



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS

# Fisiología

• Boletín Informativo de la SECF · Volumen 8 · nº 2 Abril 2006

## • TITULARES

### • XXXIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.

Informe del Comité Organizador.

### • LIBERACIÓN DE VESÍCULAS SINÁPTICAS EN EL TERMINAL DE LAS NEURONAS BIPOLARES DE LA RETINA.

Artur Llobet.

### • MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN PREOVULATORIA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE POR EL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN EL GONADOTROPO.

José E. Sánchez-Criado.

### • HOMEOSTASIS DEL IÓN CALCIO EN CÉLULAS NO EXCITABLES. PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Juan A. Rosado, Antonio González, Ginés M. Salido y José A. Pariente.

### • ANÁLISIS ESPECTRAL EN LAS NEURONAS DEL COLÍCULO INFERIOR EN LA RATA.

Olga Hernández, Salvatore Cristaudo, David Pérez-González, Marco A. Izquierdo y Manuel S. Malmierca.

### • LAS VIAS ESTROGÉNICAS ALTERNATIVAS COMO POTENCIADORES DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL: POSIBLEMENTE PROMETEDORAS PERO CIERTAMENTE COMPLEJAS.

Raquel Marín y Mario Díaz.

### • AUDIOLOGÍA: UNA CARENCIA INCOMPENSABLE.

Enrique A. López Poveda.

### • PAUL BROCA: FRENOLOGÍA Y CIENCIA.

Emilio Fernández-Espejo.

## SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**Presidente:** Rafael Alonso (ralonso@ull.es).

**Presidente electo/Delegado FEPS:**

Constancio Gonzalez (constanc@ibgm.uva.es).

**Presidente Saliente:** Salvador González-Barón (sgonzalez@uma.es).

**Secretario:** Andrés Morales (andres.morales@ua.es).

**Tesorero:** Javier Salazar (salazar@um.es).

**Vocal:** Rafael Fernández Chacón (rfchacon@us.es) / Javier Cudeiro (jcu@udc.es).

Direcciones de contacto en [www.seccff.org](http://www.seccff.org) · D.L.:SE-321-2000.

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.

### A. Remisión de originales.

La remisión de originales se hará exclusivamente por correo electrónico a la dirección del editor o de cualquiera de los miembros del comité editorial. Se puede utilizar cualquier procesador de texto, programa y formato gráfico, aunque es preferible remitir el manuscrito en formatos usuales. En todo caso deben indicarse en la carta de remisión los formatos empleados para texto, tablas, gráficos y fotografías. La utilización de formatos poco usuales retrasará la publicación. En caso de emplear algún sistema de compresión para fotografías o gráficos, debe comprobarse que la descompresión no

## • Editor •

Ángel Nadal Navajas, Departamento de Fisiología e Instituto de Bioingeniería Universidad Miguel Hernández, Elx, Alicante 03202.  
Teléfono: 965 222 002, Fax: 966 658 511, e-mail: [nadal@umh.es](mailto:nadal@umh.es)

## • Comité editorial •

Fernando de Castro (Salamanca, [fdecastro@usal.es](mailto:fdecastro@usal.es)), Mónica de la Fuente (Madrid, [mondela@bio.ucm.es](mailto:mondela@bio.ucm.es)), Esther Fuentes (Elx, [efuentes@umh.es](mailto:efuentes@umh.es)),  
Cristina Ripoll (Elx, [ripollcr@umh.es](mailto:ripollcr@umh.es)), José E. Sánchez-Criado (Córdoba, [fi1sarcj@uco.es](mailto:fi1sarcj@uco.es)), Javier Salazar (Murcia, [salazar@um.es](mailto:salazar@um.es)),  
Carlos Villalobos (Valladolid, [carlosv@ibgm.uva.es](mailto:carlosv@ibgm.uva.es)).



Microscopio directo para experimentos de Patch-clamp

# ECLIPSE FN1

## Profundice más en su muestra

El microscopio Eclipse FN1 le permitirá llevar sus aplicaciones electrofisiológicas a nuevos horizontes

- El objetivo Plan 100x W (AN 1.1, WD 2.5mm) es el primer objetivo de inmersión en agua con anillo de corrección. Este anillo corrige la aberración esférica permitiendo compensar la variación de temperatura fisiológica y del espesor de la muestra. Asimismo mantiene una excelente transmisión en el infrarrojo.
- El nuevo objetivo de larga distancia de trabajo CFI75 LWD 16x W permite visualizar el área total de la muestra. En combinación con el módulo de magnificación es posible, de forma fácil, cambiar a altos aumentos y alta resolución sin cambiar el objetivo.

- El diseño del microscopio y de los objetivos, más finos y delgados, permite tener más espacio para el manejo de los electrodos.
- Todos los objetivos dedicados a patch-clamp están libres de aberración cromática desde el visible hasta la región del IR.
- Virtualmente desprovisto de ruido eléctrico y con manejo libre de vibraciones.



Ejemplo de sistema: configuración con equipo de manipulación Narishige

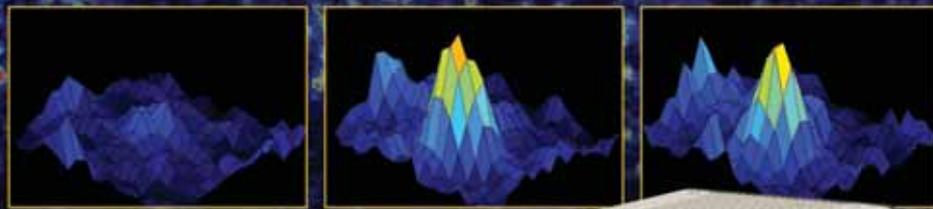
IZASA S.A.  
C/ Aragonese 13, Polígono Industrial de Alcobendas  
28108 Alcobendas (Madrid)  
Tel.: 902 20 30 80 - Fax: 902 20 30 81

[www.izasa.es](http://www.izasa.es) - E-mail: [dac2@izasa.es](mailto:dac2@izasa.es)

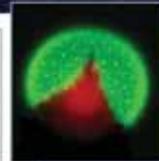
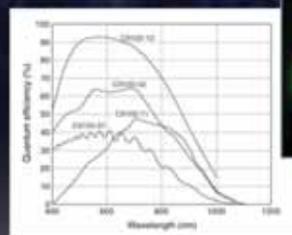
Brand New

# Megapixel EMCCD Camera

Did you ever dream of having really a 1k x 1k ultra high sensitive camera? Neither the distorted images form the image intensifiers nor the thumbnail sized images from the Electron Multiplying Cameras?



"Dr. G. I. Mashanov, MRC Natl. Inst. Med. Res. UK  
("GMview" Image Processor), rec. with C9100-11."



## C9100-02

- Megapixel Resolution
- High Gain
- Very Low Read out Noise
- High Speed (More than 30 MHz Pixel Clock)
- High Quantum Efficiency

### Additional features of these on-Chip Gain Cameras:

- Resistance against Overexposure
- High Image Repetition Rates
- Backthinned 512 x 512 Type available

### Applications:

- Single Molecule Fluorescence
- Intracellular Imaging
- High Speed Fluorescence Imaging
- Intravital Microscopy

*Photon is our business*

Hamamatsu Photonics France S.A.R.L.

Spain-Portugal

Tel.: +34 (0) 93 582 44 30, Fax: +34 (0) 93 582 44 31

e-mail: [spain@hamamatsu.com](mailto:spain@hamamatsu.com), [www.hamamatsu.es](http://www.hamamatsu.es)

deteriora la calidad de las imágenes. La carta de remisión debe incluirse en el cuerpo del mensaje electrónico y el original y las figuras en forma de archivos anexos. El texto del artículo debe adjuntarse como un único archivo, incluyendo la página con el título, el texto principal, bibliografía, etc. Cada tabla o figura debe remitirse en un anexo independiente, nombrando cada anexo con el nombre del primer autor y el número de tabla o figura que contenga (ejemplo: Cunqueiro-Fig.1).B. Composición de los originales.

### B. COMPOSICIÓN DE LOS ORIGINALES.

#### 1. Primera página.

Título, Autores, Filiación de los autores y Autor y dirección para correspondencia si procede (incluir números de teléfono y fax, y una dirección de correo electrónico).

#### 2. Segunda página.

Sumario, si procede, en una extensión no superior a 200 palabras, en el mismo idioma que el resto del artículo.

#### 3. Cuerpo del texto.

Los artículos no deberán sobrepasar las 2.500 palabras e irán en folios numerados. Deberán estar escritos en un estilo claro y con pretensión divulgativa, de forma que puedan ser entendidos por cualquier fisiólogo, independientemente de su área de especialización. El procedimiento más simple es tomar como ejemplo cualquier artículo publicado previamente en Fisiología. En caso de no disponer de ningún ejemplar, puede solicitarse a cualquiera de los miembros del comité editorial o a la Secretaría ([andres.morales@ua.es](mailto:andres.morales@ua.es)) para ser incluido en la lista de distribución. Alternativamente, consultar los artículos de los números anteriores en <http://www.seccff.org>.

Los artículos podrán contener resultados ya publicados, siendo entonces responsabilidad exclusiva de los autores obtener los permisos correspondientes de las revistas o libros donde hayan sido publicados originalmente. Debido a la pretensión divulgativa, cada autor podrá organizar el texto en la forma que crea más oportuna, si bien se sugiere una división en secciones que facilite su lectura.

#### 4. Otros.

**a.Notas.** (si las hubiere) y agradecimientos.

**b.Bibliografía.** Las referencias, muy seleccionadas, se insertarán en el cuerpo del texto entre paréntesis (ejemplo: Chacón y Mairena, 1999). La relación completa de referencias bibliográficas deberá incluirse al final del texto, por orden alfabético y cronológico, de acuerdo a los formatos más habituales. Ejemplo: Gómez J, Belmonte J (1910) Deciphering bullfighting. J Tauroom 57: 200-235.

**c.Pies de figuras.** Deberán incluirse a continuación de la bibliografía y en páginas aparte.

**d.Figuras.** Su número no deberá ser superior a 2-3 por artículo, y el tamaño máximo aceptado será el de una hoja impresa (DIN-A4). No se publicaran imágenes en color. En el caso de figuras previamente publicadas, si fuere necesario, deberá acompañarse autorización para su reproducción en Fisiología.

# XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sponsor Simposia en asociación con la Physoc y la Sociedad Holandesa de Fisiología.

Sevilla, 10 al 13 de febrero de 2005.

El XXXIII Congreso de la SECF se celebró en Sevilla, del 10 al 13 de febrero de 2005. La Escuela Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad de Sevilla dio cabida al más numeroso, hasta la fecha, de los Congresos de nuestra sociedad: 477 participantes mostraron durante estos inolvidables días el auge creciente de la Fisiología en España.

El Congreso se organizó con la colaboración de la Physiological Society (Physoc) y la Dutch Society of Physiology. Un año antes de su celebración, la Physoc nos comunicó su intención de modificar la modalidad de su participación, siendo en esta ocasión un "Sponsor Symposia", en lugar de un "Joint Meeting" como había tenido lugar en Salamanca (1995), Liverpool (1998) y Puerto de la Cruz (2003). Técnicamente, la nueva modalidad implicaba cambios drásticos en la organización del evento: los miembros de la Physoc no asistirían a un Congreso sujeto a las reglas de la Physoc, sino a un Congreso donde sólo habría dos simposios organizados por científicos del Reino Unido y donde la Physoc seleccionaría a uno de los Conferenciantes de las Sesiones Plenarias. La Dutch Physiological Society estuvo abierta a la realización de un Joint Meeting, aunque, como se verá más adelante, la afluencia de científicos de Holanda fue escasa. A pesar de la reducción en la forma participativa de la Physoc y la Dutch Physiological Society, la respuesta de los fisiólogos españoles fue excelente, asistiendo de forma masiva a la llamada que se había realizado desde el Comité Organizador y desde la SECF. Como deferencia hacia nuestros invitados extranjeros (22%, 106 de 477), el XXXIII Congreso de la SECF se desarrolló íntegramente en inglés, como viene siendo tradicional en nuestro país cuando hay participación extranjera en este tipo de evento.

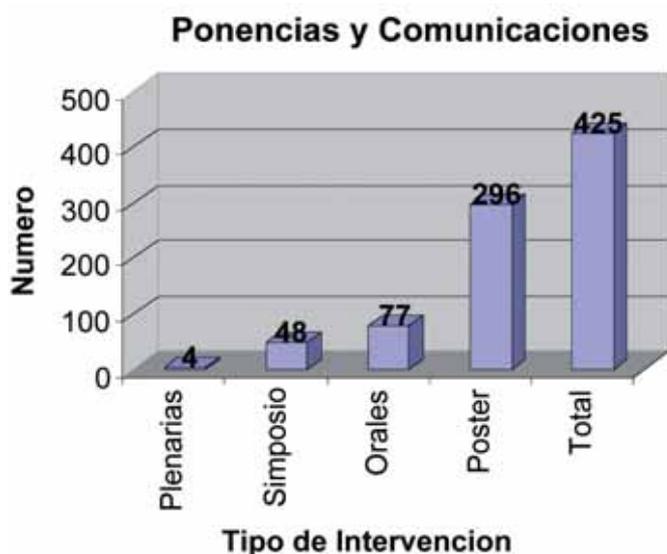
Simposio de Jóvenes Fisiólogos, en el que participaron jóvenes investigadores del Reino Unido y España y en donde se presentaron 39 comunicaciones (19 orales y 20 posters). Este Simposio de jóvenes investigadores fue propuesto e íntegramente financiado por la Physoc.

En total, se presentaron 425 comunicaciones, una cifra que refleja el crecimiento de la SECF y de la Fisiología en España.

Las 4 Conferencias Plenarias fueron impartidas por los Drs. Francisco Bezanilla (UCLA, Los Angeles, Estados Unidos), Bert Sakmann (Max Planck Institute, Heidelberg, Alemania), Manuel Mas (Universidad de La Laguna, España) y Chris Yeo (University College Londres, Reino Unido). El Dr. Francisco Bezanilla disertó sobre la permeación de iones de K<sup>+</sup> a través de canales iónicos específicos para este ión, y las modificaciones estructurales que se producen en dichos canales para que puedan penetrar a través de los mismos los iones de K<sup>+</sup>. Este trabajo, meticuloso y elegante, mostró una hipótesis alternativa y distinta para la permeación de iones de K<sup>+</sup> a la defendida por Roderick Mackinnon (Premio Nobel en Química en 2003). El Prof. Bert Sakmann (Premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1991) disertó sobre el acoplamiento excitación secreción en las sinapsis del sistema nervioso central. Mostró, en experimentos elegantísimos realizados en la sinapsis del cáliz de Held (núcleo medial del cuerpo trapezoide), cómo el sensor molecular que detecta el incremento de Ca<sup>2+</sup> ante la llegada de un potencial de acción, dispara la maquinaria secretora responsable de la liberación de glutamato en la hendidura sináptica. El Dr. Sakmann, en un alarde de honestidad científica, expresó su gratitud a Santiago Ramón y Cajal y realizó su generosidad, al permitir que Held nombrara esta sinapsis con su nombre, ya que había sido Cajal el primer neurocientífico en describirla. El Dr. Manuel Mas, Presidente Saliente de la SECF, impartió una conferencia magistral sobre el efecto del NO en el control de la musculatura lisa de los cuerpos cavernosos, y mostró evidencias de la valía y representatividad de la realidad que poseen los experimentos realizados "in vivo". Finalmente, el Dr. Chris Yeo disertó sobre la potencialidad de los registros electrofisiológicos para mostrar los fenómenos de memoria que tienen lugar en el cerebelo. Asimismo, mostró experimentos muy elegantes que sugieren que la proteína cinasa C participa en el desarrollo de la memoria que puede tener lugar en el cerebelo.

Los simposios organizados trataron sobre temas diversos:

1. Molecular mechanisms in stem cell biology (I y II).
2. Molecular biology and reproduction.
3. The physiological and pathophysiological regulation of ion-and-water channel transport in epithelial cells.
4. Mechanisms of cell migration, tissue invasion and remodelling.
5. Neurological and molecular basis of biological rhythms.
6. Compartmentalisation of cellular signalling.
7. New aspects of resistance artery and structure.
8. Oxygen radicals: Physiological and pathophysiological implications.
9. Functional significance of cerebellar circuitry.



**Figura 1.** Ponencias y comunicaciones totales presentadas durante los eventos del XXXIII Congreso de la SECF. Se han incluido en este gráfico las presentaciones del Simposio para Jóvenes Investigadores que se celebró el día 10 de febrero de 2005.

El contenido científico del Congreso contó con 4 Conferencias Plenarias, 10 Simposios con la participación de 48 ponentes y 334 Presentaciones Libres: 58 de forma oral y 276 en forma de poster. El 10 de febrero, día de apertura del Congreso y previo a la inauguración de éste, se celebró por primera vez un

Dos de los Simposios fueron "sponsorizados" íntegramente por la Physoc (3 y 7) con participación equilibrada entre ponentes españoles y extranjeros (12 ponentes ingleses, 4 holandeses, 1 francés, 1 canadiense, 1 sueco y 22 españoles).

Los simposios se desarrollaron en sesiones paralelas (dos simultáneamente) y en sesiones de mañana y tarde. La participación en dichos simposios fue desigual, dependiendo del simposio organizado en paralelo o del día de celebración. Asimismo, se celebró un Foro de Discusión sobre Integración Cardiorrespiratoria y dos "workshops", uno organizado por Investigadores Ramón y Cajal y otro que versó sobre el papel de la mujer en la Ciencia.

