellas (Bloch-Gallego et al., 2005).

Rig1/Robo3, un receptor que, a diferencia del resto de proteínas Robo, actúa bloqueando la señal repulsiva de su ligando Slit (Sabatier et al., 2004), se detecta por inmunohistoquímica en los axones y procesos de las células precerebelares en migración antes de atravesar la línea media (donde se expresa *Slit*), pero poco después de atravesarla su nivel disminuye, y en el ratón deficiente en *Rig1*, axones y células precerebelares no cruzan la placa del suelo. Por lo tanto, parece que Rig1 reprime en las células precerebelares la señal negativa de Slit presente en la línea media, permitiendo a sus somas (en el caso de los núcleos LRN y ECN) o a sus axones (en el caso de los núcleos pontinos y de la oliva inferior) acercarse hasta la placa del suelo atraídas por factores quimiotácticos de largo alcance, como Netrina1. Una vez cruzada la línea media, la disminución en el nivel de expresión de *Rig1* devolvería a las células precerebelares la sensibilidad hacia la acción repulsiva de Slit, lo que impediría a sus somas o axones volver a cruzar la línea media (Marillat et al., 2004).

#### 2.3.4. Efrinas

Durante el desarrollo postnatal del cerebelo, las células granulares migran desde la EGL formando filas o cintas de somas, llamadas *raphes*. Varios miembros de la familia Eph de receptores con actividad tirosina-quinasa y de sus ligandos, las Efrinas, se expresan en bandas parasagitales o en distintos dominios rostro-caudales en el cerebelo, mostrando cierta complementariedad entre parejas de receptor-ligando. Se ha propuesto que la acción posiblemente redundante de distintas parejas efrinas-eph pueda contribuir a la formación y mantenimiento de los compartimientos parasagitales y rostro-caudales del cerebelo (Blanco et al., 2002; Karam et al., 2000; Karam et al., 2002), y al mismo tiempo, influir en la migración de las células granulares de dos modos: en la migración tangencial dentro de la zona premigratoria de la EGL, y en la migración radial hacia la IGL en forma de filas o cintas de células granulares que respetan los límites de las bandas parasagitales establecidas por la expresión de distintas Efrinas-Eph (Blanco et al., 2002; Karam et al., 2000).

A etapas postnatales tempranas, coincidiendo con el periodo de crecimiento axonal y dendrítico, las células granulares expresan *EfrinaB1* y su receptor *EphB*. In vitro, EfrinaB1 estimula la supervivencia de células granulares y su crecimiento neurítico a través de EphB, y produce un aumento en la expresión de determinados marcadores somatodendríticos. Por lo tanto, EfrinaB1 y su receptor EphB podrían favorecer in vivo la dendritogénesis en células granulares durante el desarrollo cerebelar (Moreno-Flores et al., 2002).

#### 2.3.5. Reelina

Durante el desarrollo del cerebelo, *Reelina* se expresa en dos tipos celulares distintos: las neuronas de los núcleos profundos y las células granulares (Miyata et al., 1996). Se ha propuesto que la presencia de Reelina tanto en la NTZ (constituida por neuronas de los núcleos profundos) como en la EGL actúe de frontera para las células de Purkinje en migración durante edades embrionarias, obligándolas a detenerse, así como de marco de referencia para su correcta alineación durante la etapa postnatal (Jensen et al., 2002; Miyata et al., 1996). A favor de esta hipótesis, la aplicación del anticuerpo anti-Reelina CR-50 a rebanadas de cerebelo produce en ellos un fenotipo reeler, que puede ser revertido cultivándolas con células granulares salvajes (Miyata et al., 1997). Aún así, el papel de Reelina durante el desarrollo tanto de la corteza cerebral como del cerebelo ha sido cuestionado por el trabajo de Magdaleno y colaboradores (Magdaleno et al., 2002), en el que crearon un ratón reeler transgénico con el gen de *Reelina* bajo el control del promotor de *Nestina* (*ne-reelin*); en dicho animal, *Reelina* se expresaba adicionalmente en la zona ventricular del cerebro anterior, del mesencéfalo y del cerebelo. El ratón reeler muestra una severa ataxia asociada a alteraciones en la laminación de la corteza cerebral y cerebelar; el cerebelo reeler es hipoplásico, y las células de Purkinje se mantienen masificadas en regiones profundas, por lo que no pueden situarse cerca de la EGL para estimular la proliferación de sus precursores, no se forma la IGL y no se produce el proceso de foliación (Magdaleno et al., 2002). En el cerebelo del ratón reeler transgénico *ne-reelin* se conseguía restablecer parcialmente la estructura

histológica salvaje, y la severa ataxia típica del ratón reeler había menguado. Se concluyó que, aunque los resultados demostraban que Reelina era necesaria para la correcta laminación del cerebelo, no se puede afirmar que actúa ni como una molécula quimioattractiva, ni como una señal de detención; posiblemente, la acción de Reelina sea indirecta, en cooperación con otros factores presentes en su entorno (Magdaleno et al., 2002).

De hecho, Reelina podría interactuar con otras moléculas secretadas por las células granulares, ya que, según varias evidencias experimentales, estas intervienen en la migración y correcto alineamiento de las células de Purkinje. Así, *Dab1*, que codifica una proteína intracelular con características de adaptadora que forma parte de la vía de señalización desencadenada por Reelina, se expresa en cerebelo únicamente en las células de Purkinje; en el ratón mutante nulo para *Dab1*, se observa que en aquellos lugares donde las células de Purkinje se sitúan al lado de la EGL, se forma una capa alineada aunque escasa (Gallagher et al., 1998). Además, se ha demostrado que las ectopias cerebelares en la región colicular y pontina observadas en los ratones mutantes *math1* y *rcm* son debidas a la anómala migración tangencial de los precursores granulares, que “arrastran” a las células de Purkinje con ellos (Goldowitz et al., 2000; Jensen et al., 2002). También debe tenerse en cuenta que, en el ratón reeler transgénico *ne-reelin* mencionado más arriba, aunque la expresión de *Reelina* afecte de forma masiva a todos los tipos neuronales del cerebelo, muchas células de Purkinje aparecen alineadas bajo la EGL (Magdaleno et al., 2002)