

IV.-DISCUSIÓN

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de las vías de señalización intracelular implicadas en los efectos de diferentes factores tróficos durante el desarrollo, así como las vías intracelulares utilizadas por el BDNF para proteger a las neuronas estriatales ante una lesión excitotóxica. Este último trabajo nos condujo a estudiar como se regulan las proteínas de la familia de la Bcl-2 en animales que carecen de Bax, durante el desarrollo postnatal y frente a la excitotoxicidad.

1.- EFECTOS BIOLÓGICOS DEL BDNF, DEL GDNF Y DE LA BMP-6 SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS ESTRIATALES

En los tres primeros trabajos analizamos los efectos que ejercían los factores tróficos BDNF, GDNF y BMP-6 sobre las células estriatales *in vitro*. En la tabla 1 se resumen los efectos tróficos de los tres factores estudiados sobre la maduración y diferenciación de las distintas poblaciones neuronales estriatales.

FACTOR TRÓFICO	BDNF		GDNF		BMP-6	
	número	grado de diferenciación	número	grado de diferenciación	número	grado de diferenciación
CÉLULAS TOTALES	=	n.d.	=	n.d.	=	n.d.
GABAs	=	↑	=	↑	n.d.	n.d.
CALBINDINAS	↑	↑	=	↑	↑	↑
NESTINAS	=	n.d.	n.d.	n.d.	↓	n.d.

Tabla 1.- Resumen de los efectos de los factores tróficos analizados sobre las diferentes poblaciones estriatales (n.d., no determinado).

1.1.- Implicación diferencial de las vías de señalización intracelular PI3-K y p42/p44 MAPK en los efectos del BDNF y del GDNF sobre las neuronas estriatales *in vitro*

El objetivo de los trabajos 1 y 2 era determinar las vías que estaban implicadas en los efectos del BDNF y del GDNF sobre las neuronas estriatales. Como se ha mencionado en la introducción, se ha demostrado en distintos modelos celulares que el BDNF y el GDNF son capaces de activar las vías intracelulares PI3-K y p42/p44

MAPK (Miller y Kaplan, 2001; Patapoutian y Reichardt, 2001). Por lo tanto, inicialmente analizamos si la presencia de BDNF o GDNF en los cultivos primarios estriatales inducía un aumento en los niveles de Akt o p42/p44 fosforiladas. Ambos factores activan la vía de la p42/p44 MAPK pero sólo el BDNF es capaz de activar la vía de la PI3-K. Además la activación de la vía de la p42/p44 MAPK es más potente y más sostenida en respuesta a BDNF, incluso a dosis más bajas que el GDNF. Estos efectos diferenciales podrían ser debidos a la diferente localización y niveles de expresión de los receptores para ambos factores. El TrkB se expresa en todas las neuronas de proyección estriatales (Merlio y col., 1992) mientras que los niveles de expresión de Ret y GFR α 1 son muy bajos (Perez-Navarro y col., 1999b; Marco y col., 2002a). El efecto más potente del BDNF también se ha demostrado en otros paradigmas experimentales. Por ejemplo tras una lesión excitotóxica en el núcleo estriado el efecto neuroprotector del BDNF es mucho más potente que el del GDNF sobre las neuronas de proyección. Así, el BDNF neuroprotege a las neuronas que proyectan tanto a la sustancia negra como a las del globo pálido, mientras que el GDNF sólo es capaz de tener efecto sobre las neuronas estriatonigrales (Perez-Navarro y col., 1999a,b, 2000a; Gratacos y col., 2001c).

En algunos modelos celulares y en respuesta a determinados estímulos se ha demostrado que puede existir un cruce entre las vías PI3-K y p42/p44 MAPK (Miller y Kaplan, 2001; Wu y col., 2004; Almeida y col., 2005). Por ejemplo, en cultivos primarios estriatales, tras la estimulación de los receptores NMDA o KA la activación de la vía p42/p44 MAPK es dependiente de la activación de la vía PI3-K (Fuller y col., 2001; Perkinson y col., 2002). Sin embargo en nuestro modelo *in vitro*, tras el tratamiento con BDNF no hemos observado cruce entre estas vías, ya que el inhibidor de la Akt (LY294002) no bloqueó el aumento en los niveles de p42/p44 fosforilados inducido por BDNF, ni el inhibidor de la MEK (PD98059) provocó una inhibición del aumento en los niveles de Akt fosforilada. A diferencia del BDNF, sí hemos observado cruce entre estas dos vías tras el tratamiento con GDNF, aunque sólo utilizando una dosis elevada de LY294002 (50 μ M). Este fenómeno demuestra la especificidad de acción de cada factor trófico sobre un determinado modelo celular y la capacidad de cada tipo neuronal a responder ante un factor específico, tal como se ha descrito utilizando cultivos de células mesencefálicas, donde el BDNF y el GDNF actúan a través de mecanismos de señalización diferentes (Feng y col., 1999).