58 (17,3%) de las 334 comunicaciones libres presentadas al Congreso fueron seleccionadas para ser presentadas de forma oral. En esta elección se tuvo en cuenta la petición del participante, el interés potencial de la presentación y la disponibilidad de comunicaciones orales para organizar una sesión oral coherente. Se organizaron 10 sesiones de comunicaciones orales agrupadas bajo los siguientes epígrafes: 1) Canales iónicos, 2) Neuroendocrinología, 3) Músculo liso, 4) y 5) Señalización celular, 6) Fisiología placentaria y renal, 7) Neurofisiología integrativa, 8) y 9) Neurofisiología y 10) Fisiología vascular, respiratoria y endotelial.

Las 276 comunicaciones restantes se presentaron en forma de poster y fueron distribuidas en dos salones habilitados a tal efecto. Los posters presentados se agruparon en 19 sesiones distintas: 1) Canales iónicos, 2) Neuroendocrinología, 3) Músculo liso, 4) Señalización celular, 5) Fisiología placentaria y renal, 6) Neurofisiología integrativa, 7) Neurofisiología y 8) Fisiología vascular, respiratoria y endotelial, 9) Desarrollo y plasticidad, 10) Transporte epitelial, 11) Fisiología gastrointestinal, 12) Fisiología comparada, 13) Docencia de la fisiología, 14) Funciones sensoriales, 15) Sistema vegetativo, 16) Control respiratorio, 17) Contracción muscular, 18) Fisiología renal y perinatal, 19) Fisiología cardíaca.

En la Tabla 1 se muestra la distribución de comunicaciones en forma de poster en cada uno de los tópicos.

Sesión	Nº
Canales iónicos	17
Neuroendocrinología	45
Músculo liso	12
Señalización celular	36
Neurofisiología integrativa	11
Neurofisiología	28
Vascular/Endotelial	16
Desarrollo	6
Transporte epitelial	19
Gastrointestinal	20
Fisiología comparada	12
Docencia	3
Funciones sensoriales	10
Sistema vegetativo	4
Control cardiovascular	16
Contracción muscular	6
Placenta	8
Renal	2
Cardiovascular	5
<b>TOTAL</b>	<b>276</b>

Tabla I. Distribución del número de posters presentados por tópico

Los posters estuvieron expuestos todos los días del Congreso, aunque sólo se exigió la presencia física de alguno de los autores en intervalos específicos distribuidos a lo largo de los dos primeros días del Congreso. Esta distribución dió realce a la presentación tipo poster y fue muy bien acogida por los asistentes, ya que hubo tiempo suficiente para discutir y volver sobre puntos que no habían quedado aclarados en la conversación anterior.

El origen geográfico de las comunicaciones fue diverso. En las tablas II y III se muestra las comunicaciones presentadas por participantes extranjeros y nacionales. La participación española fue del 73 % (282 de 386 comunicaciones, ponencias incluidas) y el Reino Unido fue el país extranjero mejor representado en el Congreso (16,3 %, 63 de 386). La participación del resto de los países fue testimonial, siendo de solamente 5 comunicaciones, las presentadas por representantes de Holanda. Por provincias, Sevilla, organizadora del evento, presentó 51 comunicaciones (18,08 % de las presentadas por españoles), seguida de Madrid con 50 comunicaciones (18%), Cáceres (20, 7%), Barcelona (19, 6,7 %), Tenerife (16, 5,67%) y Granada (14, 4,96%).

País	Oral	Poster	Total
España	62	220	282
Reino Unido	34	29	63
Estados Unidos	3	4	7
Alemania	3	1	4
Holanda	3	2	5
Suiza	1	0	1
Francia	1	7	8
Suecia	1	4	5
Ucrania	1	0	1
Italia	1	3	4
Rumania	0	2	2
Venezuela	0	1	1
Brasil	0	1	1
México	0	1	1
Canadá	0	1	1
<b>Total</b>	<b>110</b>	<b>276</b>	<b>386</b>

Tabla II. Distribución geográfica por países de las comunicaciones presentadas al XXXIII Congreso de la SECF. No se han incluido las presentadas en el Simposio de Jóvenes Fisiólogos.

Nos gustaría finalizar esta breve reseña manifestando nuestro más sincero agradecimiento a los miembros de los Comités que intervinieron en la organización del Congreso, a la Physoc, a la Dutch Physiological Society y a las distintas instituciones públicas y privadas que patrocinaron el Congreso. Gracias a estas ayudas se concedieron 40 becas, de 250 euros cada una, a jóvenes fisiólogos, y seis premios a las mejores presentaciones tipo poster. Queremos expresar también nuestro agradecimiento a los científicos que aceptaron nuestra invitación para impartir las sesiones plenarias y los distintos simposios, y ¡cómo no!, a todos los que vinisteis al Congreso a escuchar y a mostrar vuestro trabajo. Nuestros esfuerzos hubieran sido vanos de no haber tenido una respuesta tan numerosa.

Provincia	Oral	Poster	Total
Albacete	0	4	4
Alicante	5	3	8
Badajoz	0	8	8
Barcelona	3	16	19
Bilbao	0	2	2
Cáceres	4	16	20
Córdoba	2	8	10
Granada	2	12	14
Islas Baleares	0	7	7
Jaén	0	3	3
La Coruña	1	0	1
León	0	3	3
Lérida	0	1	1
Madrid	13	37	50
Málaga	2	10	12
Murcia	1	2	3
Oviedo	0	3	3
Pamplona	1	4	5
Salamanca	2	3	5
Santander	0	2	2
Santiago	0	2	2
Sevilla	13	38	51
Tenerife	5	11	16
Valencia	2	7	9
Valladolid	6	5	11
Vigo	0	1	1
Zaragoza	0	12	12
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>220</b>	<b>282</b>

**Tabla III.** Distribución geográfica nacional por provincias de las comunicaciones presentadas al XXXIII Congreso de la SECF. No se han incluido en esta Tabla las comunicaciones presentadas en el Simposio de Jóvenes Fisiólogos.

Ana Ilundain, Guillermo Alvarez de Toledo y Lucía Tabares.

Constancio Gonzalez, Ana Ilundain y Carlos Belmonte durante la cena del Congreso



Maria José Pozo bailando con Bert Sakmann después de la cena del Congreso



## EMCCD: CÁMARAS ULTRARRÁPIDAS Y ALTA SENSIBILIDAD

En aquellas aplicaciones con intensidades lumínicas muy bajas y que requieran amplio rango dinámico (microscopía de fluorescencia, biotecnología, astronomía...) ofrecemos la solución ideal proporcionando **cámaras de alta sensibilidad** (detección de fotón único) a elevadas frecuencias de imagen (hasta 35 MHz).

Andor Technology presenta su nueva cámara iXON con la innovadora tecnología **EMCCD** (Electron Multiplying Charge Coupled Device) basada en una multiplicación de electrones que intensifica la señal recibida en el CCD con ganancias desde 1 hasta 1000 manteniendo el ruido de lectura inapreciable. Con sellado hermético en vacío, alta eficiencia cuántica (>90%) y refrigeración termoeléctrica (-100°C) permitiendo largos tiempos de exposición con corriente oscura insignificante.



iXon se presenta en formatos de 1000x1000, 512x512 y 128x128 pixels.

info@iberlaser.com  
www.iberlaser.com



**GRUPO TAPER, S.A.** se funda en junio de 1989 mediante la agregación de seis empresas que contaban con una experiencia de más de 25 años en la distribución de productos sanitarios y científicos.



Desde el año 2004, las actividades de las compañías que formaban el Grupo (Endoscopia Médica, Pacisa y Giralt, La Casa del Médico y Dissa) han sido absorbidas e integradas en un única empresa denominada Grupo Taper, S.A. Dentro de la estrategia de expansión del grupo, ha extendido sus actividades a Portugal, mediante la adquisición de tres empresas, lo que sitúa a GRUPO TAPER, S.A. entre las primeras compañías de distribución de productos sanitarios y científicos de la península ibérica, con un equipo de más de 140 profesionales y unos fondos propios de 24 millones de Euros.

Avda. Industria, 49 • Edificio Fresno. 2ª pl. – Pol. Ind. • 28108 **ALCOBENDAS (Madrid)**  
Teléfono: **916 596 520** – Fax: **916 610 084** / e-mail: [informacion@grupotaper.com](mailto:informacion@grupotaper.com)

[WWW.GRUPOTAPER.com](http://WWW.GRUPOTAPER.com)

# LA IMPORTANCIA DEL MÉTODO método

El estudio del terminal de las neuronas bipolares de la retina del ciprino dorado mediante técnicas electrofisiológicas y ópticas no aplicables a otras sinapsis, ha permitido aumentar sustancialmente el conocimiento sobre estas estructuras. El objetivo de esta revisión es resumir la información acumulada hasta la fecha actual sobre el ciclo de las vesículas sinápticas obtenida mediante esta preparación. En la actualidad, para un mayor conocimiento sobre el funcionamiento de un terminal presináptico se hace imprescindible desarrollar herramientas moleculares aplicables a este modelo experimental y utilizar los conocimientos adquiridos como base de estudio de sinapsis del sistema nervioso central de los mamíferos.

## LIBERACIÓN DE VESÍCULAS SINÁPTICAS EN EL TERMINAL DE LAS NEURONAS BIPOLARES DE LA RETINA.

Artur Llobet

### INTRODUCCION.

Probablemente por su fácil accesibilidad la retina es una de las porciones del sistema nervioso central de los vertebrados conocidas con más detalle. Desde que Cajal describió su anatomía, la información sobre cada uno de los tipos celulares que forman este tejido ha aumentado hasta un nivel impensable a finales del siglo XIX. Espero que este hecho quede patente en la presente revisión, centrada en una particularidad: la secreción de vesículas en el terminal presináptico de las neuronas bipolares. Cuando un fotón es captado por los fotorreceptores, se genera una cascada metabólica que se traduce en un bloqueo de la liberación de glutamato en las sinapsis existentes entre los terminales de estas células sensoriales y las dendritas de las neuronas bipolares. En este punto, la función de las neuronas bipolares es integrar y transmitir la información hacia las neuronas ganglionares, las cuales la llevarán hasta el encéfalo.

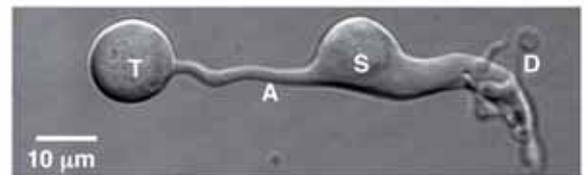
Cabe destacar tres hechos *atípicos* en las neuronas bipolares: *i*) no generan potenciales de acción, sino que transmiten la información mediante cambios graduales de su potencial de membrana; *ii*) sus terminales no presentan zonas activas con una morfología clásica, sino que, en su lugar, existen unas estructuras electrodensas conocidas como *ribbons* o *cintas*; *iii*) los terminales suelen tener una dimensión anormalmente grande. Cualquier terminal del sistema nervioso central es pequeño ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) e inaccesible, haciendo muy difícil su estudio. Precisamente por esta razón, diversos grupos de investigación durante los años 90 decidieron utilizar neuronas bipolares para el estudio de la secreción de vesículas sinápticas [1, 2]. Concretamente, utilizaron neuronas bipolares de la retina del ciprino dorado (*Carassius auratus*) cuyos terminales son *gigantes* ya que tienen un diámetro de 10-14  $\mu\text{m}$  (Fig. 1A). El conjunto de estos estudios ha permitido aumentar de forma muy significativa el conocimiento sobre el funcionamiento de un terminal presináptico. El objetivo de esta revisión es resumir los conocimientos acumulados hasta la fecha actual sobre el ciclo de las vesículas sinápticas usando el terminal de las neuronas bipolares del ciprino dorado, indicando particularidades, generalidades y cuestiones todavía por resolver.

### EL TERMINAL SINÁPTICO DE LAS NEURONAS BIPOLARES.

Es muy fácil observar los diferentes tipos celulares que forman la retina del ciprino dorado tras realizar una disociación mecánica. Una de las neuronas más fácilmente identificables son las bipolares, siendo muy simple distinguir entre terminal, axón, soma y dendritas (Fig. 1A). Un terminal típico contiene  $\sim 5 \times 10^6$  vesículas glutamatergicas [3], un valor muy por encima del reservorio de 100-200 vesículas de un botón sináptico de hipocampo. Esta gran capacidad de secreción, sumado a su forma esférica y gran tamaño, es un escenario ideal para la realiza-

ción de experimentos de capacidad de membrana, hecho imposible en cualquier terminal del sistema nervioso central. La resolución temporal de esta técnica electrofisiológica ha permitido conocer cómo tiene lugar la liberación de vesículas sinápticas y el reciclado eficaz de la membrana usada en esta preparación.

A



B

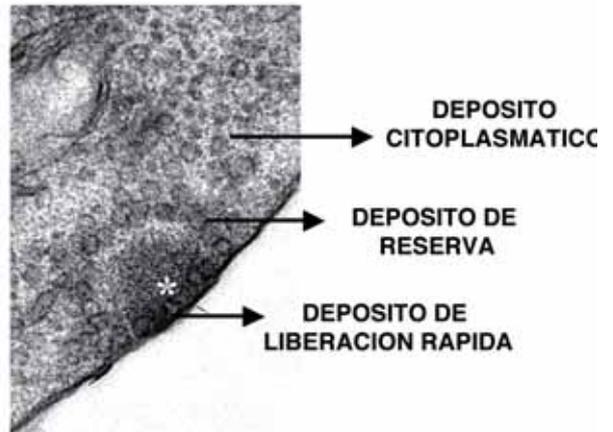


Figura 1. Las neuronas bipolares de la retina del ciprino dorado.

A) Imagen de D.I.C. de una neurona bipolar disociada de la retina del ciprino dorado. T, terminal; A, axón; S, soma; D, dendritas.

B) Micrografía electrónica de una sección de un terminal como el mostrado en A. La zona activa o *cinta* es la estructura electrodensa (\*). La organización de los depósitos de vesículas sinápticas viene indicada. En la base de la zona activa se encuentran las vesículas del depósito de liberación rápida; en la periferia de la *cinta* se encuentran las vesículas del depósito de reserva y finalmente, fuera de las zonas activas, se encuentra el depósito de liberación continua o citoplasmático.

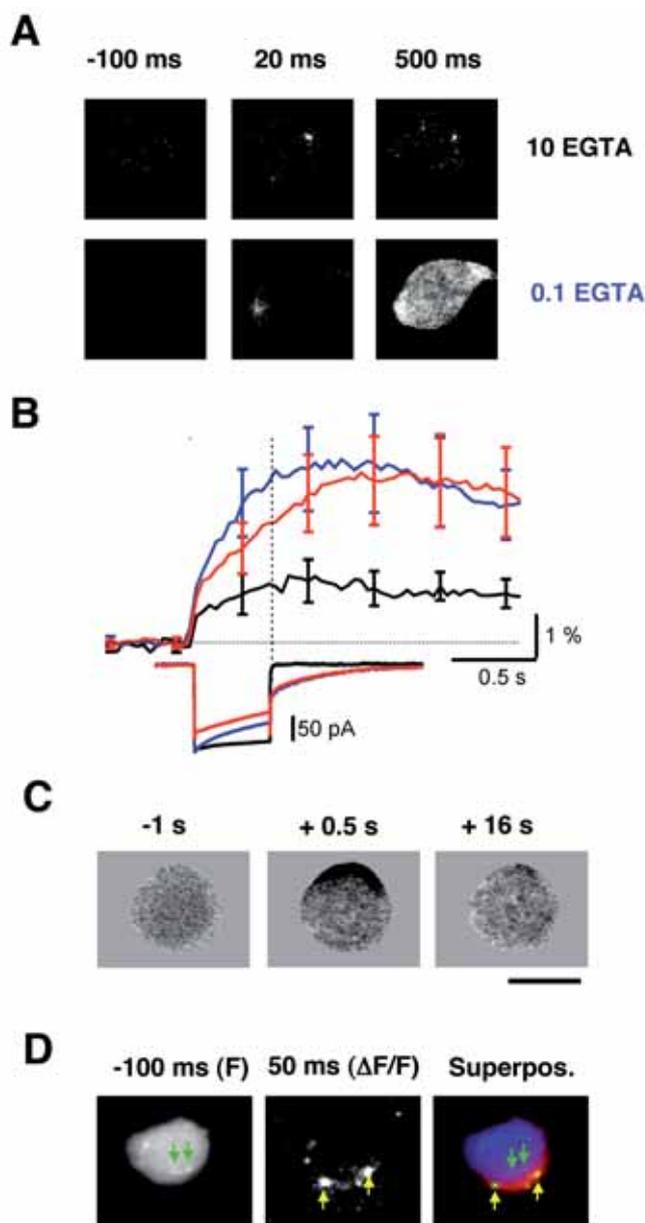
Cuando observamos un terminal de una neurona bipolar en el microscopio electrónico, llaman especialmente la atención unas zonas electrodensas distribuidas por la membrana: las zonas activas o *cintas* (Fig. 1B). En la base de estas estructuras se encuentra una gran densidad de canales de calcio voltaje dependientes y cuando se produce una despolarización es precisamente en estas zonas donde entra el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular generando un microdominio (ver a continuación) que se extiende hacia el resto del terminal [4]. Inmediatamente después de la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,

las vesículas situadas en la base de la zona activa son liberadas. Éste es el depósito de liberación rápida, formado por unas 1000 vesículas y que se encarga de dar una respuesta fásica (Fig. 1B). Si la despolarización persiste, se libera durante  $\sim 1$  s el depósito de reserva, que contiene unas 4000 vesículas. Finalmente, si los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático continúan elevados, aproximadamente 1000 vesículas  $\text{s}^{-1}$  se secretan de forma tónica [2]. Mientras se produce la respuesta fásica, la superficie neta del terminal aumenta; sin embargo, incluso cuando la estimulación es muy persistente, este aumento no va más allá del 5-8% del valor inicial. El motivo son los mecanismos de endocitosis. Como se detallará más adelante, estos terminales tienen al menos tres mecanismos distintos para recuperar la membrana utilizada por la exocitosis, los cuales permiten mantener intacta la capacidad secretora del terminal por períodos muy prolongados.