Una vez comprobado que había una activación de ambas vías por parte del BDNF y sólo de la vía p42/p44 MAPK por parte del GDNF, analizamos qué efectos inducían ambos factores por separado en el cultivo primario estriatal. Respecto al BDNF, se había demostrado anteriormente que era un buen inductor de la diferenciación y la supervivencia de las células GABAérgicas estriatales (Mizuno y col., 1994; Ventimiglia y col., 1995) además de incrementar la expresión del marcador estriatal DARPP-32 (Ivkovic y col., 1997; Ivkovic y Ehrlich, 1999). En referencia al GDNF existían muy pocos estudios donde se analizaran los efectos de este factor trófico en el núcleo estriado (Humpel y col., 1996; Farkas y col., 1997). En nuestros cultivos, el BDNF, pero no el GDNF, era capaz de promover la maduración de las neuronas estriatales GABAérgicas hacia neuronas calbindina-positiva incrementando sólo el número de estas últimas. En cambio el número de células totales, de las neuronas GABAérgicas o de los precursores neurales no se modificó en presencia de BDNF ni de GDNF. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión de calbindina en el núcleo estriado está reducida en el ratón KO para BDNF sin que el número de neuronas GABAérgicas esté afectado (Jones y col., 1994). Además, estos ratones presentan alteraciones en la maduración de las células dopaminérgicas nigroestriatales (Baker y col., 2005). También se ha descrito que el BDNF regula la maduración de las neuronas GABAérgicas hipocámpales (Yamada y col., 2002). Todos estos resultados muestran un efecto claro del BDNF sobre la diferenciación celular. Al analizar las vías implicadas en el efecto del BDNF sobre la maduración de las células GABAérgicas estriatales, observamos que este efecto estaba mediado por la activación de ambas vías, ya que la presencia de los inhibidores LY294002 o de PD98059 en el medio bloqueaba el efecto del BDNF. De acuerdo con nuestros resultados, Stroppolo y colaboradores habían demostrado previamente que la vía de la PI3-K estaba implicada en el efecto del BDNF sobre la expresión del marcador DARPP-32 en las neuronas estriatales de proyección en cultivo (Stroppolo y col., 2001).

Además de la inducción de la expresión de calbindina estudiamos la morfología de las neuronas GABAérgicas, así como de las que también expresan la calbindina, mediante el análisis de la arborización dendrítica y la longitud del axón. Las neuronas estriatales GABAérgicas y las calbindina-positivas responden a BDNF incrementando todos los parámetros analizados (área total de la célula, perímetro, área del soma, longitud del axón y grado de arborización), mientras que en presencia de GDNF

aumentan todos los parámetros excepto el área del soma. Es importante destacar que aunque no habíamos observado cambios en el número de neuronas GABAérgicas en presencia de BDNF o de GDNF en el medio, ambos factores producen un efecto sobre su crecimiento neurítico. No obstante, los efectos del BDNF en ambas poblaciones son más potentes que los del GDNF. Este fenómeno podría ser debido a que el BDNF es capaz de activar la vía de la PI3-K y la de la p42/p44 MAPK mientras que el GDNF sólo activa ésta última. Otra diferencia en cuanto a la activación de estas vías por los dos factores que podría explicar estos efectos distintos es que los niveles de p42/p44 fosforilados son más elevados tras la adición de BDNF, y además se mantienen elevados durante más tiempo. De acuerdo con esta sugerencia, trabajos anteriores también han demostrado que la intensidad y la duración de la activación de la vía de la p42/p44 MAPK es importante para obtener efectos biológicos (Mariathasan y col., 2001; Rossler y col., 2004).

Estudios previos han demostrado que ambas vías pueden estar implicadas en promover procesos de diferenciación como la extensión neurítica (Thompson y col., 2004; Dijkhuizen y Ghosh, 2005) y la elongación y ramificación del axón (Markus y col., 2002). Sin embargo, a diferencia del BDNF, el GDNF sólo activa la vía de la p42/p44 MAPK. Utilizando una dosis de 50 μ M de LY294002 habíamos observado un bloqueo del 30 % sobre los niveles de p42/p44 fosforilados en respuesta a GDNF. Por lo tanto analizamos la implicación de la vía de la PI3-K sobre los efectos ejercidos por el GDNF. La presencia del inhibidor de la Akt bloqueaba por completo los efectos tróficos del GDNF hasta niveles iguales al control sugiriendo que es necesaria una activación basal de la vía de la PI3K para que el GDNF pueda promover la diferenciación de las neuronas estriatales. Este nivel de activación basal de la vía de la PI3-K podría estar regulado por la presencia de otros factores en el medio de cultivo.

En ambos trabajos hemos observado que la activación de la vía de la p42/p44 MAPK está implicada de forma diferente en la arborización de las neuronas GABAérgicas o calbindina-positiva. La presencia del inhibidor de esta vía bloqueaba por completo los efectos del BDNF sobre las neuronas calbindina-positiva pero no los efectos sobre las neuronas GABAérgicas. Además, los efectos del GDNF, que únicamente activa la vía de la p42/p44 MAPK, eran mayores sobre las neuronas calbindina-positivas. Estos resultados sugieren que la activación de la vía de la p42/p44

MAPK tiene un papel más importante en estadios avanzados de la maduración. De acuerdo con estos resultados se ha asociado la activación de esta vía con funciones más maduras de las neuronas como la formación de espinas dendríticas en procesos de plasticidad sináptica (Goldin y Segal, 2003) o en procesos de aprendizaje y memoria (Mazzuchelli y col., 2002). También los resultados obtenidos en ambos trabajos indican que la activación de la vía de la PI3-K es importante para la supervivencia de las neuronas estriatales. El BDNF, pero no el GDNF, era capaz de promover la supervivencia de las células estriatales de acuerdo con resultados anteriores (Stroppolo y col., 2001), efecto que era únicamente bloqueado en presencia del inhibidor de la Akt. En la figura 10 se resumen los resultados obtenidos en los trabajos 1 y 2.

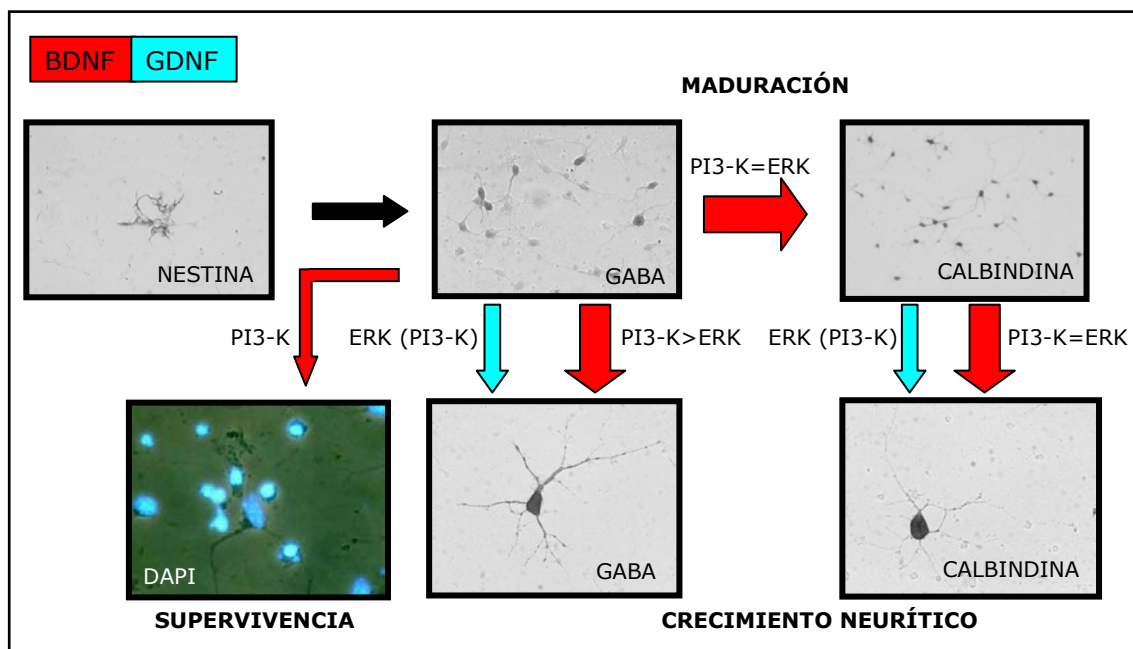


Figura 10.- Vías de señalización intracelular implicadas en los efectos del BDNF y GDNF sobre cultivos primarios estriatales

El BDNF promueve la maduración de las neuronas GABAérgicas incrementando la expresión de calbindina. Este efecto estaría mediado por la vía de la PI3-K y la p42/p44 MAPK. A su vez, también aumenta el grado de arborización dendrítica y la longitud del axón en la población GABAérgica a través de la activación de las dos vías, aunque la vía de la p42/p44 MAPK parece ser más importante en estadios más maduros. Por último el BDNF tiene la capacidad de promover la supervivencia neuronal a través de la vía de la PI3K. Por otro lado, el GDNF sólo es capaz de inducir un incremento en la diferenciación de ambas poblaciones neuronales. El efecto del GDNF estaría mediado por la vía de la p42/p44 MAPK aunque se requiere cierto nivel basal de activación de la vía PI3-K para que se pueda producir dicho efecto (representado en paréntesis).

1.2.- Efecto de la BMP-6 sobre las neuronas estriatales en cultivo

Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado el efecto de la BMP-2 y la BMP-7 sobre las células estriatales *in vitro* (Gratacos y col., 2001a, b). Los resultados indicaban que sólo la BMP-2 era capaz de promover la maduración de las neuronas estriatales hacia células calbindina-positiva, además de promover su arborización dendrítica. Los efectos tróficos de la BMP-2 estaban mediados por el BDNF ya que el uso de anticuerpos que bloquean su receptor específico, el TrkB, bloqueaba a su vez los efectos de la BMP-2. La BMP-7, no obstante, no producía ningún efecto sobre las distintas poblaciones neuronales estriatales, pero sí inducía la proliferación glial del cultivo, al igual que la BMP-2.

Después de estos resultados previos consideramos interesante estudiar qué efectos podría ejercer la BMP-6, una BMP un tanto atípica, ya que no induce la formación del hueso (Celeste y col., 1990). Los resultados del trabajo 3 indican que la BMP-6 induce el fenotipo calbindina en las neuronas estriatales en cultivo, disminuyendo el número de precursores neurales que expresan la nestina e incrementando la expresión de calbindina. Trabajos anteriores también muestran como el tratamiento de precursores neurales con BMPs induce la diferenciación neuronal (Mabie y col., 1999; Brederlau y col., 2002; Chang y col., 2003). Además del efecto sobre los precursores neurales, también promovió el crecimiento dendrítico de las neuronas que expresan la calbindina. Ambos efectos sobre las células calbindina-positiva se alcanzan a la misma dosis (10 ng/ml), a diferencia de los efectos de la BMP-2, la cual a una dosis de 0,1 ng/ml era capaz de incrementar la arborización neurítica, pero necesitaba una dosis más elevada (10 ng/ml) para incrementar el número de células calbindina-positiva (Gratacos et al., 2001a). Estos resultados sugieren que la activación de cascadas de señalización depende de la concentración de ligando o del número de receptores presentes. Corroborando nuestra interpretación, el mecanismo por el cual actúa la BMP-6 sobre las neuronas calbindina difiere del utilizado por la BMP-2, ya que los efectos de la BMP-6 están mediados por la glía y no por el BDNF como en el caso de la BMP-2. La adición en el cultivo del agente anti-mitótico 5-fluorodeoxyuridina (FdU) bloqueó el efecto de la BMP-6 sobre las células calbindina-positiva pero no el de la BMP-2, y contrariamente, la proteína de fusión TrkB-IgG sólo fue capaz de bloquear el efecto de la BMP-2. Se ha demostrado en varios modelos *in vitro* que las BMP son