## MODULACION POR $\text{Ca}^{2+}$ DE LA EXOCITOSIS DE VESÍCULAS.

En la base de las zonas activas, que es donde tiene lugar la mayoría de fenómenos de secreción, se encuentra una gran densidad de canales de calcio voltaje dependientes de tipo L ( $\text{Ca}_L$ ) y de potasio de alta conductancia calcio dependientes ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ). Debido a que la probabilidad de apertura de los canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  incrementa en relación directa con elevaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]$  submembranar, ésta es una situación muy ventajosa para medir electrofisiológicamente la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en las zonas activas. De este modo se estableció que, durante un estímulo, la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en una zona activa oscilaba entre 10-20  $\mu\text{M}$  [5]. Estos valores eran muy parecidos a los obtenidos mediante experimentos de fotólisis de compuestos que mantenían el  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado [6]. El conjunto de estas observaciones llevó a sugerir que, en el terminal de las neuronas bipolares, la  $[\text{Ca}^{2+}]$  requerida para la liberación de vesículas era muy parecida a la existente en células neurosecretoras, como por ejemplo las células cromafines. Sin embargo, aparecieron evidencias que indicaban que este escenario podía ser una simplificación de la realidad. En experimentos donde se utilizó el colorante FM1-43 se observó que el depósito de vesículas citoplasmático (tónico) podía ser liberado a concentraciones de  $\sim 1$   $\mu\text{M}$  [7, 8]. ¿Cuál podía ser el motivo por el que una sinapsis fuera capaz de liberar vesículas en un rango de  $[\text{Ca}^{2+}]$  que oscilaba de  $\sim 1$  a 50  $\mu\text{M}$ ?

Éste es un motivo de discusión que todavía permanece y actualmente se consideran dos líneas argumentales que explican la heterogénea sensibilidad a la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de las vesículas sinápticas del terminal de las neuronas bipolares. Una posibilidad es que las vesículas presenten una composición protéica heterogénea. El grupo de Thomas Südhof ha demostrado que el sensor de  $[\text{Ca}^{2+}]$  para la exocitosis es una proteína vesicular llamada *synaptotagmin*. Hasta la fecha se han descrito 15 isoformas de esta proteína y al menos 9 de ellas han demostrado estar involucradas o, como mínimo, tener la potencialidad de participar en los fenómenos de secreción. La diferencia entre las isoformas radica en su diferente capacidad de unir el ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, *synaptotagmin I* presenta una unión a fosfolípidos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  con una  $\text{EC}_{50}$  de 10-20  $\mu\text{M}$ , mientras que *synaptotagmin VII* lo hace con una  $\text{EC}_{50}$  de  $\sim 1$   $\mu\text{M}$  [9]. Si una isoforma particular va asociada a una población de vesículas concreta, ésta sería una explicación. En el terminal de las neuronas bipolares del cipro dorado no está presente ni *synaptotagmin I* ni II. Hasta la fecha sólo se ha descrito la presencia de *synaptotagmin III* [10], una isoforma que se une a fosfolípidos con una  $\text{EC}_{50}$  de  $\sim 1$   $\mu\text{M}$  [9]. Suponiendo que todas las vesículas del terminal tuvieran en teoría la misma alta sensibilidad a ser liberadas, ¿cómo se explica la heterogénea respuesta a la  $[\text{Ca}^{2+}]$ ?



**Figura 2.** Microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación de vesículas sinápticas.

**A)** Experimentos de TIRFM donde se muestran imágenes de microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  generados en dos terminales bajo condiciones de tamponamiento alto (10 EGTA) o bajo (0.1 EGTA) durante sendos estímulos de 500 ms. Los experimentos se realizaron bajo la configuración de *whole-cell* y se utilizó como indicador calcio green 5N.

**B)** Medida de la exocitosis en diferentes condiciones de tamponamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  usando la técnica de IRM. Los experimentos se realizaron en la configuración de *whole-cell* (negro, 10 EGTA; azul, 0.1 EGTA) o de parche perforado (rojo, tampones endógenos). La duración del estímulo viene indicada por las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas durante el estímulo. El valor de la exocitosis viene expresado como el porcentaje de incremento de la superficie basal del terminal. Un incremento del 1% de la superficie equivale a la fusión de  $\sim 1300$  vesículas.

**C)** Ejemplo de un experimento de IRM. Se muestran tres imágenes de la zona de interferencia destructiva de un terminal (*footprint*): antes del estímulo (-1 s), al final del estímulo (+0.5 s) y al finalizar el período de endocitosis (+16 s). Notar la expansión que tiene lugar durante el período de estimulación. Experimentos realizados en la configuración de parche perforado.

**D)** Ejemplo de un experimento de TIRFM donde se observó una clara expansión del terminal. El terminal fue dializado en la configuración de *whole-cell* con una solución que contenía calcio green 5N. Las imágenes muestran el *footprint* antes de la estimulación y 50 ms después la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En la zona de expansión se generaron microdominios (flechas blancas) y hubieron algunas zonas activas que no respondieron (flechas verdes).

Para resolver esta respuesta fue necesario visualizar los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]$  submembranar durante un estímulo. La técnica que permite realizar estos experimentos es la Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM) [11]. Esta técnica de microscopía, también conocida como microscopía de onda evanescente, permite visualizar con gran resolución eventos que tienen lugar justo por debajo de la membrana plasmática,

ya que el campo electromagnético que genera la onda evanescente presenta una constante de espacio de  $\sim 100$  nm. Mediante esta técnica, David Zenisek visualizó por primera vez la generación de microdominios submembranales de  $[Ca^{2+}]$  durante una estimulación en los terminales de las neuronas bipolares del ciprino dorado [12]. Estos experimentos confirmaron que los microdominios tenían lugar en las zonas activas, tal y como se había sugerido anteriormente mediante experimentos electrofisiológicos [13]. Las dimensiones de las señales de  $[Ca^{2+}]$  submembranales se pueden modular mediante la introducción de tampones móviles de  $[Ca^{2+}]$  exógenos (por ejemplo EGTA o BAPTA). Cuando el citoplasma se encontraba altamente tamponado con 10 mM EGTA los microdominios de  $[Ca^{2+}]$  se quedaban restringidos a las zonas activas (Fig. 2A) [4, 12]. Es precisamente en estas regiones donde tiene lugar la mayoría de los fenómenos de secreción, tal y como revelaron experimentos de TIRFM usando el colorante FM1-43 [14]. Sin embargo, se observó también mediante esta aproximación experimental cómo la exocitosis era posible fuera de ellas, en toda la periferia del terminal. Probablemente uno de los motivos de esta fenomenología es que el tamponamiento fisiológico de un terminal es bajo, alrededor de 2 mM EGTA [15]. En estas condiciones los microdominios no quedan restringidos a las zonas activas, sino que se expanden hacia todo el terminal siendo capaces de liberar vesículas distantes de las zonas activas (Fig. 2A).

El pico de  $[Ca^{2+}]$  dentro de un microdominio en condiciones de alto o bajo tamponamiento prácticamente no varía y se encuentra siempre en valores de  $\sim 10 \mu M$  [4, 12]. Cuanto más alto es el grado de tamponamiento de  $Ca^{2+}$  del citoplasma, los incrementos de  $[Ca^{2+}]$  quedan más circunscritos a las zonas activas y cabría esperar que menos vesículas *viesen* una  $[Ca^{2+}]$  suficiente para ser secretadas. Experimentos de capacidad de membrana e Interference Reflection Microscopy (IRM, ver a continuación) donde se modificó el tamponamiento del citoplasma, validaron esta hipótesis [4, 15]. En la Fig. 2B es evidente que cuando el citoplasma contenía 10 mM EGTA la exocitosis de vesículas era mucho menor que en condiciones de parche perforado. Además, puede observarse cómo la práctica eliminación de tamponamiento del terminal (0.1 mM EGTA) incrementó la cantidad de vesículas liberadas frente a los tampones endógenos. Trasladando esta observación a condiciones fisiológicas cobra fuerza la modulación de la exocitosis por los tampones móviles endógenos del terminal, por ejemplo *calretinin*. Sería de gran ayuda observar qué sucede cuando hay una sobreexpresión de estos tampones, pero este tipo de maniobras es todavía inalcanzable en un animal tan difícil de manipular genéticamente como el ciprino dorado.

En resumen, el conjunto de estos datos permite proponer que en los terminales de las neuronas bipolares un factor clave para determinar el número de vesículas liberadas por un estímulo es la expansión de los microdominios de  $[Ca^{2+}]$  generados en las zonas activas. En la actualidad todavía no se conoce cómo el contenido proteico de las vesículas del terminal afecta a su probabilidad de ser liberadas, pero es un factor que a buen seguro va a aportar mucho debate en el futuro.

## MECANISMOS DE ENDOCITOSIS DE VESÍCULAS SINÁPTICAS.

El terminal de las neuronas bipolares presenta unos fenómenos de endocitosis robustos, que le confieren la capacidad de ser operativo durante largos períodos de estimulación. Después de un estímulo, la membrana que se ha utilizado para los procesos de exocitosis se recupera siguiendo dos constantes de tiempo, una rápida de  $\sim 1$  s y una lenta de  $\sim 10$  s. Dependiendo de la magnitud del estímulo, la proporción de membrana recuperada por la cinética rápida o lenta varía. Estímulos cortos ( $< 20$  ms), que liberan exclusivamente vesícu-

las del depósito de liberación rápida favorecen una endocitosis rápida. A medida que la duración del estímulo incrementa, la endocitosis lenta empieza a cobrar importancia. De hecho, estímulos largos ( $> 2$  s) favorecen una recuperación de membrana esencialmente lenta [2]. Estos dos tipos de endocitosis tienen lugar en condiciones fisiológicas y en consecuencia centraré el resto de la revisión en ellos. Sin embargo, cabe resaltar que, en períodos de estimulación muy prolongados y quizás como último recurso, el terminal es capaz de utilizar una tercera vía de recuperación de membrana, la macropinocitosis, para así mantener su superficie funcional.

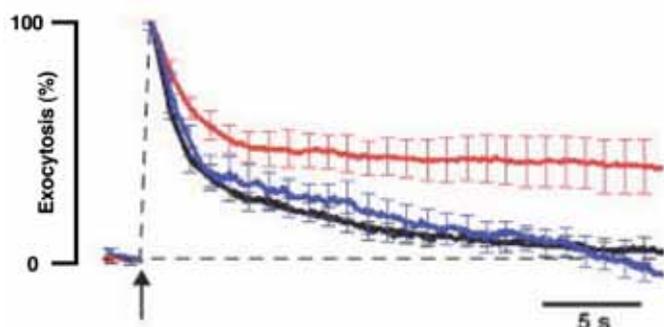
La presencia de una combinación de cinéticas de endocitosis rápida y lenta se ha observado en otros tipos celulares, siendo quizás las células neuroendocrinas uno de los ejemplos más claros [16]. El posible paralelismo con células cromafines llevó a pensar en una visión salomónica del debate Heuser-Ceccarelli en el terminal de las neuronas bipolares. Existía la posibilidad de que la proporción de membrana recuperada de forma lenta ( $\tau \sim 10$  s) tuviera lugar después del colapso de las vesículas (visión de Heuser) mientras que la endocitosis rápida ( $\tau \sim 1$  s) fuera debida al hecho que las vesículas mantenían su estructura durante el proceso de fusión y en consecuencia su membrana se podía recuperar rápidamente (*kiss-and-run* o visión de Ceccarelli). Experimentos de TIRFM primero [17] y de IRM después [18] demostraron que toda vesícula del terminal se colapsa cuando se fusiona y es por motivos que desconocemos que se recupera rápida o lentamente, pero en ningún caso porque esté experimentando un proceso de *kiss-and-run*. Un ejemplo de la técnica de IRM se muestra en la Fig. 2C. Esta técnica permite visualizar selectivamente la proporción de membrana plasmática del terminal que se encuentra pegada al cubreobjetos cuando el terminal se visualiza con un microscopio invertido. Durante un estímulo se genera una expansión del terminal que después se recupera con las constantes de tiempo rápidas y lentas típicas de la endocitosis en estos terminales [18]. Tal y como se observa en el experimento de TIRFM en la Fig. 2D, las áreas de mayor expansión tienen lugar en las zonas activas, donde se generan los microdominios de  $Ca^{2+}$ .

Al igual que la exocitosis, la endocitosis también viene modulada por la  $[Ca^{2+}]$ . Inicialmente se postuló que a  $[Ca^{2+}]$  elevadas ( $> 1 \mu M$ ) existía un bloqueo de la endocitosis [19], pero en realidad lo que sucedía es que en estas condiciones se daba un balance entre exocitosis y endocitosis. Mediante el uso de tampones de  $Ca^{2+}$  exógenos se ha observado que si se genera un microdominio de  $[Ca^{2+}]$  fisiológico la endocitosis procede de forma rápida; en cambio, si el alcance del microdominio de  $[Ca^{2+}]$  queda restringido por un alto tamponamiento, la endocitosis es lenta [20]. Es particularmente relevante el hecho que la  $[Ca^{2+}]$  no afectaba a la velocidad de endocitosis rápida y lenta, que siempre procedían con los mismos valores de  $\tau$  de  $\sim 1$  s y  $\sim 10$  s, respectivamente. En consecuencia la  $[Ca^{2+}]$  no afecta a la velocidad de endocitosis, sino que actúa como un *interruptor* determinante de las proporciones de cada mecanismo de recuperación de membrana. Este concepto viene avalado por otras líneas experimentales donde la endocitosis rápida y lenta tienen un comportamiento de todo o nada. Por ejemplo, incrementos en la presión hidrostática [21] o aumentos en la  $[Cl^-]$  intracelular [22] bloquean el componente lento de la endocitosis, dejando intacto el rápido. ¿Cuáles son las bases moleculares de la endocitosis rápida y lenta?

## ENDOCITOSIS: BASES MOLECULARES Y DIRECCIONES FUTURAS.

En la visión de Heuser, después del colapso de las vesículas durante la exocitosis, la membrana se recupera mediante la formación de vesículas que se recubren por la proteína *clathrin* y sus adaptadores. El proceso de formación de las jaulas de

*clathrin* ha sido estudiado extensivamente y se conocen en detalle muchas de las interacciones proteína-proteína que tienen lugar [23]. Mediante la introducción de péptidos y dominios de proteínas que inhiben selectivamente la vía de *clathrin* in vitro, se ha visto que la fase lenta de recuperación de membrana en el terminal de las neuronas bipolares viene mediada por esta proteína (Fig. 3), [24]. A pesar de esta evidencia y del hecho de que experimentos de inmunocitoquímica muestran la presencia de *clathrin* en el terminal de las neuronas bipolares [25], los experimentos de microscopía electrónica no revelan la presencia de las típicas vesículas recubiertas por dicha proteína [3, 26]. Las evidencias bioquímicas y fisiológicas no dejan duda de que *clathrin* está involucrada en los mecanismos de endocitosis del terminal, pero ¿por qué no se observa en las secciones de microscopía electrónica? Una posibilidad es que la vida media de vesículas recubiertas por *clathrin* es muy corta. En cualquier caso, parece claro que *clathrin* no participa



**Figura 3.** Experimento de capacidad de membrana realizado en la configuración de *whole-cell*. La exocitosis fue inducida por un estímulo de 100 ms (flecha). Los incrementos de capacidad fueron normalizados en los tres grupos experimentales. La recuperación de los valores basales de capacidad refleja el carácter biexponencial del proceso de endocitosis. Negro, experimentos control; rojo, diálisis de 0.1  $\mu$ M del péptido DNF-12mer que impide la creación de jaulas de *clathrin*; azul, diálisis de 0.1 mM del péptido DPF-12mer derivado del anterior, con una afinidad mucho más baja para bloquear la vía de *clathrin*. Notar como el péptido DNF-12mer bloquea selectivamente el componente lento de endocitosis dejando intacto el rápido. Modificado de [24].

en los fenómenos de reciclaje rápido de la membrana después del colapso de las vesículas, pero ¿qué proteína(s) se encuentran mediando estos procesos? Una línea que se muestra muy prometedora en este sentido son las proteínas con dominios BAR [27]. Estos dominios tienen la capacidad de actuar como sensores e inductores de curvatura lipídica y quizás puedan ser una solución a esta cuestión.

En conclusión, el estudio del terminal de las neuronas bipolares de la retina del cipro dorado mediante técnicas electrofisiológicas y ópticas no aplicables a otras sinapsis, ha permitido aumentar sustancialmente el conocimiento sobre estas estructuras. El futuro pasa por desarrollar herramientas moleculares aplicables a esta preparación y por utilizar los conocimientos adquiridos como base de estudio de sinapsis del sistema nervioso central de los mamíferos.

#### Bibliografía

- Von Gersdorff, H. and G. Matthews, Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature*, 1994. 367(6465): p. 735-9.
- Neves, G. and L. Lagnado, The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells. *J Physiol*, 1999. 515(Pt 1): p. 181-202.
- Von Gersdorff, H., et al., Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron*, 1996. 16(6): p. 1221-7.
- Beaumont, V., A. Llobet, and L. Lagnado, Expansion of calcium microdomains regulates fast exocytosis at a ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(30): p. 10700-10705.
- Sakaba, T., H. Ishikane, and M. Tachibana,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  current at presynaptic terminals of goldfish retinal bipolar cells. *Neurosci Res*, 1997. 27(3): p. 219-28.
- Heidelberger, R., et al., Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synap-

tic terminal. *Nature*, 1994. 371(6497): p. 513-5.