potentes inductoras de la proliferación glial (Gross y col., 1996; Mabie y col., 1997; Jordan y col., 1997; Galter y col., 1999; Hattori y col., 1999; Reiriz y col., 1999; Gratacos y col., 2001a). El incremento de la proliferación glial no siempre implica que esté mediando los efectos de las BMP sobre las poblaciones neuronales, ya que por ejemplo la BMP-7 promueve dicha proliferación en los cultivos primarios estriatales y en cambio no ejerce ningún efecto sobre las neuronas (Gratacos y col., 2001a). La hipótesis de que la glía actúa como mediadora de los efectos de la BMP-6 se reforzó tras observar que un tratamiento con BMP-6 durante 24 h (en vez de 7 días) no era suficiente para ejercer efectos sobre las neuronas estriatales. Una vez conocidos estos efectos, en un futuro sería interesante analizar si la BMP-6 puede tener efectos sinérgicos con otros factores tróficos, al igual que han demostrado otros grupos (Kobayashi y col., 1998; Reiriz y col., 2002; Althini y col., 2004; Nonner y col., 2004). En la figura 11 se resumen los efectos de las tres BMP analizadas en el laboratorio, siendo la BMP-6 la que se ha estudiado en esta tesis.

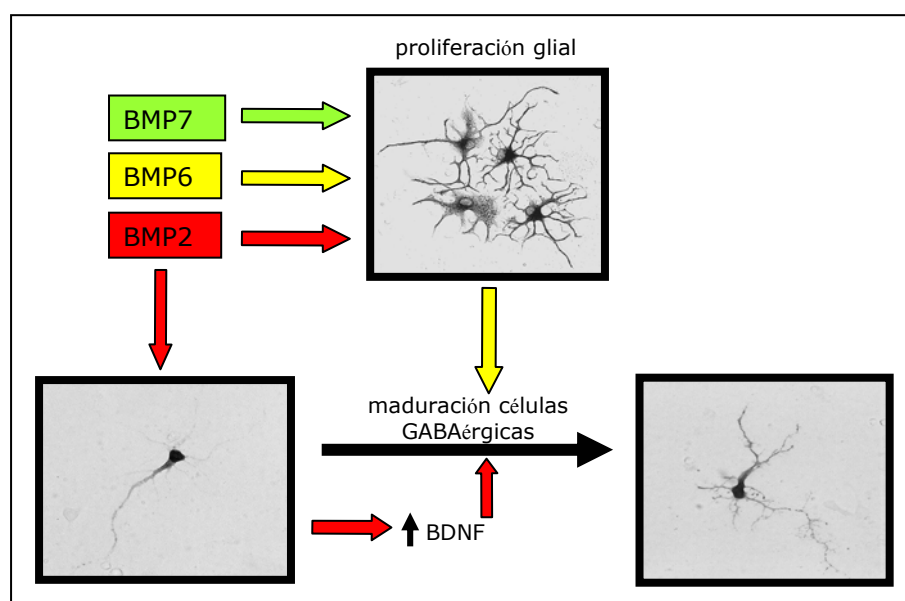


Figura 11.- Efectos de la BMP-2, BMP-6 y BMP-7 sobre el cultivo primario de células estriatales

Las tres BMP promueven la proliferación glial, aunque sólo la BMP-2 y la BMP-6 son capaces de inducir un incremento del número de neuronas calbindina-positiva así como de promover su arborización dendrítica. Los efectos de la BMP-2 sobre la población GABAérgica están mediados por BDNF y en cambio la BMP-6 actúa a través de la glía.

1.3.- Hipótesis sobre la implicación de los distintos factores tróficos analizados sobre el desarrollo de las distintas poblaciones estriatales

El estudio de los efectos del BDNF, del GDNF y de la BMP-6 nos revela una dependencia diferencial de las células GABAérgicas por estos factores tróficos. En referencia a la maduración de las neuronas ya se ha comentado anteriormente que en etapas tempranas del desarrollo las células presentan un marcaje positivo para el marcador nestina, el cual corresponde a un marcaje de precursor neural (Dahlstrand y col., 1995). Cuando las células avanzan en el proceso de maduración van adquiriendo otros marcadores neuronales específicos de una determinada población neuronal. En nuestro modelo, aproximadamente un 70 % expresan el marcador GABA, correspondiendo estas células a las neuronas de proyección estriatales. No obstante, no podemos descartar que otras neuronas adquieran otros marcadores específicos de interneuronas aunque representarían menos de un 3 % de la población total estriatal (Kawaguchi y col., 1995). Las neuronas GABAérgicas de proyección todavía pueden alcanzar otro paso más avanzado de maduración, ya que además del GABA pueden expresar la proteína quelante de calcio calbindina (Celio, 1990). En nuestro modelo *in vitro* esta población representa alrededor de un 8% de la población total, de acuerdo con estudios previos (Ventimiglia et al., 1995), mientras que *in vivo* llega a alcanzar un 90%, lo que significa que prácticamente todas las neuronas GABAérgicas expresan también la calbindina en la etapa adulta (Gerfen, 1992).

Nuestros resultados muestran que la BMP-6 provoca una disminución de un 58 % en el número de nestinas del cultivo, lo que significa que actúa en etapas bastante tempranas del desarrollo. Además, el hecho que incrementa el número de neuronas calbindina-positiva sin variar ni el número de células totales ni el de células apoptóticas demuestra que induce la diferenciación de las neuronas estriatales en cultivo descartando su efecto sobre la proliferación y la supervivencia, respectivamente. Por el contrario, el BDNF podría actuar en etapas más tardías del desarrollo ya que sólo aumenta el número de células que expresan calbindina sin afectar a la población de células nestina-positiva, ni a las células totales ni a las neuronas GABAérgicas, lo que significa que está promoviendo la expresión de calbindina en las células GABAérgicas. Los resultados obtenidos utilizando el GDNF demuestran que sólo es capaz de actuar incrementando la arborización dendrítica de las neuronas GABAérgicas y de las

calbindina-positiva, es decir, en una etapa bastante tardía de la maduración de estas células. Además, la expresión de los receptores para estos tres factores concuerda con el patrón de acción que proponemos. Así pues, el receptor para la BMP-6 se ha detectado ya a E16 (Hattori y col., 1999), mientras que el TrkB es máximo a E20 y va disminuyendo en las etapas postnatales (Jung y Bennett, 1996). En cambio, GFR α 1 alcanza su pico máximo de expresión a P10 y P14 (Cho y col., 2004). Todos estos resultados permiten proponer la siguiente hipótesis esquematizada en la figura 12, donde creemos que la BMP-6 podría estar actuando durante las primeras etapas del desarrollo del núcleo estriado, más tarde actuaría el BDNF y por último el GDNF.