- Rouze, N. and E. Schwartz, Continuous and transient vesicle cycling at a ribbon synapse. *J Neurosci*, 1998. 18: p. 8614-8624.
- Lagnado, L., A. Gomis, and C. Job, Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron*, 1996. 17(5): p. 957-67.
- Sugita, S., et al., Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic  $Ca^{2+}$  sensors with distinct  $Ca^{2+}$  affinities. *Embo J*, 2002. 21(3): p. 270-80.
- Berntson, A.K. and C.W. Morgans, Distribution of the presynaptic calcium sensors, synaptotagmin I/II and synaptotagmin III, in the goldfish and rodent retinas. *J. of Vision*, 2003. 3: p. 274-280.
- Axelrod, D., Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, 2001. 2(11): p. 764-74.
- Zenisek, D., et al., Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. *J Neurosci*, 2003. 23(7): p. 2538-48.
- Llobet, A., A. Cooke, and L. Lagnado, Exocytosis at the ribbon synapse of retinal bipolar cells studied in patches of presynaptic membrane. *J. Neurosci*, 2003. 23(7): p. 2706-2714.
- Zenisek, D., J.A. Steyer, and W. Almers, Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature*, 2000. 406(6798): p. 849-54.
- Burrone, J., et al., Endogenous calcium buffers regulate fast exocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron*, 2002. 33(1): p. 101-12.
- Artalejo, C.R., et al., Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves  $Ca^{2+}$ , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(18): p. 8328-32.
- Zenisek, D., et al., A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron*, 2002. 35(6): p. 1085-97.
- Llobet, A., V. Beaumont, and L. Lagnado, Real-time measurement of exocytosis and endocytosis at synapses and neuroendocrine cells using interference reflection microscopy. *Neuron*, 2003. 40(6): p. 1075-86.
- Von Gersdorff, H. and G. Matthews, Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. *Nature*, 1994. 370(6491): p. 652-5.
- Neves, G., Gomis A, Lagnado L, Calcium influx selects the fast mode of endocytosis in the synaptic terminal of a retinal neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences-USA*, 2001.
- Heidelberger, R., Z.Y. Zhou, and G. Matthews, Multiple components of membrane retrieval in a synaptic terminal revealed by changes in hydrostatic pressure. *J Neurophysiol*, 2002. 88: p. 2509-2517.
- Hull, C. and H. von Gersdorff, Fast endocytosis is inhibited by GABA-mediated chloride influx in a presynaptic terminal. *Neuron*, 2004. 44: p. 469-482.
- Owen, D.J., C.B. M., and P.R. Evans, Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. 20: p. 153-191.
- Jockusch, W.J., et al., Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron*, 2005. 46: p. 869-878.
- Sherry, D.M. and R. Heidelberger, Distribution of proteins associated with synaptic vesicle endocytosis in mouse and goldfish retina. *J Comp Neurol*, 2005. 484: p. 440-457.
- Paillart, C., et al., Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse. *J Neurosci*, 2003. 23: p. 4092-99.
- Peter, B.J., et al., BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 2004. 303: p. 495-499.

Artur Llobet  
Fundació IDIBELL, Feixa Llarga s/n,  
08907 L'Hospitalet de Llobregat



# ACTUALIZACIÓN

En esta puesta al día se describen de forma resumida los avances científicos y conceptuales más importantes en relación a la regulación de la secreción preovulatoria de la hormona luteinizante (LH). Se conoce suficientemente el papel de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el proceso secretor del gonadotropo, así como el papel clave de los estrógenos de origen ovárico ( $E_2$ ), que, junto con los nuevos péptidos ováricos puestos en evidencia en los programas de fertilización asistida: factor inhibidor/atenuador de la secreción preovulatoria de gonadotropinas (GnSI/AF), garantizan el correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Se hace especial referencia al papel del receptor de progesterona en el gonadotropo como una "vía final común" de las acciones del GnRH self-priming, del GnSI/AF y de algunos de los efectos de los receptores  $\alpha$ ,  $\beta$  y de membrana para el  $E_2$  en el ajuste fino y final de la magnitud de la secreción de la LH.

## MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN PEOVULATORIA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE POR EL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN EL GONADOTROPO. José E. Sánchez - Criado

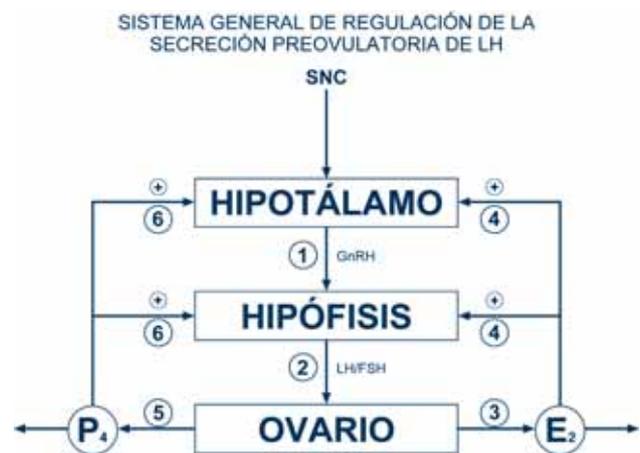


### INTRODUCCION.

Un ciclo reproductor es una serie recurrente de sucesos que culmina en la capacidad para la reproducción: **ovulación**, apareamiento, fertilización, embarazo o preñez, parto y lactación. El "ciclo" no existe como entidad independiente en un órgano, tejido o célula, sino en la interacción entre los órganos/glándulas que participan. En ausencia de embarazo/preñez, el intervalo de tiempo entre ovulaciones define la duración de un ciclo reproductor. La **duración** de los ciclos reproductores puede ser tan corta como en la rata (4 días) o tan prolongada como en la oveja (1 año). Las **especies** más estudiadas, y de las que se deriva la mayoría de información disponible, han sido y siguen siendo: la **rata**, la **oveja** y los **primates**. La rata es un excelente modelo: tiene un ciclo reproductor extremadamente corto, es un animal pequeño que ocupa poco espacio y es, comparativamente, más barato que otros animales de experimentación. La gran ventaja de la **oveja** es que se pueden obtener, con relativa facilidad y durante un largo periodo de tiempo, muestras de sangre portal para la determinación de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (**GnRH**). En ambas especies el ciclo reproductor está controlado por el hipotálamo. Por último, sobre toda explicación sobre el interés en el ciclo menstrual de los **primates**, incluida la **mujer**, en donde el ciclo reproductor es menos dependiente del hipotálamo, estando básicamente controlado por el ovario, más concretamente por las acciones de sus hormonas: **estradiol-17 $\beta$**  ( $E_2$ ) y **progesterona** (P) actuando sobre los **receptores** de estrógenos (**RE**) y de P (**RP**) en el hipotálamo y en la hipófisis (Chabbert y cols., 1998). Sin embargo, los eventos endocrinológicos de un ciclo reproductor son similares cualesquiera que sean la duración y la especie consideradas (Fig. 1). Brevemente, el hipotálamo secreta GnRH en forma pulsátil (1), causando en el gonadotropo la secreción de hormona estimulante del folículo (FSH) y en menor medida, de la hormona luteinizante (**LH**) (2). En el ovario, las gonadotropinas producen la síntesis y secreción de E (3). El aumento de los niveles circulantes de E eventualmente alcanzan un valor umbral capaz de estimular la secreción de GnRH y de sensibilizar la hipófisis al decapeptido hipotalámico (4) lo que produce la secreción preovulatoria de LH (el único feed-back positivo en el sistema endocrino) y también de FSH. La LH produce, además de ovulación, la luteinización de las células de la granulosa que comienzan a secretar P (5). La P actúa potenciando la capacidad del hipotálamo y de la hipófisis para secretar GnRH y LH, respectivamente. Hasta aquí, de forma resumida, lo que básicamente comentamos a nuestros estudiantes de primer o segundo ciclo sobre la regulación de los ciclos reproductores.

No obstante, la liberación espontánea de GnRH es demasiado pequeña en sí misma para producir la liberación preovulatoria

masiva de LH (Fink, 1995), capaz a su vez de producir todos los efectos fisiológicos en el ovario. Por otro lado, al menos en la rata, la magnitud de la secreción preovulatoria de LH es de menos del 10% de la máxima capacidad de respuesta hipofisaria al GnRH (deKoning y cols., 2001). Estas dos observaciones indican sin ningún género de dudas que existe una regulación de la respuesta a la GnRH en el gonadotropo hipofisario. Hay dos aspectos de interés técnico y conceptual menos conocidos que compensan las "deficiencias" mencionadas: 1) el "**GnRH self-priming**" y 2) la modulación de la secreción hipofisaria de LH por **isoformas** ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y **localizaciones (nuclear y de membrana) del RE**. Ambas señales podrían converger sobre la expresión y/o acción del RP en el gonadotropo, tanto en los primates como en la rata (Fig. 1).



### EL EFECTO "SELF-PRIMING" DE LA GNRH.

Este efecto es indispensable para que se produzca la liberación preovulatoria de LH y, en consecuencia, la ovulación. El efecto self-priming de la GnRH es la propiedad de la GnRH para incrementar la capacidad de la hipófisis de responder a sucesivos pulsos secretores de la GnRH con idéntica magnitud (Fink, 1995). Experimentalmente, se considera que existe GnRH "self-priming" cuando la magnitud de la respuesta secretora de LH a un segundo pulso de GnRH separado del primero por un intervalo de una hora es significativamente mayor que la respuesta al primer pulso (Fig. 2). Cuando la hipófisis no está sometida a la secreción pulsátil de GnRH, sino que lo está de forma continuada, como en los estudios experimentales, el GnRH self-priming se manifiesta por un aumento geométrico de la acumulación de LH en el medio de cultivo (Fig. 2). Las respuestas secretoras de LH en respuesta a la GnRH clasificadas como sin self-priming no difieren de otras hormonas hipofisarias en respuesta a su correspondiente hormona hipotalá-

mica liberadora. La respuesta del gonadotropo a la GnRH es doble. Por un lado, la respuesta secretora, que es una respuesta rápida dependiente del aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La GnRH, tras su unión a una proteína G particular produce dos mensajeros intracelulares: el trifosfato de inositol (**IP<sub>3</sub>**) y el **diacilglicerol** en respuesta a la activación de la **fosfolipasa C**. El **IP<sub>3</sub>** libera  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares. El diacilglicerol activa la **proteína quinasa** dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (**PKC**), que junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  producen la respuesta excitotónica. Por otro, la respuesta retrasada, que requiere la síntesis de RNA y nuevas proteínas diferentes a LH, FSH o receptores de GnRH, que actúan como factores permisivos o limitantes de la respuesta secretora. El GnRH self-priming es un ejemplo relevante de la secreción retrasada de LH en respuesta al agonista. En este último caso, el segundo mensajero es el **AMPc** activado por la adenilatociclasa. La ruta AMPc/proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (**PKA**) desempeña un papel protagonista en el efecto GnRH self-priming.

Las nuevas proteínas sintetizadas inducidas por GnRH son dependientes de la concentración y requieren un tiempo (0.5-2 horas), periodo durante el cual no hay aumento en la respuesta al GnRH. Se ha propuesto que la "**proteína priming**" inducida por GnRH (HIP-70) es de 70 kDa. La naturaleza precisa de esta(s) proteína(s) no se conoce, pero está asociado al desplazamiento de las vesículas secretoras a la periferia del gonadotropo (marginalización), y a un cambio en la longitud y orientación de los microfilamentos (Fink, 1995).

## EVIDENCIAS DEL PAPEL DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN LA MEDIACIÓN DEL EFECTO GNRH SELF-PRIMING.

En 1928, George Corner y Willard Allen obtuvieron evidencias completas de que el cuerpo lúteo (CL) de la coneja es una glándula de secreción interna cuyo producto era responsable de la proliferación del endometrio. En 1934, obtuvieron en forma cristalina este producto procedente de los CLs. El científico alemán Adolf Butenandt, premio Nobel de Química en 1939, propuso la estructura química hoy conocida como **progesterona** (Rothchild 1996). Las denominaciones que inicialmente se dieron a este compuesto fueron: **corporina**, **luteo-esterona** y **progestina**, que definían su origen, estructura y acción. En 1935, por consenso, se llegó al acuerdo de denominarla progesterona (**P**). Tras los estudios sobre el mecanismo específico de acción de los estrógenos (E) en determinados tejidos, el concepto de receptor de esteroides y sus investigaciones correspondientes dieron como resultado, en la década de 1960, a la ampliación del concepto de receptor a todas las hormonas, y específicamente a lo que hoy conocemos como **receptor de progesterona (RP)**, un factor de transcripción ampliamente representado en los tejidos relacionados con la reproducción. En la hipófisis, la única célula hipofisaria que expresa el RP en respuesta a los estrógenos (E) de origen ovárico es el gonadotropo. En los últimos 30 años del siglo XX los avances en el conocimiento de: metabolismo, síntesis, acciones, mecanismo de acción y fosforilación del RP, biología molecular, farmacología y usos terapéuticos, han aclarado enormemente la biología de la P y de su receptor estrictamente dependiente de E. No pocos de estos descubrimientos han sido posibles gracias a la disponibilidad de antihormonas específicas; concretamente, los anti-P mifepristone (**RU38486**, Exelgyn, París) y onapristone (**ZK98299**, Shering, Berlín). Apuntamos aquí la enorme promiscuidad del RP que puede activarse/fosforilarse tanto por la P como por factores intracelulares y neurotransmisores, lo que se conoce como "**ligand-independent activation of PR**" (Blaustein 2004).

Mediante el uso de anti-P se ha demostrado en el gonadotropo de la rata que la PKA y la PKC son capaces de fosforilar el RP en ausencia de P, tras la estimulación con GnRH, magnifi-

cándose la respuesta secretora del gonadotropo por los mensajeros PKA y PKC. Esto implica un papel crítico del RP en el GnRH self-priming. El PR es un receptor intracelular que media las acciones de las P. Se presenta como dos isoformas, A y B, y su expresión es dependiente de los E. En ausencia del ligando, la administración de RU38486 o ZK98299, reduce los efectos del RP sobre la secreción basal y estimulada de LH y anula el GnRH self-priming (Sánchez-Criado y cols., 2002). Mientras que el anti-P tipo II RU38486 interfiere con la interacción del PR activado con el DNA, el ZK98299 (anti-P tipo I) lo hace con el proceso de fosforilación/activación del RP. Estudios contrastados de Turgeon y Waring (2001) han evidenciado que la ruta intracelular activada por el GnRH en el gonadotropo capaz de activar el RP es la AMPc-PKA. Otros, como Fink (1995) y nosotros mismos, estamos más tentados en sustentar también la ruta de la fosfolipasa C-PKC como activadora del PR; en cualquier caso, la activación del PR por el GnRH está fuera de toda duda.

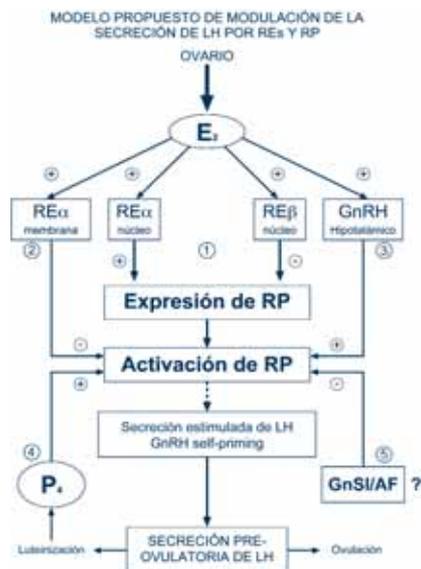


## RECEPTORES NUCLEARES $\alpha$ Y $\beta$ DE ESTRÓGENOS Y DE MEMBRANA EN EL GONADOTROPO.

Hasta 1996, año en el que se descubrió el **RE $\beta$**  en la próstata y en el ovario de rata, el  $\text{E}_2$  tenía un único RE, un factor de transcripción inducible por el ligando. Desde esa fecha el concepto de RE se ha ampliado considerablemente (Torand-Allerand, 2004). Actualmente nos encontramos con una gran cantidad de proteínas con capacidad de unión al E, que son putativos RE. De entre todas ellas, el **ER $\alpha$**  y el **ER $\beta$**  son los mejor caracterizados. Ambas isoformas, predominantemente **nucleares**, están codificadas por diferentes genes y pueden activar la transcripción en respuesta a los E en el gonadotropo (Shupnik, 2002). Algunos efectos de los E son rápidos, de tal manera que no se pueden explicar a través de las clásicas acciones genómicas. En la actualidad, las evidencias recogidas durante los últimos años indican que existen en la hipófisis RE de superficie (Bresion y cols., 1986). Estos **RE de membrana** parecen ser predominantemente de tipo  $\alpha$ , y muy probablemente se originan del mismo gen que codifica los receptores nucleares (Simoncini y Genazzani, 2003). La existencia de subtipos de receptores de esteroides es actualmente la regla, más que la excepción, para la mayoría de los esteroides. Las evidencias indican que las diferentes isoformas pueden tener acciones diferentes o alternativas, y se sugiere que de su interacción se deriva la existencia de un refinado control en la célula diana (Keightley, 1998). Igualmente, la existencia de RE en la membrana evidencia que el  $\text{E}_2$  puede modular las funciones celulares vía acciones no genómicas, existiendo una interacción entre los efectos genómicos y no genómicos de los E (Levin, 2005).

## EVIDENCIAS DE QUE LAS SEÑALES PROCEDENTES DE LOS RE EN EL GONADOTROPO CONFLUYEN EN LA EXPRESIÓN Y/O ACCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA.