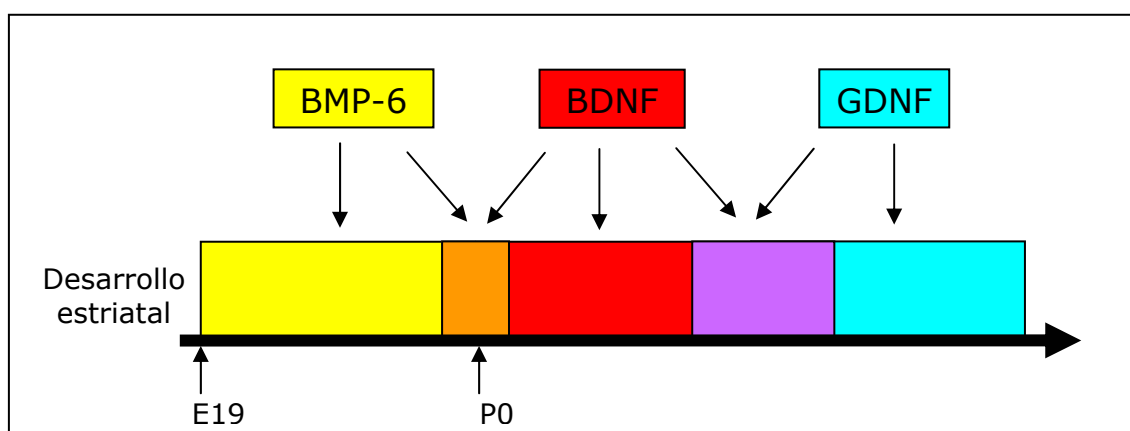


Figura 12.- Hipótesis sobre la implicación de los factores tróficos analizados sobre la maduración de las neuronas estriatales

En el modelo que proponemos sobre la actuación de los diferentes factores tróficos analizados, la BMP-6 sería la primera proteína que actuaría y podría solaparse con el BDNF. Éste, sería el segundo en actuar, y podría solaparse también con la BMP-6 y/o el GDNF, y por último el GDNF produciría sus efectos sobre la maduración final de las neuronas estriatales.

2.- EL BDNF PROTEGE A LAS NEURONAS ESTRIATALES DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA INDUCIDA POR KA O QUIN A TRAVÉS DE LA VÍA DE LA PI3-K Y LA REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE LA BCL-2

Los estudios de los efectos biológicos de los factores tróficos sobre las células estriatales en cultivo muestran que el BDNF es el único factor trófico analizado capaz de incrementar la supervivencia. Además en estudios previos realizados en nuestro

laboratorio observamos que este factor era el más potente protegiendo a las células estriatales frente a la excitotoxicidad inducida por la activación de los receptores NMDA y no-NMDA en el núcleo estriado (Perez-Navarro y col., 2000a; Gratacos y col., 2001c). Todas estas observaciones nos sugirieron analizar más en profundidad qué mecanismos intracelulares podían estar implicadas en este efecto neuroprotector (trabajo 4).

En primer lugar analizamos si la dosis inyectada de QUIN y KA inducía una muerte neuronal apoptótica. Utilizando la técnica de TUNEL observamos que algunas de las células que se morían tras la inyección de QUIN o KA presentaban una morfología apoptótica. Estudios previos a nuestro trabajo muestran que después de una lesión con QUIN (Hughes y col., 1996; Bordelon y col., 1999; Wei y col., 2002) o KA (Ferrer y col., 1995; Lok y Martin, 2002) la muerte que se produce puede ser necrótica o apoptótica dependiendo de la dosis utilizada.

En el primer trabajo de la tesis, observamos que el efecto del BDNF sobre la supervivencia de las neuronas estriatales *in vitro* estaba mediado por la activación de la vía de la PI3-K. Al analizar los niveles de Akt fosforilada observamos que tanto la inyección de QUIN como la de KA inducía una disminución de dichos niveles, que era bloqueada por el trasplante de fibroblastos secretores de BDNF, así como por la inyección de un antagonista del receptor NMDA, el MK-801, o del receptor no-NMDA, el CNQX. De acuerdo con estos resultados, estudios previos han demostrado una disminución de los niveles de Akt fosforilada en respuesta a la estimulación de receptores del glutamato (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; Luo y col., 2003) y que algunos agentes protegen de la muerte celular activando la vía de la PI3-K (Sawada y col., 2000; Yamagishi y col., 2003; Almeida y col., 2005). Una de las funciones que se ha atribuido a la Akt es la regulación de distintos miembros de la familia de la Bcl-2 (Datta y col., 1997; Riccio y col., 1999). Además, algunos factores tróficos regulan la expresión de miembros anti-apoptóticos de la familia de la Bcl-2 (Allsopp y col., 1995; Tamatani y col., 1998; Rong y col., 1999; Sawada y col., 2000; Ghribi y col., 2002). Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar la regulación de tres proteínas de esta familia, Bcl-2, Bcl-x_L y Bax, por excitotoxicidad y en presencia de BDNF.