Los experimentos que a continuación se resumen han de ser interpretados con extrema cautela debido a que han sido obtenidos en la rata y en modelos experimentales muy concretos. En primer lugar, es conocido que la administración del modulador selectivo de ER **tamoxifeno** induce, en ausencia de E, efectos agonistas. Estos efectos se materializan tanto *in vivo* como *in vitro* en la inducción del GnRH self-priming (Sánchez-Criado y cols., 2002). Este efecto genómico mediado por activación de RE $\alpha$  del tamoxifeno es inhibido por activación de RE de membrana en el gonadotropo con E $_2$  o con E $_2$ -BSA (Sánchez-Criado y cols., 2005). El efecto inhibitorio sobre el GnRH self-priming inducido por tamoxifeno del ER de membrana parece consistir en una inhibición de la fosforilización/activación del RP por aumento de las fosfatasa en el gonadotropo. En segundo lugar, y gracias a la posibilidad de utilizar experimentalmente **agonistas selectivos de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$**  (Sánchez-Criado y cols., 2004), hemos sido capaces de diseccionar las funciones específicas de la activación de los RE $\alpha$  y  $\beta$  en el gonadotropo. Usando estos agonistas en la rata ovariectomizada hemos comprobado que: 1) la activación de RE $\alpha$  mimetiza todas las acciones del ligando; 2) que en ausencia de activación  $\alpha$ , la activación de  $\beta$  suplanta en parte su déficit; y 3) que la coactivación de los RE $\beta$  inhibe las acciones del RE $\alpha$  sobre la expresión del RP (Sánchez-Criado y cols., 2005). Los RE, además de otras acciones en el gonadotropo, modularían la respuesta hipofisaria al GnRH controlando la expresión y la acción del RP.



## UN MODELO INTEGRADO DE REGULACIÓN LOCAL EN EL GONADOTROPO DE LA SECRECIÓN PREOVULATORIA DE LH.

La secreción ovulatoria de LH es el resultado del efecto estimulante de la GnRH en el gonadotropo previamente expuesto a las acciones del E $_2$  de origen ovárico, que activa todos los RE en el gonadotropo. Como mencionamos al principio, la liberación de la GnRH es demasiado pequeña para producir la liberación ovulatoria de LH y que ésta es, en condiciones fisiológicas, inferior a su máxima capacidad secretora. En primer lugar, la célula gonadotropa es la única célula hipofisaria que expresa el **RP** en respuesta genómica a la activación del RE $\alpha$  nuclear (1). La activación simultánea del RE $\beta$  modula los efectos de la activación del RE $\alpha$  (1) sobre la **expresión** del RP en el gonadotropo. La activación del RE de membrana, presumiblemente isoforma  $\alpha$ , tiene acciones inhibitorias sobre la **activación** del RP por activación de fosfatasa e inhibición de la fosforilización del RP. La activación/fosforilación del RP es clave para que tenga lugar el GnRH self-priming. La activación del RP

está realizada en condiciones fisiológicas por el ligando natural, la P originada en el (los) folículos ováricos (4) en respuesta a la luteinización inicial, aunque también el RP puede activarse de forma independiente del ligando por mensajeros intracelulares (Hampa/PKA) en el gonadotropo estimulados por el GnRH, magnificando la respuesta secretora del gonadotropo (3). El líquido folicular de la mujer, pero también de la rata, contiene un péptido inhibitorio de la secreción ovulatoria de LH (**GnSI/AF**) (Fowler y cols., 2003) que podría interactuar, tras su unión al receptor de membrana del gonadotropo, con la activación del RP (Byrne y cols., 1996) (5).

### Bibliografía

- Bression D, Michard M, Le Dafniet M, Pagesy P, Peillon F (1986) Evidence for a specific estradiol binding site on rat pituitary membranes. *Endocrinology* 119: 1048-1051.
- Byrne B, Fowler PA, Templeton A (1996) Role of progesterone and nonsteroidal ovarian factors in regulating gonadotropin-releasing hormone self-priming in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1454-1459.
- Blaustein JD (2004) Neuronal steroid hormone receptors: they're not just for hormone anymore. *Endocrinology* 145: 1075-1081.
- Chabbert Buffet N, Djakoure C, Christin Maitre S, Bouchard P (1998) Regulation of the human menstrual cycle. *Front Neuroendocrinol* 19: 151-186.
- deKoning J, Lambalk CB, Helmerhorst FM, Helder MN (2001) Is GnRH self-priming an obligatory feature of the reproductive cycle? *Hum Reprod* 16: 209-214.
- Fink G (1995) The self-priming effect of LHRH: a unique servomechanism and possible cellular model for memory. *Front Neuroendocrinol* 16: 183-190.
- Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Harris W, Mason HD (2003) Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? *Reproduction* 126: 689-699.
- Keightley M-C (1998) Steroid receptor isoforms: exception or rule? *Mol Cell Endocrinol* 137: 1-5.
- Levin ER (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19: 1951-1959.
- Rothchild I (1996) The corpus luteum revisited: are the paradoxical effects of RU486 a clue to how progesterone stimulates its own secretion? *Biol Reprod* 55: 1-4.
- Sánchez-Criado JE, Guelmes P, Bellido C, González M, Hernandez G, Aguilar R, Garrido JC, Bello AR, Alonso R (2002) Tamoxifen but not other selective estrogen receptor modulators antagonizes estrogen actions on luteinizing hormone secretion while inducing gonadotropin-releasing hormone self-priming in the rat. *Neuroendocrinology* 76: 203-213.
- Sánchez-Criado JE, Martín de las Mulas J, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A (2004) Biological role of pituitary estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 79: 247-258.
- Sánchez-Criado JE, Bellido C, Aguilar R, Garrido-Gracia JC (2005) A paradoxical inhibitory effect of oestradiol 17 $\beta$  on GnRH self-priming in pituitaries from tamoxifen-treated rats. *J Endocrinol* 186: 43-49.
- Shupnik MA (2002) Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamus-pituitary axis. *J Neuroendocrinol* 14: 85-94.
- Simoncini T, Genazzani AR (2003) Non-genomic actions of sex steroid. *Eur J Endocrinol* 148: 281-292.
- Toran-Allerand CD (2004) A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology* 145: 1069-1074.
- Turgeon JL, Waring DW (2001) Luteinizing hormone secretion from wild-type and progesterone receptor knockout mouse anterior pituitary cells. *Endocrinology* 142: 3108-3115.

### Agradecimientos

Irving Rothchild (Profesor Emérito de Biología de la Reproducción en Case Western Reserve University, OH) falleció el 9 de Enero de 2006 a la edad de 92 años. Con él realicé mis estudios postdoctorales en Cleveland, Ohio, USA. Ni yo ni la sección de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba hubiéramos sido lo mismo sin su existencia. Por supuesto este modesto artículo no existiría. Irv escribió su último poema tan sólo a principios de Enero de 2006, -21 años después de visitarme en Córdoba-. Finaliza así: And now, dear friends and kin, a last/Good-bye to all I know./Till now life's been a super blast!/And now it's time to go...

José E. Sánchez-Criado. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología  
Sección de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.

Avda. Menéndez Pidal s/n. 14004 Córdoba.  
Teléfono: 957 218283  
Fax: 957 218288

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son reconocidas como mensajeros intracelulares requeridos para la activación de procesos de transducción de señales, actuando como mediadores fisiológicos en respuestas celulares. Las EROs pueden ser generadas por estimulación fisiológica y actuar como agentes mediadores alterando la homeostasis del ión  $\text{Ca}^{2+}$ . La mitocondria, cuya implicación en los procesos de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  se ha estudiado profusamente, es el punto más importante de generación de EROs, así como su primer objetivo de actuación.

## HOMEOSTASIS DEL IÓN CALCIO EN CÉLULAS NO EXCITABLES. PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Rosado, J.A., González, A., Salido, G.M., Pariente, J.A.

### HOMEOSTASIS DEL IÓN CALCIO EN CÉLULAS NO EXCITABLES. PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

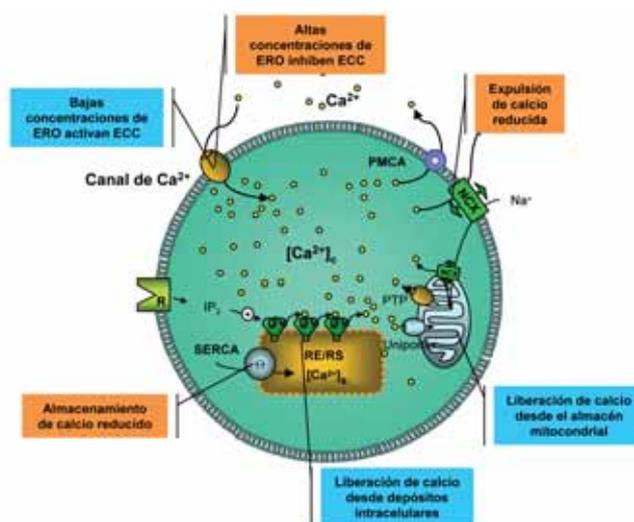
Las especies reactivas de oxígeno (EROs), como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), se generan durante el metabolismo oxidativo en todos los organismos aeróbicos. Si bien su producción se incrementa de modo significativo con el desarrollo de disfunciones celulares, también las EROs aumentan durante diferentes procesos fisiológicos. De hecho, las EROs son reconocidas como mensajeros intracelulares requeridos para la activación de procesos de transducción de señales, actuando como mediadores fisiológicos en respuestas celulares. Las EROs pueden ser generadas por estimulación fisiológica y actuar como agentes mediadores alterando la homeostasis del ión  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que precede en el tiempo a otros cambios morfológicos y funcionales responsables de daños irreversibles en diferentes tejidos. Por tanto, el papel de las EROs sobre la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ha sido objeto de numerosos estudios durante los últimos años.

### HOMEOSTASIS DEL $\text{Ca}^{2+}$ Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs).

El ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es uno de los mensajeros intracelulares más ampliamente distribuidos en el reino animal. Un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) inicia y modula diversos procesos celulares, entre los que se incluyen respuestas rápidas como la contracción muscular, secreción y procesos de fertilización, y otras más lentas como la expresión de genes y el crecimiento celular. Las células pueden aumentar su  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  liberando  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares y permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. También existen mecanismos que disminuyen o aclaran la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  para mantener una baja  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en condiciones de reposo. Estos mecanismos incluyen la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los almacenes intracelulares (retículo sarcoplasmático (RE) y mitocondria, fundamentalmente), y la expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (MP).

### LIBERACIÓN DE $\text{Ca}^{2+}$ DESDE DEPÓSITOS INTRACELULARES.

En células no excitables la principal fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico la constituyen los depósitos intracelulares. La unión de un agonista a su receptor específico en la MP conduce a una activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) y la posterior producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 libera  $\text{Ca}^{2+}$  desde los almacenes intracelulares (fundamentalmente RE) abriendo el canal/receptor de IP3 (IP3-R), mientras que el DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) (1). El  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el RE también se puede liberar a través del canal/receptor de rianodina (Ry-R). El Ry-R es un receptor estructural y funcionalmente análogo al IP3-R, y puede ser activado por el propio  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que explica el proceso de la libe-



**Figura 1:** Efecto de las EROs sobre diferentes mecanismos intracelulares de transporte de calcio. La activación de receptores de membrana estimula la síntesis de segundos mensajeros que inducen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplasmático (RE/RS). El vaciamiento de los depósitos de calcio estimula la entrada capacitativa de calcio (ECC). La disminución  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  depende de la actividad de varias ATPasas e intercambiadores, incluyendo la expulsión de calcio por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) y la PMCA; y el almacenamiento de calcio dentro de los depósitos intracelulares (RE/RS) por la SERCA. La mitocondria también puede modular las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  secuestrando  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un "uniporter" o liberando  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un NCX o el poro de transición mitocondrial (PTP). Las EROs pueden elevar la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  bien incrementando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE/RS o desde el almacén mitocondrial o reduciendo la expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol. Además, las EROs alteran la ECC de un modo que depende de la concentración, así, bajas concentraciones de ERO favorecen la ECC mientras altas concentraciones inhiben la entrada de calcio.

ración de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (*calcium-induced calcium release*, CICR), y por la ADP-ribosa cíclica (cADP-r).

En muchos laboratorios de fisiología, incluido el nuestro, se han venido realizando en los últimos años trabajos que han puesto de manifiesto que las EROs producen incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de diferentes tipos celulares. Estos incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  pueden ser debidos, por una parte, a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares, y por otra, a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior celular (Figura 1). Adicionalmente, se ha comprobado que la influencia de las EROs sobre la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  puede variar desde efectos estimulantes a inhibidores, dependiendo del tipo de oxidante utilizado, de su concentración y de la duración de su administración. Por ejemplo, en células endoteliales humanas de aorta bajas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1-10  $\mu\text{M}$ ) no modifican la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , mientras que 100  $\mu\text{M}$  induce oscilaciones transitorias en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

Varios son los trabajos que han demostrado que los hidroperóxidos y otros agentes sulfidrilos producen movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En células acinares pancreáticas se ha puesto de manifiesto que los agentes oxidantes de grupos sulfidril, timerosal, vanadato y el óxido de fenilarsina, son capaces de movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares (2, 3). Adicionalmente, el timerosal induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibilizando el IP3-R en acinos pancreáticos y células HeLa o a través del Ry-R en células musculares esqueléticas (3, 4). Otro agente oxidante, como es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produce incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a partir de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos mito-

condriales y no mitocondriales sensibles a agonistas (5) (Figura 1).

Además, se ha propuesto la existencia de "sensores del estado redox" en los almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a agonistas de plaquetas humanas, consistentes en grupos sulfidriilo hiperreactivos presentes en el IP3-R (6). Estos grupos son altamente sensibles a la oxidación cuando las plaquetas son expuestas a EROs exógenas o por las EROs generadas por la estimulación por agonistas, como la trombina (7). De acuerdo con esto, se ha demostrado que las EROs inducen liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos sensibles a agonistas mediante la oxidación de grupos sulfidrilos presentes en el IP3-R e independiente de la generación de IP3 (6). Por otra parte, el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), generado por la reacción hipoxantina/xantina oxidasa, produce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos insensibles a taspigargina pero sensibles a rianodina. De hecho, el Ry-R se sensibiliza en presencia de timerosal (4), y el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  inducido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se acompaña de una activación del Ry-R (8).

Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por las EROs muestran una dinámica espacial similar a aquellas evocadas por los agonistas clásicos. En células polarizadas, como los acinos pancreáticos, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a los agonistas fisiológicos como ACh, bombesina y CCK se inicia con un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en polo luminal de la célula que posteriormente se propaga en forma de "ola de  $\text{Ca}^{2+}$ " hacia la membrana basolateral. El polo luminal se caracteriza por ser la zona diana que dispara las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por los agonistas, y es donde suelen estar situados los almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a los mismos, lo que apoya la idea de que las EROs movilizan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el mismo depósito que los agonistas clásicos.

## ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$ DESDE EL MEDIO EXTRACELULAR.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, descrita anteriormente, resulta a menudo insuficiente para la completa activación celular, y determinadas funciones celulares, así como el relleno de los depósitos, requieren un incremento sostenido en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Es aquí donde la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular desempeña un importante papel.

En células excitables eléctricamente, como las neuronas, las células musculares y muchas endocrinas, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce principalmente a través de canales sensibles a cambios en el voltaje; sin embargo, en células no excitables la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce a través de canales iónicos receptores, o canales activados bien por segundos mensajeros o por los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

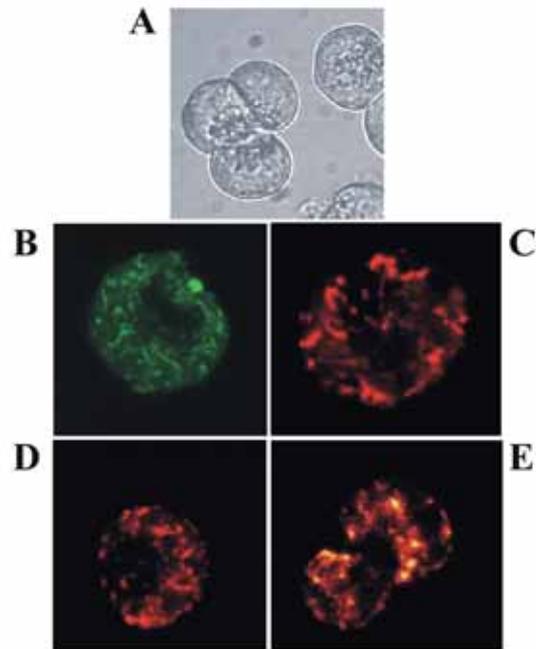
Los canales dependientes de voltaje se activan durante los potenciales de acción y en respuesta a despolarizaciones de la membrana. Los canales activados por segundos mensajeros son sensibles a moléculas intracelulares cuya concentración se incrementa en respuesta a la ocupación de un receptor de membrana, tales como el inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato en células endoteliales, PKC en plaquetas o el diacilglicerol. Hasta la fecha no tenemos evidencias claras del papel de las EROs en la activación de canales sensibles a voltaje o a segundos mensajeros.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por canales iónicos receptores se produce en respuesta a numerosos agonistas, normalmente neurotransmisores como el glutamato, ATP o ADP. La unión de estos agonistas a sus receptores de membrana induce una rápida entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que indica la apertura de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  directamente tras la ocupación del receptor. El estudio del efecto de las EROs en la activación de estos canales en distintos modelos celulares ha demostrado que el estrés oxidativo tienen efectos adversos en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales iónicos receptores.

El principal mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células no exci-

tables es la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  (ECC), un proceso regulado por el contenido de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aunque no se conoce con exactitud el modo en que llega a la MP la información acerca del grado de relleno de los depósitos, se han propuesto varios modelos: aquellos que sugieren la liberación de un segundo mensajero, tras el vaciamiento de los depósitos, que abra un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la MP (9); los que apoyan una interacción directa entre el IP3-R en el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  y un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la MP o acoplamiento conformacional (10); y por último, el modelo que sugiere la inserción de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la MP por fusión de vesículas que contienen dichos canales con la propia MP (11).

Como segundos mensajeros participantes en la activación de



**Figura 2:** Imágenes que muestran la distribución de mitocondrias en células acinares pancreáticas incubadas con diferentes sondas fluorescentes. Empleando microscopía láser confocal se observan puntos con fluorescencia que están distribuidos por todo el citosol celular, aunque en ocasiones se puede apreciar mayor densidad de puntos cerca de la zona de los gránulos de cimógeno, alrededor del núcleo y en la vecindad de la membrana plasmática. (A) Imagen de transmitancia de un acino pancreático que muestra la típica distribución de los gránulos de cimógeno en el polo luminal (secretor) de las células. Las células fueron incubadas con el indicador MitoTracker™ Green FM (B), Rhod-2, utilizado para la monitorización de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  (C) y JC-1, usado para determinaciones de  $\Delta\psi_m$  (D). La monitorización de FAD no requiere la incubación con sondas de ningún tipo ya que esta molécula es autofluorescente (E). Bajo estas condiciones se aprecian estructuras fluorescentes en el citosol que presentan un patrón de distribución similar cuando las células se observan con las sondas mencionadas.

la ECC se han postulado varias moléculas, como el GMP cíclico, proteínas de la familia Ras, un producto del citocromo P450, proteínas tirosina cinasas y un factor inductor de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  o CIF (9) de naturaleza aún desconocida.

El acoplamiento conformacional, que sugiere una interacción permanente entre proteínas localizadas en el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  (el IP3-R) y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la MP (10), ha sido confirmado por estudios que demuestran que canales TRPC1, TRPC3 y TRPC6 coinmunoprecipitan con el IP3-R y que fragmentos de dicho receptor pueden modular la ECC.

Recientemente se ha propuesto un modelo alternativo al acoplamiento conformacional clásico, denominado "acoplamiento conformacional *de novo*". De acuerdo con este modelo, la interacción entre el IP3-R y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la MP no es permanente, sino que únicamente ocurre tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . En plaquetas, donde este modelo ha sido descrito por primera vez, este proceso se basa en el transporte de porciones del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  (RE) hacia la MP para propiciar el acoplamiento reversible entre el IP3-R y el canal TRPC1 expresado endógenamente (11). En este modelo el citoesqueleto desempeña un doble e importante papel: en primer lugar la red citosólica de filamentos de actina

proporciona un soporte físico para el transporte del RE hacia la MP, y por otro lado el citoesqueleto de membrana actúa como una barrera evitando la activación permanente de la ECC (12). Las EROs, como el  $H_2O_2$ , afectan a la ECC de distinto modo dependiendo de la concentración. Bajas concentraciones de  $H_2O_2$  ( $\leq 100 \mu M$ ) pueden actuar como segundos mensajeros en la activación de la ECC, existiendo una correlación positiva entre la liberación y la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por  $H_2O_2$ . Por el contrario, concentraciones superiores de EROs tienen efectos adversos en la ECC (Figura 1). El efecto del  $H_2O_2$  en la ECC está mediado por la reorganización del citoesqueleto de actina. Así, bajas concentraciones de  $H_2O_2$  inducen una reorganización del citoesqueleto similar a la observada tras la estimulación con agonistas fisiológicos, incluyendo una despolimerización inicial, posiblemente del citoesqueleto de membrana que actúa a modo de barrera evitando la ECC, seguida de un incremento en el contenido en filamentos de actina. Por el contrario, dicha despolimerización inicial no se observa tras el tratamiento con altas concentraciones de  $H_2O_2$ , lo cual explicaría su efecto negativo sobre la ECC. La correlación entre la liberación y la entrada de  $Ca^{2+}$  inducida por bajas concentraciones de  $H_2O_2$  y la reorganización del citoesqueleto de actina de forma similar a los agonistas fisiológicos sugiere que la producción de  $H_2O_2$  podría desempeñar un papel relevante en la activación de la ECC en condiciones fisiológicas.

El papel de otras EROs, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), en la ECC ha sido descrito en distintos modelos celulares. Al igual que el  $H_2O_2$ , el  $O_2^-$  a bajas concentraciones induce movilización de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, mientras que a altas concentraciones tiene efectos adversos en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  citosólico.

## DISMINUCIÓN O ACLARAMIENTO DEL $Ca^{2+}$ CITOSÓLICO.

Inmediatamente después de haberse producido un aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ , el  $Ca^{2+}$  es, en parte, bombeado de nuevo al interior de los depósitos intracelulares y expulsado al medio extracelular, con lo que la señal de  $Ca^{2+}$  citosólico desaparece. El retorno del ión a los depósitos intracelulares es consecuencia, principalmente, de la acción de una  $Ca^{2+}$ -ATPasa sarco(endo)plásmica (SERCA), habiéndose descrito varias isoformas de SERCA (SERCA1, 2 y 3) que son codificadas por genes diferentes.

La actividad de SERCA puede ser modulada por diversos factores, de los cuales el más común es la  $[Ca^{2+}]_c$  en las inmediaciones de la bomba, que incrementa su eficacia de bombeo del ión al interior de los depósitos y también su expresión (13). SERCA posee una alta afinidad para el  $Ca^{2+}$  ( $0,1-0,4 \mu M$ ), lo que posibilita que pueda ser activada por un aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  e inhibida por un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  existente en el interior de los depósitos intracelulares ( $[Ca^{2+}]_s$ ). Su actividad también puede verse reducida por la actividad de la proteína ERp57, perteneciente a una familia de proteínas reguladas por calreticulina, que se localiza en el interior del retículo endoplásmico y que es sensible al estrés oxidativo (14).

Las EROs, al igual que ocurre con los procesos que aumentan la  $[Ca^{2+}]_c$ , también afectan la actividad de SERCA (Figura 1). Se ha descrito que las especies reactivas generadas durante una isquemia y reperfusión del tejido modifican la actividad de SERCA (15), aunque aún se está dilucidando el mecanismo que subyace a esta acción. Varios autores han descrito que una oxidación catalizada por metales induce inhibición de SERCA por oxidación directa de puentes disulfuro; este es el caso de las plaquetas (6), aunque en otros tipos celulares como células musculares esqueléticas (16) o miocárdicas (14) la inhibición de SERCA se produce por un mecanismo oxidativo independiente.

Otro mecanismo con el que cuentan las células para reducir la  $[Ca^{2+}]_c$  es la expulsión de  $Ca^{2+}$  al medio extracelular por la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA). La capacidad de la PMCA para disminuir la  $[Ca^{2+}]_c$  es mayor que la de SERCA (17) y, al igual que ésta, la PMCA se activa por aumentos de  $[Ca^{2+}]_c$ . Como ocurre con otras bombas iónicas, la PMCA deriva de una familia multigénica codificada por cuatro genes diferentes denominados PMCA1, PMCA2, PMCA3 y PMCA4 que codifican al menos 28 isoformas distintas.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que las EROs, como es el caso de  $H_2O_2$ , producen una alteración en la capacidad de la PMCA para expulsar  $Ca^{2+}$  desde el citoplasma (5, 15, 18), pero el mecanismo por el cual ejercen este efecto no está completamente aclarado (Figura 1). Las diferentes hipótesis sobre este asunto mantienen que la modulación de la PMCA se debe a una oxidación directa de los puentes disulfuro o a la actividad de una proteína intermediaria sensible a la oxidación, como la calmodulina. En cualquier caso, sí se sabe que otras especies reactivas, como los peroxinitros, inducen pérdida de actividad de la PMCA de neuronas y otros tipos celulares por cambios directos en su estructura (19).

La inhibición de la PMCA por acción de las EROs tiene consecuencias fisiológicas importantes, y puede ser la diana del estrés oxidativo propio de un cerebro envejecido. De hecho, se ha dicho que la reducción en la actividad de la PMCA puede ser causa de las alteraciones de la regulación del  $[Ca^{2+}]_c$  neuronal que acontecen durante el envejecimiento y otras enfermedades relacionadas con la homeostasis intracelular del ión  $Ca^{2+}$  (19).

## SEÑAL DE CALCIO Y MITOCONDRIA.

La implicación de la mitocondria en los procesos de señalización del  $Ca^{2+}$  se ha estudiado profusamente, y contamos con numerosos resultados que apoyan su papel activo en la regulación de la  $[Ca^{2+}]_c$ . Así, se ha demostrado que las mitocondrias estarían situadas en la inmediata vecindad de los canales de salida de  $Ca^{2+}$  desde el RE, a los IP3-R, así como de los Ry-R, o al complejo de Golgi. La figura 2 muestra una serie de fotografías de células acinares pancreáticas cargadas con diferentes marcadores fluorescentes que muestran la localización de las mitocondrias. Debido a esta disposición, se ha propuesto su papel regulador de la actividad del IP3-R amortiguando la  $[Ca^{2+}]_c$  local y suprimiendo el "feedback" de activación del receptor por el ión. Junto con la modulación de la liberación de las señales de  $Ca^{2+}$  citosólico, las mitocondrias también regulan la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular (20). Eso sí, si bien la acumulación de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria tiene lugar rápidamente tras un aumento en la  $[Ca^{2+}]_c$ , se ha observado que la recuperación de la  $[Ca^{2+}]_m$  es más lenta cuando se compara con la velocidad con la que se recupera la  $[Ca^{2+}]_c$  (21).

Por otro lado, también se ha propuesto que las mitocondrias regulan la propagación de las señales de  $Ca^{2+}$  a lo largo del citosol conocidas como olas de  $Ca^{2+}$ . Incluso se ha propuesto que las mitocondrias presentan diferente comportamiento en función de cual sea su localización y el patrón específico de señalización citosólica de  $Ca^{2+}$ . En este sentido esos orgánulos participan en el fenómeno de CICR (22). Esto tendría lugar mediante la apertura del poro de transición mitocondrial, aunque la participación de otros mecanismos como el transportador de  $Ca^{2+}$  o un intercambio por protones o ácidos débiles también podrían estar implicados en este proceso.

La participación de la mitocondria en todo este juego de modulación de la  $[Ca^{2+}]_c$  se ve completada con el hecho de que la acumulación de  $Ca^{2+}$  en el orgánulo sería interpretado como una señal que estimularía su actividad para regular el metabolismo energético de la célula. La cadena de transporte de electrones de la mitocondria proporciona la energía necesaria para dirigir la difusión de protones hacia el interior de la matriz lo

cual es utilizado para la síntesis de ATP. Por tanto, cuando sea necesario, el metabolismo mitocondrial es adaptado para satisfacer la demanda de energía de la célula.

La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria tiene una importante influencia en su fisiología, comenzando por el potencial de membrana ( $\psi_m$ ). La estimulación de las células acinares pancreáticas con CCK, que provoca cambios tanto en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  como en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , conduce a una despolarización del  $\psi_m$  que se ha demostrado que está relacionada con la acumulación del ión en la matriz mitocondrial (23). Una vez allí el ión  $\text{Ca}^{2+}$  regula la actividad de las enzimas piruvato, isocitrato y alfa-cetoglutarato deshidrogenasas.

Otra consecuencia de la entrada del ión en la mitocondria es que la actividad de la cadena de transporte de electrones se ve modificada, apreciándose cambios en el estado de oxidación del NADH y el FADH<sub>2</sub> (24) debidos a la activación de las enzimas antes mencionadas, habiéndose descrito una correlación entre los cambios en la fluorescencia derivada de ambas moléculas, y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (23, 25). Tras la estimulación de las células acinares pancreáticas con agonistas fisiológicos se observa un incremento transitorio de la fluorescencia emitida por el FAD, que además es dependiente de un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ .

Por otro lado, la mitocondria es el punto más importante de generación de EROs, así como su primer objetivo de actuación. La disfunción mitocondrial es el determinante más importante en los procesos degenerativos asociados con un incremento en el nivel de estrés oxidativo celular. Los complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones convierten la energía de reacciones de oxido-reducción en gradiente eléctrico, energía potencial y calor. La transferencia de electrones a través de la enzima está asociada al incremento en el estado energético de la misma, de manera que los cambios conformacionales que sufre determinan el flujo unidireccional de protones a través de la membrana mitocondrial. Los electrones son transferidos en última instancia al oxígeno. Esta cadena de reacciones está en definitiva acoplada a la síntesis de energía y al buen funcionamiento de este sistema biológico. Desviaciones de su normal funcionamiento conducen a un desacoplamiento en la transferencia de electrones y protones, lo que puede conducir a la generación de EROs. Más aún, los radicales libres generados en la mitocondria podrían inhibir uno o más componentes de la cadena de transporte de electrones, acelerando así la generación de EROs, que contribuirían a la aparición de una disfunción en condiciones de estrés oxidativo.

Mediante el uso de la sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA se ha podido demostrar la generación de EROs en respuesta a la estimulación de las células acinares pancreáticas con CCK, producción que tiene lugar en las mitocondrias y que depende de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos orgánulos (26). Las EROs exógenas producen despolarización del  $\psi_m$ , liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado y oxidación del FADH<sub>2</sub>, modificaciones de gran importancia para la fisiología de este orgánulo y que bloquean los cambios inducidos por los agonistas fisiológicos (27).

Finalmente, se ha demostrado que la capacidad de la mitocondria para regular las funciones celulares va mucho más allá de lo aquí descrito. Un orgánulo que en un principio era considerado la principal fuente de energía que mantiene a la célula con vida y que le permite realizar todas sus funciones, es capaz de poner en marcha las cascadas de reacciones que pueden conducir a la muerte celular conocida como apoptosis.

#### Agradecimientos

Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2001-0624 y BFU2004-00165). Los autores agradecen la participación de los becarios de investigación Pedro C. Redondo, María P. Granados y José J. López.

#### Bibliografía

- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ y Schulz I (1983) Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by 1,4,5-trisphosphate. *Nature Lond.* 306: 67-69.
- Thorn P, Brady P, Llopis J, Gallacher DV y Petersen OH (1992) Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  spikes evoked by the thiol reagent thimerosal in both intact and internally perfused single pancreatic acinar cells. *Pflügers Archiv. Eur. J. Physiol.* 422: 173-178.
- Lajas AI, Pozo MJ, Camello PJ, Salido GM, Singh J y Pariente JA (1999) Phenylarsine oxide evokes intracellular calcium increases and amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. *Cell. Signal.* 11: 727-734.
- Abramson JJ, Zable AC, Favero TG y Salama G (1995) Thimerosal interacts with the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 29644-29647.
- Pariente JA, Camello C, Camello PJ y Salido GM (2001) Release of calcium from mitochondrial and nonmitochondrial intracellular stores in mouse pancreatic acinar cells by hydrogen peroxide. *J. Membr. Biol.* 179: 27-35.
- Redondo PC, Salido GM, Rosado JA y Pariente JA (2004) Effect of hydrogen peroxide on  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation in human platelets through sulphydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 67: 491-502.
- Rosado JA, Redondo PC, Salido GM, Gómez-Arteta E, Sage SO y Pariente JA (2004) Hydrogen peroxide generation induces pp60src activation in human platelets. Evidence for the involvement of this pathway in store-mediated calcium entry. *J. Biol. Chem.* 279: 1665-1675.
- Favero TG, Zable AC y Abramson JJ (1995) Hydrogen peroxide stimulates the  $\text{Ca}^{2+}$  release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 25557-25563.
- Parekh AB y Penner R (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* 77: 901-930.
- Berridge MJ (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 312: 1-11.
- Rosado JA, Redondo PC, Sage SO, Pariente JA y Salido GM (2005). Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry: Vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? *J. Cell. Physiol.* 205: 262-269.
- Rosado JA, Jenner S y Sage SO (2000). A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformational coupling. *J. Biol. Chem.* 275: 7527-7533.
- Wu KD, Bungard D y Lytton J (2001) Regulation of SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  pump expression by cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280: 843-851.
- Ihara Y, Kageyama K y Kondo T (2005). Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 329: 1343-1349.
- Ermak G y Davies KJA (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.* 38: 713-721.
- Moreau VH, Castilho RF, Ferreira ST y Carvalho-Alves PC (1998) Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase AT submicromolar iron concentrations: evidence for metal-catalyzed oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 554-560.
- Juska A, Redondo PC, Rosado JA y Salido GM (2005) Dynamics of calcium fluxes in human platelets assessed in calcium-free medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 779-86.
- Zaidi A y Michaelis ML (1999) Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 810-821.
- Chen B, Mayer MU y Squier TC (2005) Structural uncoupling between opposing domains of oxidized calmodulin underlies the enhanced binding affinity and inhibition of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 44: 4737-4747.
- Hoth M, Fanger CM y Lewis RS (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 137: 633-648.
- González A, Schulz I y Schmid A (2000) Agonist-evoked mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  signals in mouse pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 275: 38680-38686.
- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, García AG, García-Sancho J, Montero M y Álvarez J (1999)  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J. Cell. Biol.* 144: 241-254.
- González A, Granados MP, Salido GM y Pariente JA (2003) Changes in mitochondrial activity evoked by cholecystokinin in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Cell. Signal.* 15: 1039-1048.
- Duchen MR y Biscoe TJ (1992) Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J. Physiol.* 450: 13-31.
- Voronina S, Sukhomlin T, Johnson PR, Erdemli G, Petersen OH y Tepikin AV (2002) Correlation of NADH and  $\text{Ca}^{2+}$  signals in mouse pancreatic acinar cells. *J. Physiol.* 539: 41-52.
- Granados MP, Salido GM, Pariente JA y González A (2004) Generation of ROS in response to CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Mitochondrion* 3: 285-296.
- Granados MP, Salido GM, Pariente JA y González A (2005) Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on CCK-8-evoked changes in mitochondrial activity in isolated mouse pancreatic acinar cells. *Biol. Cell* . 97 (11): 847-56.