La inyección de QUIN inducía un incremento a corto plazo de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 pero no de Bcl-x_L, y en cambio la inyección de KA provocaba un

aumento de ambas proteínas. A tiempos más largos ambas proteínas descendían drásticamente tras la inyección de QUIN o KA. Este aumento inicial puede ser interpretado como una respuesta de las células para protegerse frente a la lesión, de acuerdo con trabajos anteriores del laboratorio, en los cuales se había observado un incremento en la expresión de algunos factores tróficos y de sus receptores tras una lesión excitotóxica (Canals y col., 1998, 1999; Marco y col., 2002a). Aunque las células responden incrementando estas proteínas anti-apoptóticas para intentar sobrevivir, finalmente no lo consiguen y posteriormente los niveles de Bcl-2 y Bcl-x_L disminuyen, tal y como se ha demostrado en otros modelos de lesión (Krajewski y col., 1995; Sato y col., 1998; Tamatani y col., 1998; Ghribi y col., 2002; Wei y col., 2002). Los niveles de Bax no se modificaron por la inyección de KA pero aumentaron tras la inyección de QUIN, indicando que los efectos de los agonistas del receptor NMDA y no-NMDA eran diferenciales. La importancia de la proteína Bax en la muerte inducida por QUIN o por KA se demostró utilizando animales deficientes para Bax. En estos animales observamos que el volumen de la lesión tras la inyección de QUIN o KA era menor en comparación a los animales control, aunque la reducción del volumen de la lesión era mayor tras la lesión con QUIN. Estos resultados demuestran que la proteína Bax es importante para la muerte neuronal tras la excitotoxicidad inducida por ambos agonistas, aunque parece tener más importancia después de una sobreestimulación del receptor NMDA. La resistencia de las neuronas de los ratones deficientes para Bax ante determinados estímulos se ha demostrado ampliamente. El primer estudio de estas características se realizó en células simpáticas de ratones KO para Bax, demostrando su resistencia ante la privación de factor trófico (Deckwerth y col., 1996). Además, las neuronas corticales de animales deficientes para Bax presentan resistencia frente a la excitotoxicidad *in vitro* (Xiang y col., 1998), las motoneuronas son resistentes a diferentes estímulos apoptóticos (Bar-Peled y col., 1999; Kinugasa y col., 2002), y las neuronas dopaminérgicas a la lesión con MPTP (Vila y col., 2001). En un estudio realizado en el núcleo estriado se muestra que la lesión inducida por anfetaminas promueve la muerte de las neuronas de proyección estriatales, pero las células del ratón KO para Bax presentan resistencia ante este estímulo apoptótico (Krasnova y col., 2005).

Así pues nuestros resultados indican una regulación diferencial de las proteínas de la familia de la Bcl-2 según se estimulen los receptores NMDA o no-NMDA, fenómeno que también hemos observado sobre la dimerización entre estas proteínas. Tal

como se ha mencionado en la introducción, estas proteínas pueden estar reguladas a través de la dimerización, además de otros posibles mecanismos. En este punto pensamos que sería interesante analizar si había cambios en los dímeros de Bax con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L. La inyección de KA indujo una disminución de los dímeros Bax:Bcl-2 y Bax:Bcl-x_L, mientras que la inyección de QUIN únicamente varió los niveles de los dímeros Bax:Bcl-2, lo que demostraba la diferente implicación de los miembros de la familia de la Bcl-2 en la muerte inducida por la inyección de QUIN o de KA. Se ha demostrado que los niveles de los heterodímeros pueden variar en función del estímulo recibido, por ejemplo tras un estímulo con MPTP se produce un incremento de Bax y una disminución de Bcl-2 que comporta una reducción de los niveles de Bax:Bcl-2 (Vila y col., 2001). Cabe destacar pero, que aunque la señalización o la implicación de algunos miembros de la familia de la Bcl-2 en nuestro modelo sean distintas dependiendo del receptor del glutamato activado, al final las células se mueren por apoptosis a través de la activación de la caspasa 3.

La administración de BDNF exógeno antes de la inyección de los agonistas de los receptores de glutamato previene la disminución de las proteínas Bcl-2 y Bcl-x_L y el incremento de Bax, así como el cambio en los niveles de los heterodímeros. El hecho que el BDNF prevenga los cambios de estas proteínas junto con el bloqueo que habíamos observado a nivel de la Akt, sugiere que esta quinasa tiene como dianas, de manera directa o indirecta, estos miembros de la familia de la Bcl-2 tras una lesión excitotóxica estriatal. No obstante tampoco se puede descartar que otras vías estén implicadas en los efectos protectores del BDNF, como por ejemplo la vía de la ERK/MAPK, tal como se ha demostrado en células hipocámpales (Almeida y col., 2005), en neuronas granulares del cerebelo (Wu y col., 2004) o en neuronas corticales (Hetman y col., 1999; Han y Holtzman, 2000). En la figura 13 están esquematizados los resultados del cuarto trabajo.

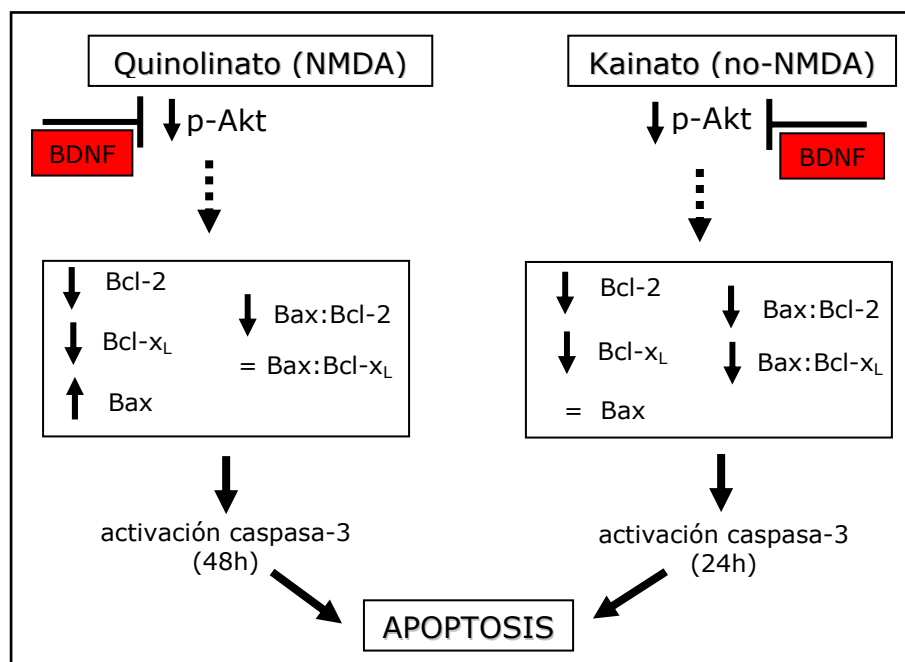


Figura 13.- Proteínas implicadas en la excitotoxicidad inducida por QUIN o KA en el núcleo estriado y efecto neuroprotector del BDNF

3.- IMPLICACIÓN DE BAX DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL Y EN LA MUERTE INDUCIDA POR EXCITOTOXICIDAD EN EL NÚCLEO ESTRIADO

Los resultados del trabajo 4 habían demostrado un papel diferencial de Bax ante la lesión excitotóxica inducida por QUIN o KA. Además, junto con el hecho que el ratón deficiente para Bax no presente anomalías severas en el cerebro (White y col., 1998) nos indujo a examinar otras proteínas que quizás podrían estar sustituyendo a Bax durante el desarrollo postnatal del núcleo estriado y de la corteza cerebral, zonas que degeneran en la corea de Huntington. La mayoría de trabajos realizados en el ratón KO para Bax se han basado en el estudio de las motoneuronas (Deckwerth y col., 1996; White y col., 1998; Bar-Peled y col., 1999) y también en el de las células simpáticas (Deckwerth y col., 1996; Putcha y col., 2002). Así pues, no existen datos en referencia al núcleo estriado y a la corteza cerebral.

Inicialmente analizamos los niveles de Bax en ambas zonas durante el desarrollo postnatal (P3, P7, P15, P21) y en el adulto. Observamos que los niveles de Bax presentaban un patrón similar en ambas zonas con niveles de expresión elevados entre P3 y P7, de acuerdo con el pico de muerte natural que se produce en el núcleo estriado (Fishell y Van der Kooy, 1991) y en la corteza cerebral (Spreafico y col., 1995) durante el desarrollo postnatal. El hecho de que no hubiera anormalidades en el número de células ni en el núcleo estriado ni en la corteza en el ratón KO para Bax adulto, sugirió que quizás existía una compensación por parte de otras proteínas de la misma familia. Ya se ha mencionado anteriormente que se pueden dar mecanismos compensatorios (Harlin y col., 2001) o de redundancia funcional (Lindsten y col., 2000; Zheng y col., 2000; Wei y col., 2001) entre distintas proteínas de la familia de la Bcl-2, así pues el siguiente paso que nos planteamos fue analizar los niveles de expresión de algunas proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x_L) y pro-apoptóticas (Bak, Bad y Bim) durante el desarrollo postnatal así como en ratones adultos. Nuestra hipótesis inicial era que probablemente encontraríamos una regulación similar de las proteínas de la familia de la Bcl-2 ya que Bax presentaba un patrón similar en ambas zonas. En cambio, observamos que Bak únicamente aumentaba en la corteza cerebral a P3 y que Bim estaba incrementado en ambas zonas pero siguiendo un patrón distinto. De acuerdo con estos resultados se ha demostrado que Bax tiene un papel diferente en distintas poblaciones neuronales del cerebelo (Fan y col., 2001). Aunque no observamos cambios generalizados en los niveles de Bak, la proteína por excelencia con una función más similar a Bax (Lindsten y col., 2000), pensamos que esta proteína puede estar mediando la muerte neuronal durante el desarrollo que se produce en los ratones deficientes para Bax sin necesidad de presentar unos niveles incrementados, como habíamos observado en los animales lesionados con KA, donde Bax no incrementaba pero sí variaban los dímeros (trabajo 4). En este caso pues, quizás estos animales presenten una distinta oligomerización de Bak aunque los niveles totales no se vean modificados. Respecto a Bim, tal y como se ha mencionado anteriormente, podría tener una función específica dependiendo del tipo neuronal ya que existe una regulación diferencial en la corteza cerebral y en el núcleo estriado. Quizás en la corteza Bim podría contribuir a la apoptosis durante el desarrollo, mientras que en el núcleo estriado el balance entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas podría determinar la muerte neuronal durante el desarrollo y Bim podría estar más implicada en el adulto, en respuesta a la muerte inducida por estímulos nocivos. Una posible explicación para el aumento de la

expresión de Bim que se observa en los animales deficientes para Bax podría ser que en estos animales existiera alguna deficiencia en el proteosoma que comportaría el aumento de Bim. Se ha demostrado que la inhibición del proteosoma en células simpáticas induce un incremento de Bim que conduce a una muerte dependiente de Bax (Lang-Rollin et al., 2004).