Rosado, J.A., González, A., Salido, G.M., Pariente, J.A.  
Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, 10071

Cáceres

**El sistema nervioso auditivo procesa los estímulos sonoros mediante el análisis de las características temporales, biauriculares y espectrales de los sonidos. El resultado de este análisis multiparamétrico es la percepción e identificación de los sonidos que están en el ambiente, lo cual proporciona información del medio, y en algunas especies permite la comunicación oral.**

## ANÁLISIS ESPECTRAL EN LAS NEURONAS DEL COLÍCULO INFERIOR EN LA RATA

Olga Hernández, Salvatore Cristaudo, David Pérez-González, Marco A. Izquierdo y Manuel S. Malmierca

### RESUMEN.

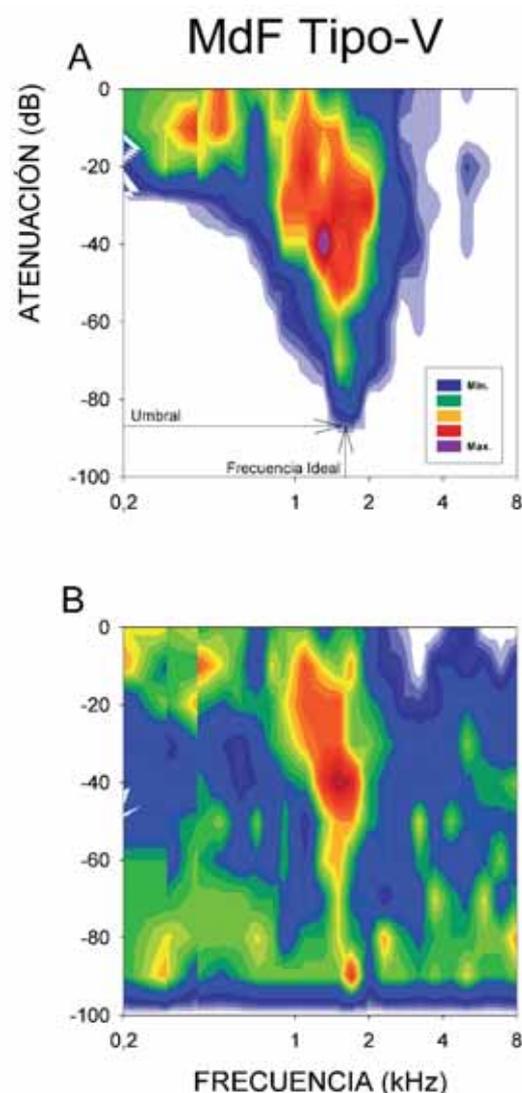
La mayoría de los sonidos, incluyendo los producidos por el lenguaje oral, poseen un espectro complejo en frecuencias e intensidades. El análisis espectral de un sonido es una de las tareas fundamentales del sistema auditivo para el procesamiento de la información acústica. Las neuronas auditivas poseen campos receptivos donde se puede observar la sensibilidad a diferentes rangos de frecuencias e intensidades. Una forma de estudiar estos campos receptivos es mediante el análisis de los mapas de frecuencias (MdFs). Los MdFs en el colículo inferior se han clasificado habitualmente siguiendo un criterio visual, en función de la forma del área de respuesta, como V y no-V. Mientras que los tipos V reflejan procesamiento a nivel del nervio auditivo, los de tipo no-V engloban respuestas de tipo estrecho, cerrado, desviado a bajas y a altas frecuencias, de picos múltiples, forma de U, mosaico e inhibitorio (Hernández *et al.* 2005). Estos resultados sugieren que la forma básica de los MdFs en V del nervio auditivo puede ser mantenida en algunos casos, pero en otros, se esculpe o modela en varios grados por la combinación de aferencias excitadoras e inhibitorias.

### INTRODUCCIÓN.

El sistema nervioso auditivo procesa los estímulos sonoros mediante el análisis de las características temporales, biauriculares y espectrales de los sonidos. El resultado de este análisis multiparamétrico es la percepción e identificación de los sonidos que están en el ambiente, lo cual proporciona información del medio, y en algunas especies permite la comunicación oral. Una característica fundamental del sistema auditivo es su organización tonotópica (Irvine, 1992; Malmierca, 2003; Malmierca & Merchán, 2004; Malmierca & Irvine, 2005), que depende de la sensibilidad de cada neurona a un determinado rango de frecuencias del sonido. Esto es, en la mayoría de los núcleos del sistema auditivo la organización anatómica se corresponde con una organización funcional; las neuronas están ordenadas en función de la frecuencia a la que son más sensibles.

El perfil espectral de una neurona auditiva (su respuesta a distintas frecuencias e intensidades) viene determinado por su campo receptivo, que consiste en las combinaciones de frecuencia e intensidad del sonido capaces de inducir una respuesta en la neurona, y que se representa gráficamente mediante un mapa bidimensional (Evans, 1979; Wang *et al.*, 1996; Suga *et al.*, 1997; Snyder *et al.*, 2000; Sutter, 2000; LeBeau *et al.*, 2001; Egorova *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2005). Estos gráficos, denominados mapas de frecuencias (MdFs), se obtienen mediante el registro de las respuestas neuronales tras la presentación, de forma aleatoria, de sonidos de distintas frecuencias e intensidades, donde la frecuencia se representa en el eje de abscisas y la intensidad en el de ordenadas. Asimismo la magnitud de la respuesta neuronal en cada coordenada se representa mediante barras de distinta longitud, o bien mediante un código de colores (Figs. 1-3) que es proporcional al número de potenciales de acción evocados.

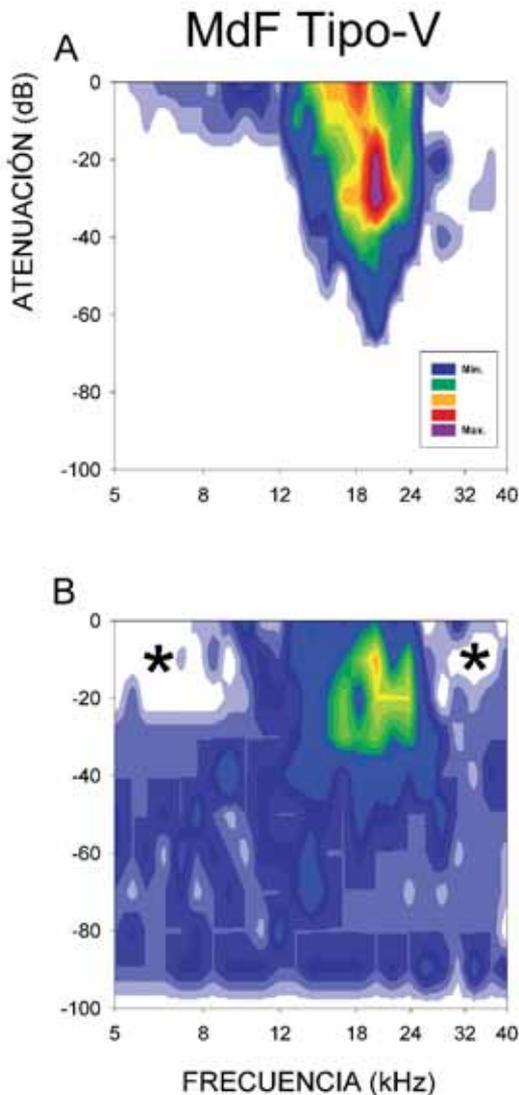
Además de la forma que tome el campo receptivo de la neurona, en los MdFs también se pueden determinar otros parámetros característicos de la neurona, como el *umbral* (la menor intensidad de sonido a la que responde) o la *frecuencia ideal* (FI, la frecuencia del sonido a la que una neurona responde cuando la intensidad es menor, o sea en el nivel de umbral).



**Figura 1:** (A) Ejemplo de MdFs de tipo V, en los que se muestra además la actividad registrada mediante la técnica de "supresión con dos tonos" (B) que no revela ningún tipo de actividad inhibitoria. Escala de colores: normalizado a la máxima descarga en %.

### CAMPOS RECEPTIVOS EN EL NERVIJO AUDITIVO Y EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL AUDITIVO.

Los MdFs de las fibras del nervio auditivo (NA) tienen *forma de V* (al aumentar la intensidad del sonido, la neurona responde a un rango de frecuencias mayor) independientemente de la gama de frecuencias (Liberman & Kiang, 1978; Møller, 1978; Carlier & Pujol, 1982), debido a que el NA transmite solamente impulsos excitatorios y sin inhibición al sistema nervioso central auditivo. Sin embargo, los MdFs de las neuronas del



**Figura 2.** Ejemplo de Mdf tipo V (A) con posibles áreas de inhibición tras el paradigma de estimulación "supresión con dos tonos" (áreas en blanco con asterisco, B) que flanquean el área de respuesta a bajas y a altas frecuencias con umbrales relativamente altos. Escala de colores: normalizado a la máxima descarga en %.

sistema central (Young & Brownell, 1976; Shofner & Young, 1985; Sutter & Schreiner, 1991; Sutter *et al.*, 1999; Suga *et al.*, 1997) presentan una gran variedad de formas (Wang *et al.*, 1996; Ramachandran *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 2000; Snyder & Sinex, 2002, Hernández *et al.*, 2005). Por ejemplo, los Mdf de las neuronas del colículo inferior (CI) varían en un rango que se extiende desde las V anchas, similares a los de las fibras del NA, hasta los mapas con áreas estrechas. Los Mdf de áreas de respuesta estrecha muestran una respuesta limitada a un rango de frecuencias muy reducido, que se mantiene de forma constante a altas intensidades del sonido. Estos Mdf se han denominado *tolerantes al nivel* (Suga, 1995) *áreas en forma de I* (Ramachandran *et al.*, 1999), de *tipo estrecho* (Casseday & Covey, 1992; LeBeau *et al.*, 2001) o de *tipo I* (Egorova *et al.*, 2001). Otras neuronas presentan un área de respuesta muy reducida, no sólo para las frecuencias, sino también para las intensidades, y se han definido como de *tipo O* (Ramachandran *et al.*, 1999) o *cerrado* (Casseday & Covey, 1992; LeBeau *et al.*, 2001).

Aproximadamente en un cuarto de los mapas registrados, el rango de frecuencias en el que la neurona responde se desplaza a medida que el nivel de intensidad aumenta (Hernández *et al.*, 2005). Estos Mdf se denominan *desviados a bajas frecuencias* si el rango de frecuencias está desplazado hacia frecuencias más bajas que su FI, o *desviados a altas frecuencias* si el rango de frecuencias se desplaza hacia frecuencias más altas que su FI. Además, encontramos Mdf de tipo *picos múltiples* que tienen dos o más regiones excitadoras separadas

por un área de poca o ausencia de respuesta y son la clase más común dentro de los no-V. Dentro de la clase de Mdf de tipo no-V hay neuronas que responden a un amplio rango de frecuencias cerca del umbral. Este tipo de respuesta se denomina como Mdf *con forma de U*. Unas pocas neuronas presentan un área de respuesta en forma de islas de inhibición y sin una FI clara. Estas respuestas se han denominado como Mdf de *tipo mosaico*. Finalmente también se han registrado Mdf de *tipo inhibido* en los que se observa una reducción de la actividad espontánea, revelando un efecto inhibitor del estímulo.

Los campos receptivos han sido estudiados cuantitativamente en el CI de la rata (Hernández *et al.*, 2005), partiendo de un análisis de forma visual, como *tipo V* y *tipo no-V* siguiendo los esquemas de clasificación establecidos por otros autores (Sutter & Schreiner, 1991, en la corteza auditiva del gato; LeBeau *et al.*, 2001, en el CI de cobayo). Los Mdf en forma de V muestran un patrón de respuesta primario, similar al de las fibras del NA (Evans, 1972; Liberman & Kiang, 1978; Ruggero, 1992), cosa que no ocurre en los de tipo no-V. En función de estos criterios, alrededor de dos tercios de las neuronas del CI presentan Mdf con forma de V (Figs. 1A y 2A), y un tercio con forma de no-V (Fig. 3A).

El análisis cuantitativo del estudio de la *inversa de las pendientes* obtenidas a partir de los bordes que delimitan el Mdf a bajas y altas frecuencias, ha demostrado que los tipos de Mdf no están distribuidos en categorías discretas, sino que forman una serie continua en cuanto a la forma y la anchura, con una gran variabilidad a través de todo el rango de frecuencias (Hernández *et al.*, 2005). La forma básica en V de los Mdf encontrada en las fibras del NA puede en algunos casos ser mantenida; sin embargo, en la mayoría de los casos es esculpida en diferentes grados por la combinación de aferencias excitadoras e inhibitoras, como muestran varios trabajos (Yang *et al.*, 1992; LeBeau *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2005).

## SIMILITUDES Y DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS.

Los tipos de Mdf que se encuentran en la rata son muy similares a aquellos descritos en el CI de cobayo (LeBeau *et al.*, 2001), ratón (Egorova *et al.*, 2001), y gato (Ehret & Merzenich, 1988; Ramachandran *et al.*, 1999), aunque el porcentaje entre los diferentes tipos varía según el modelo animal empleado en los experimentos (tipo V: 69% en rata, 84 % en cobayo, 66% en ratón, 12% en gato; tipo no-V: 29% en rata, 16% en cobayo, 34% en ratón y 88% en gato). Estas diferencias pueden ser explicadas, al menos en parte, por los criterios de clasificación diferentes empleados en los distintos estudios. Por lo tanto, no está claro si estas diferencias representan variaciones genuinas y específicas de cada especie, o reflejan procedimientos quirúrgicos diferentes empleados en la preparación experimental (animal intacto vs. descerebrado), un sesgo en el muestreo dentro del CI u otros factores tales como los efectos de la anestesia (Evans & Nelson, 1973).

## IMPORTANCIA DE LA INHIBICIÓN.

En muchos casos las neuronas del CI no tienen una cantidad de actividad espontánea suficiente para revelar las áreas de inhibición. Además, en otros casos, el uso de algunos anestésicos tiende a reducir dicha actividad espontánea. Sin embargo, es fundamental conocer cómo actúa la inhibición, ya que ésta parece moldear las áreas de respuesta excitatorias, dando lugar a algunos de los tipos de Mdf mencionados anteriormente. Para poder estudiar las áreas inhibidas en aquellas neuronas sin actividad espontánea o muy escasa, se emplea un método de estimulación conocido como '*supresión con dos tonos*'. Este método consiste en la construcción de un Mdf con

la presentación simultánea de dos tonos. Uno de los tonos es siempre el mismo, de una intensidad y una frecuencia determinadas previamente, y ha de ser capaz de provocar una respuesta excitatoria moderada en la neurona. Habitualmente la frecuencia de este tono es la FI de la neurona, y la intensidad es baja (en torno a 15 ó 20 dB por encima del umbral de la neurona). El segundo tono varía aleatoriamente en frecuencia e intensidad en cada presentación del estímulo, tal como se hace en la construcción rutinaria de un MdF. De esta forma, si alguna combinación de frecuencia e intensidad tiene un efecto supresor/inhibitorio en la neurona, la respuesta al primer tono será suprimida en esa zona del MdF (Figs. 2B y 3B, asteriscos).

Gracias a este método se puede observar que una gran cantidad de neuronas del CI (~75 %) presentan áreas de supresión/inhibición en su respuesta, muchas de las cuales son muy amplias en frecuencia y otras son compatibles con bandas de inhibición lateral (~ 50 %). Esta inhibición afecta principalmente a los MdFs tipo no-V, aunque también son evidentes en algunos casos de MdFs de tipo V. Como se puede observar en la figura 2, es muy probable que las dos zonas de inhibición (bandas laterales) que flanquean la zona de respuesta excitatoria resulten de la interacción de dos MdFs, uno excitador y otro inhibidor, cuya FI es similar (ver línea punteada). Por ello, podemos concluir que el análisis espectral en el CI se produce, al menos en parte, gracias a procesos inhibitorios generados a

nivel local.

## ORIGEN DE LA INHIBICIÓN.

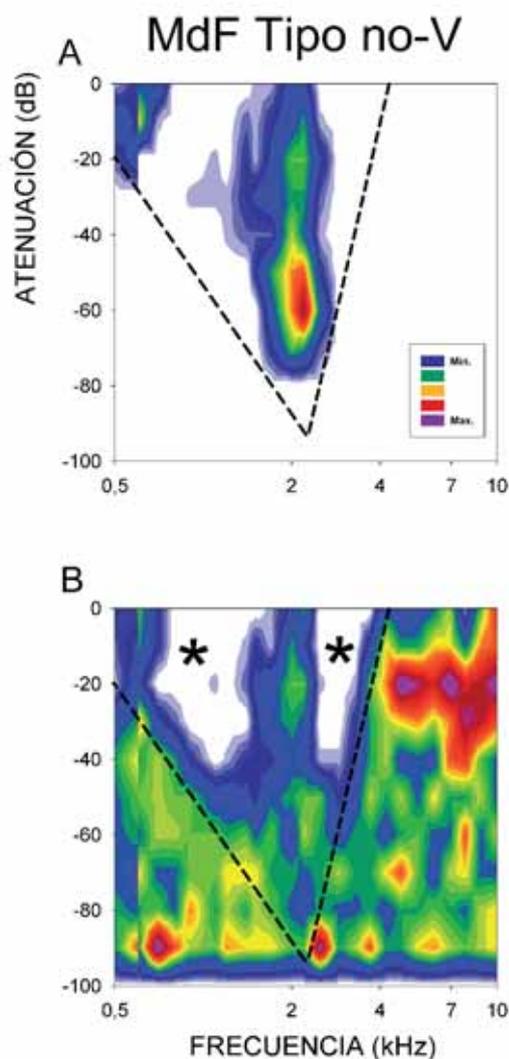
Los experimentos llevados a cabo con el paradigma de supresión con dos tonos permiten identificar áreas de inhibición, tanto en los mapas de tipo no-V (Fig. 3) como en los tipo V (Fig. 2). Aunque algunas de las zonas de supresión/inhibición podrían representar fenómenos de la dinámica coclear (p.e., Fig. 2B; Sutter *et al.*, 1999), conviene subrayar que muchos de los patrones de supresión observados poseen umbrales muy bajos de inhibición, así como extremadamente amplios (p.e., Fig. 3B), que en ningún caso podrían ser un mero reflejo de fenómenos puramente mecánicos y los podemos interpretar sin género de dudas como procesos neuronales inhibitorios. Ello además es compatible con estudios de bloqueo de la inhibición GABAérgica y glicinérgica, en los que se ha demostrado que la frecuencia de descarga de las neuronas con MdFs de tipo V se incrementa dentro del campo receptivo, pero no se observó cambio en la forma (Palombi & Caspary, 1996; LeBeau *et al.*, 2001). Por el contrario, en el caso de los MdFs de tipo no-V, las áreas de respuesta se agrandan convirtiéndose en forma de V, o al menos sufren una clara expansión (murciélago: Yang *et al.*, 1992; chinchilla: Wang *et al.*, 1996; cobayo: LeBeau *et al.*, 2001). Estos experimentos apoyan la idea de que los procesos inhibitorios, dentro del CI, juegan un papel muy importante en la formación de los MdFs de tipo no-V. Por otra parte, es difícil concretar el origen de las aferencias responsables de moldear los MdFs. Si bien una de las posibilidades consiste en que se trate de proyecciones *intracolliculares*, no se puede obviar la posible implicación de los centros localizados en el tronco del encéfalo. Entre los candidatos de estos últimos se encontrarían el *complejo olivar superior*, y los *núcleos del lemnisco lateral* (Oliver, 2000; Malmierca, 2003; Malmierca & Merchán, 2004). La interacción y el balance entre estas aferencias inhibitorias y excitadoras hacia el CI determinarían los diferentes subtipos de MdF.