Una vez descrito el papel de otras proteínas de la familia de la Bcl-2 durante el desarrollo postnatal del ratón KO para Bax analizamos la funcionalidad de estos cambios en respuesta a una lesión excitotóxica inducida por la inyección intraestriatal de QUIN. Hemos observado que tras la inyección intraestriatal de QUIN se produce un aumento significativo de Bim que es similar en ambos genotipos analizados. Estos cambios quizás sugieren por una parte que, al ser una proteína que actúa antes que Bax en la cascada de señalización intracelular (Huang y Strasser, 2000) no se ve afectada por la ausencia de esta última y por eso encontramos un incremento similar. Por otra parte, también se puede pensar que el aumento de Bim que se observa en los animales adultos KO para Bax tanto en la corteza cerebral como en el núcleo estriado no está implicado o no parece influir en la respuesta de las células ante la excitotoxicidad, debido al incremento similar observado en los dos genotipos. Esta hipótesis se debería confirmar realizando más experimentos de localización de Bim. Lo novedoso de este trabajo es que no hay ningún otro estudio que analice el papel de Bim ante la excitotoxicidad en el núcleo estriado. De hecho la importancia de Bim ante lesiones excitotóxicas *in vivo* solo se ha analizado en modelos de epilepsia inyectando KA en los ventrículos laterales o en el núcleo basolateral de la amígdala (Korhonen y col., 2003; Shinoda y col., 2004). Estos trabajos presentan resultados contradictorios, ya que el grupo de Korhonen y colaboradores demuestra una disminución de Bim tras la lesión, relacionándola con otras posibles vías que pueden estar regulando a Bim, como JNK o el factor de transcripción forkhead (Dijkers y col., 2000; Putcha y col., 2001; Whitfield y col., 2001). Contrariamente, Shinoda y colaboradores demuestran un incremento de Bim, de acuerdo con nuestros resultados. Además, este último grupo observa una activación de Bim por parte del factor de transcripción forkhead el cual a su vez, es regulado negativamente a través de la fosforilación de Akt. Podemos especular pues que el incremento de Bim que observamos en nuestro modelo podría ser debido, en parte, a la disminución de los niveles de Akt fosforilada tras la inyección de QUIN, de acuerdo también con nuestros resultados del trabajo 4. Además del incremento de Bim tanto en

los animales control como en los que carecen de Bax, también existe un aumento de la expresión de Bak y de Bcl-x_L solo en los ratones KO para Bax. La figura 14 corresponde a la hipótesis que proponemos basándonos en los resultados del trabajo 5.

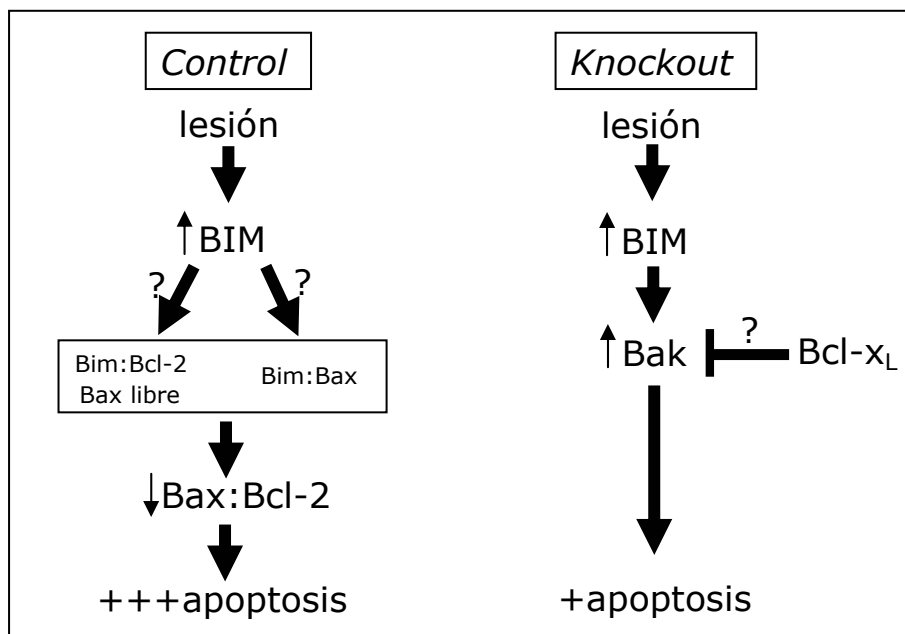


Figura 14.- Hipótesis de la regulación de las proteínas de la familia de la Bcl-2 frente a la excitotoxicidad inducida por QUIN

En un animal control que tiene Bax, Bim se uniría a Bcl-2 y desplazaría a Bax (Bouillet y col., 2001; Cheng y col., 2001; Putcha y col., 2002), provocando la disminución de los dímeros Bax:Bcl-2 y promoviendo la apoptosis, aunque también se ha demostrado que Bim se puede unir directamente a Bax para promover la muerte apoptótica (Marani y col., 2002; Harada y col., 2004; Kuwana y col., 2005). Sólo en ausencia de Bax observamos un incremento de la expresión de Bak y un aumento de los niveles de Bcl-x_L, sugiriendo un posible papel redundante de Bak intentando provocar la muerte de las neuronas estriatales. En este punto quizás Bcl-x_L se uniría a Bak para bloquear su efecto pro-apoptótico, de acuerdo con la reducción del volumen de la lesión que encontramos en los ratones knockout para Bax, ya que si no la lesión sería similar en ambos genotipos. Además, se ha demostrado que el “compañero” más afín a Bak es Bcl-x_L (Chittenden y col., 1995; Sattler y col., 1997). Otra posible explicación es que Bak necesite a Bax para poder formar oligómeros como se ha descrito en otros modelos (Mikhailov y col., 2003), demostrando el papel esencial de Bax en la muerte excitotóxica.