### Agradecimientos

El trabajo de los autores mencionado en el artículo fue financiado por DGES (BFI-2003-09147-02-01) y JCYL-UE (SA040/04) para MSM, por una beca predoctoral del MCYT (FP-2000-1358). SC tiene una Beca de la USAL y MAI del MEC (BFI-2003-09147). DPG está temporalmente en el Dpt Psychology, University of Washington y financiado por NIDCD DC-00607.

### Bibliografía

- Bauer CA, Brozowski TJ, Holder TM, Caspary DM (2000) Effects of chronic salicylate on GABAergic activity in rat inferior colliculus. *Hear Res* 147:175-182.
- Carlier E, Pujol R (1982) Sectioning the efferent bundle decreases cochlear frequency selectivity. *Neurosci Lett* 28:101-106.
- Caspary DM, Holder TM, Hughes LF, Milbrandt JC, McKernan RM, Naritoku DK (1999) Age-related changes in GABA(A) receptor subunit composition and function in rat auditory system. *Neuroscience* 93:307-312.
- Casseday JH, Covey E (1992) Frequency tuning properties of neurons in the inferior colliculus of an FM bat. *J Comp Neurol* 319:34-50.
- Ehret G, Merzenich MM (1988) Complex sound analysis (frequency resolution filtering and spectral integration) by single units of the inferior colliculus of the cat. *Brain Res Rev* 489(1): 101-112.
- Evans EF (1972) The frequency response and other properties of single fibres in the guinea-pig cochlear nerve. *J Physiol* 226:263-287.
- Evans EF (1979) Single unit studies of the mammalian auditory nerve. In: *Auditory investigations: the scientific and technological basis* (Beagley HA, ed), pp 324-336. Oxford University Press: Oxford.
- Evans EF, Nelson PG (1973) The responses of single neurones in the cochlear nucleus of the cat as a function of their location and the anaesthetic state. *Exp Brain Res* 17:402-427.
- Egorova M, Ehret G, Vartanian I, Esser KH (2001) Frequency response areas of neurons in the mouse inferior colliculus: I. Threshold and tuning characteristics. *Exp Brain Res* 140:145-161.
- Faingold CL (2002) Role of GABA abnormalities in the inferior colliculus pathophysiology-audiogenic seizures. *Hear Res* 168:223-237.
- Hernández O, Espinosa N, Perés-González D, Malmierca MS (2005) The inferior colliculus of the rat: a quantitative analysis of monaural frequency response



**Figura 3:** (A) Ejemplo de MdF de tipo no-V, con un área de respuesta de tipo estrecho. En este caso con la técnica de "supresión con dos tonos" (B) observamos claramente que el área de respuesta presenta dos zonas de inhibición, que determinan la respuesta de tipo estrecho. Muy probablemente, las dos zonas de inhibición (bandas laterales, asteriscos) que flanquean la zona de respuesta excitatoria resultan de la interacción de dos MdF, uno excitador y otro inhibidor, cuya FI es similar pero con un umbral ligeramente menor en el caso de MdF inhibidor (ver línea punteada). Escala de colores: normalizado a la máxima descarga en %.

areas. *Neuroscience* 132:203–217

-Irvine DRF (1992) Physiology of the auditory brainstem. In: *Mammalian auditory pathway: neurophysiology*, (Popper A, Fay RR, eds), pp 153–231. New York: Springer Verlag.

-Kelly JB, Glenn SL, Beaver CJ (1991) Sound frequency and binaural response properties of single neurons in rat inferior colliculus. *Hear Res* 56:273–280.

-LeBeau FE, Malmierca MS, Rees A (2001) Iontophoresis in vivo demonstrates a key role for GABA (A) and glycinergic inhibition in shaping frequency response areas in the inferior colliculus of guinea pig. *J Neurosci* 21:7303–7312.

-Lieberman MC, Kiang NYS (1978) Acoustic trauma in cats: cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl* 358:1–63.

-Malmierca MS (2003) The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. In: *Int Rev Neurobiol*, Vol. 58 (Bradley RJ, Harris RA, Jenner P, eds), pp 147–211.

-Malmierca MS, Hernández O, Falconi A, Lopez-Poveda EA, Merchán MA, Rees A (2003) The commissure of the inferior colliculus shapes frequency response areas in rat: an in vivo study using reversible blockade with microinjection of kynurenic acid. *Exp Brain Res* 153:522–529.

-Malmierca MS, Merchán M (2004) The auditory system. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 995–1080. San Diego: Academia Press.

-Malmierca MS, Irvine DRF (2005) Auditory spectral processing. *Int. Rev Neurobiol* vol. 70 (en prensa)

-Møller AR (1978) Frequency selectivity of the peripheral auditory analyzer studied using broad band noise. *Acta Physiol Scand* 104:24–32.

-Oliver DL (2000) Ascending efferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51:355–363.

-Palombi PS, Caspary DM (1996) GABA inputs control discharge rate primarily within frequency receptive fields of inferior colliculus neurons. *J Neurophysiol* 75:2211–2219.

-Ramachandran R, Davis KA, May BJ (1999) Single-unit responses in the inferior colliculus of decerebrate cats: I. Classification based on frequency response maps. *J Neurophysiol* 82:152–163.

-Ruggero MA (1992) Physiology and coding of sound in the auditory nerve. In: *The mammalian auditory pathway: neurophysiology* (Popper A, Fay RR, ed), pp 34–93. New York: Springer Verlag.

-Shofner WP, Young ED (1985) Excitatory/inhibitory response types in the cochlear nucleus: relationships to discharge patterns and responses to electrical stimulation of the auditory nerve. *J Neurophysiol* 54:917–939.

-Snyder RL, Sinex DG, McGee JD, Walsh EW (2000) Acute spiral ganglion lesions

change the tuning and tonotopic organization of cat inferior colliculus neurons. *Hear Res* 147:200–220.

-Snyder RL, Sinex DG (2002) Immediate changes in tuning of inferior colliculus neurons following acute lesions of cat spiral ganglion. *J Neurophysiol* 87:434–452.

-Suga N (1995) Sharpening of frequency tuning by inhibition in the central auditory system: tribute to Yasuji Katsuki. *Neurosci Res* 21:287–299.

-Suga N, Zhang Y, Yan J (1997) Sharpening of frequency tuning by inhibition in the thalamic auditory nucleus of the mustached bat. *J Neurophysiol* 77:2098–2114.

-Suneja SK, Potashner SJ, Benson CG (1998) Plastic changes in glycine and GABA release and uptake in adult brain stem auditory nuclei after unilateral middle ear ossicle removal and cochlear ablation. *Exp Neurol* 151:273–288.

-Sutter ML, Schreiner CE (1991) Physiology and topography of neurons with multiplexed tuning curves in cat primary auditory cortex. *J Neurophysiol* 65:1207–1226.

-Sutter ML, Schreiner CE, McLean M, O'Connor KN, Loftus WC (1999) Organization of inhibitory frequency receptive fields in cat primary auditory cortex. *J Neurophysiol* 82:2358–2371.

-Sutter ML (2000) Shapes and level tolerances of frequency tuning curves in primary auditory cortex: quantitative measures and population codes. *J Neurophysiol* 84:1012–1025.

-Wang J, Salvi RJ, Powers N (1996) Plasticity of response properties of inferior colliculus neurons following acute cochlear damage. *J Neurophysiol* 75:171–183.

-Yang L, Pollak GD, Reisler C (1992) GABAergic circuits sharpen tuning curves and modify response properties in the mustache bat inferior colliculus. *J Neurophysiol* 68:1760–1774.

-Young ED, Brownell WE (1976) Responses to tones and noise of single cells in dorsal cochlear nucleus of unanesthetized cats. *J Neurophysiol* 39:282–300.

Correspondencia a :

Dr. Manuel S. Malmierca. (msm@usal.es)

Unidad de Neurofisiología Auditiva. Laboratorio de Neurobiología de la Audición. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

Campus 'Miguel de Unamuno' 37007 Salamanca

**La demostración de efectos neuroprotectores de los estrógenos en modelos animales y celulares parece fuera de toda duda, relacionándose con una pléyade de mecanismos aún sin aclarar. En los últimos años, un número creciente de evidencias en diversos modelos neuronales han señalado la importancia de las acciones estrogénicas rápidas desencadenadas a nivel de la membrana plasmática en la neuroprotección contra diferentes agentes tóxicos. La evidente versatilidad del estrógeno en su manera de interactuar con la neurona nos lleva irreversiblemente a considerar la existencia de un escenario celular con diversos mecanismos estrogénicos interconectados, actuando de manera complementaria y/o simultánea para la elaboración de la respuesta neuroprotectora final.**

## LAS VIAS ESTROGÉNICAS ALTERNATIVAS COMO POTENCIADORES DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL: POSIBLEMENTE PROMETEDORAS PERO CIERTAMENTE COMPLEJAS. Raquel Marín y Mario Díaz.

A pesar de la controversia existente sobre la validez y eficacia de la terapia sustitutiva de estrógenos en mujeres post-menopáusicas, numerosos estudios clínicos y experimentales en modelos animales e *in vitro* han demostrado la existencia de efectos beneficiosos de los estrógenos frente a la patología observada en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. Las acciones estrogénicas en la preservación del buen funcionamiento del sistema nervioso son muy variadas, sugiriendo la presencia de una gran diversidad de mecanismos moleculares aún poco elucidados. Si bien en un principio las acciones de los estrógenos en el cerebro en concentraciones fisiológicas se creían únicamente mediadas por un mecanismo clásico a través de la actividad transcripcional de receptores intranucleares, investigaciones posteriores han demostrado la inducción rápida de acciones del estradiol a través de mecanismos alternativos desencadenados a nivel de la membrana plasmática y mediados en muchos casos por receptores estrogénicos asociados a la misma. Si bien se desconocen aún muchos aspectos sobre la identidad, característi-

cas y modulación de estos receptores alternativos, se tiene constancia de su importante participación en la respuesta celular de protección frente a una lesión que complementaría, en última instancia, las acciones de los receptores de estrógenos intracelulares.

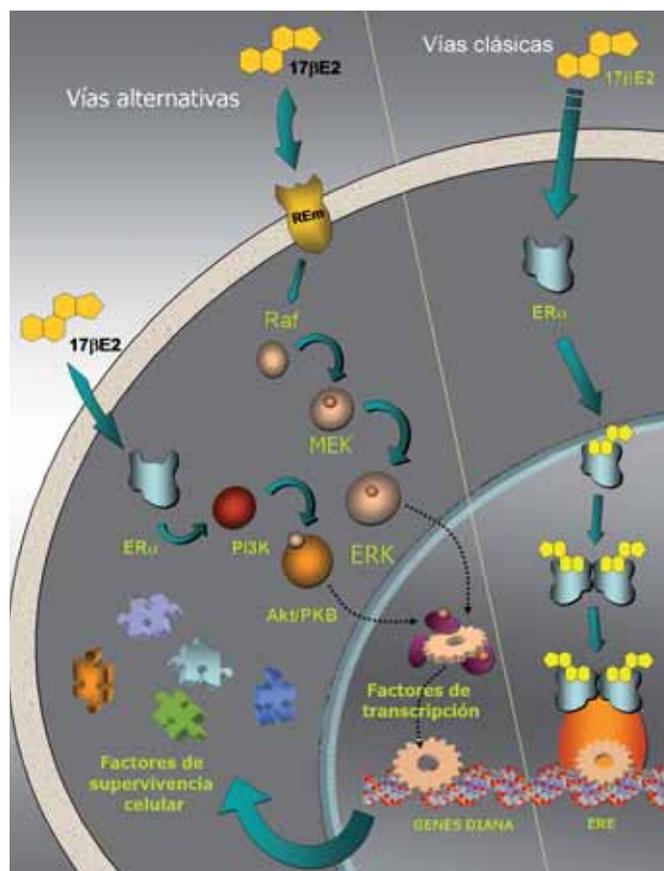
Las hormonas sexuales en el sistema nervioso presentan múltiples funciones ya no únicamente en la diferenciación de circuitos neurales durante el desarrollo, sino como importantes contribuyentes a la plasticidad durante la etapa adulta. El incremento progresivo de la esperanza de vida en los países occidentales ha acarreado como consecuencia que las mujeres pasen una buena parte de su vida en etapas post-menopáusicas. Ello explica que la reducción en los niveles circulantes de esteroides sexuales con la edad constituya un factor adicional en el deterioro de diversas funciones neurales, hecho que justifica la necesidad de evaluar los efectos beneficiosos de la terapia hormonal sustitutiva (THS). Sin embargo, los datos epidemiológicos a favor de que este tipo de terapias pueda redu-

cir el riesgo y la severidad de los síntomas en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) y el Parkinson han sido controvertidos, observándose tan sólo en algunos casos efectos beneficios del tratamiento del estradiol en la función cognitiva de mujeres post-menopáusicas. Estas observaciones justifican la necesidad de diseños experimentales más precisos y concluyentes, considerando además el hecho de que las pautas de tratamiento de larga duración no han tenido en cuenta los datos experimentales en relación con la multiplicidad de mecanismos de acción de los estrógenos, hecho que podría explicar el aparente fracaso de estas terapias. Otras observaciones experimentales derivadas de estudios en modelos animales y celulares que contrastan con las TSH, son el hecho de que los tratamientos se han basado en el uso de múltiples estrógenos equinos combinados y no de una única molécula, la reducción de la sensibilidad de las dianas neuronales tras una prolongada privación hormonal como suele ser el caso en mujeres de post-menopausia avanzada, así como la regulación negativa que una exposición estrogénica de dosis constante puede ejercer sobre sus propios receptores en el cerebro adulto. Un factor añadido y de extrema relevancia es el hecho de la existencia de acciones estrogénicas sinérgicas y complementarias en los tejidos neurales, a través de mecanismos complejos que modulan la respuesta celular en situaciones de toxicidad. Estas observaciones justifican tanto la necesidad de diseños más precisos como el mejor conocimiento de las acciones estrogénicas en la neurona.

## COMPLEJIDAD DE MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA HORMONA ESTEROIDE: TODOS PARA UNA, Y UNA PARA TODOS.

La demostración de efectos neuroprotectores de los estrógenos en modelos animales y celulares parece fuera de toda duda, relacionándose con una pléyade de mecanismos aún sin aclarar. Ello ha suscitado el desarrollo de diversos modelos de neurodegeneración *in vitro* realizados en cultivos primarios y líneas neuronales que constituyen un instrumento útil para la caracterización de los factores neuroprotectores de esta hormona (revisado en García-Segura *et al.*, 2001). De esta manera, además de las propiedades antioxidantes del estradiol en dosis suprafisiológicas, se han caracterizado efectos supresores de la elevación aberrante de calcio intracelular y de la modulación de la apoptosis inducida por diferentes tipos de toxicidad. Otros estudios han demostrado que el estradiol ejerce un efecto preventivo de la mortalidad neuronal frente al estrés oxidativo, toxicidad por glutamato o derivado de la privación de suero. En el caso de las alteraciones anatomopatológicas características de EA, se ha observado que los efectos neurotóxicos provocados por la acumulación en fibrillas intracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) son ampliamente atenuados por el estradiol, describiéndose acciones de la hormona sobre la actividad secretasa y el metabolismo del  $\beta$ A que aminora la generación de placas neuríticas, la recaptación de  $\beta$ A por las microglía e incluso, como se ha demostrado, entre otros, en nuestro propio grupo de trabajo, la reducción significativa de la muerte celular inducida por exposición a diversos fragmentos de  $\beta$ A (Marin *et al.*, 2003-a).

La demostración de estas acciones beneficiosas de los estrógenos ha sido igualmente evidenciada en modelos animales, en los que la disminución de los niveles circulantes de estrógenos como consecuencia de la ovariectomización en ratas y primates induce una reducción en el número de neuronas, mientras que la administración de estradiol ejerce una acción preventiva. Asimismo, el estradiol atenúa el daño cerebral provocado por lesiones isquémicas en roedores, estando esta acción relacionada con la modulación de la expresión de proteínas antiapoptóticas y factores de crecimiento y diferenciación neuronal.



**Figura 1.** Mecanismos de neuroprotección por estrógenos. El estradiol mediaría la protección neuronal frente a estímulos tóxicos por medio de dos tipos de mecanismos, a saber, los denominados clásicos (vías clásicas), induciendo la transcripción de genes de supervivencia que contienen elementos de respuesta a estrógenos (ERE); y/o a través de vías alternativas. Estos mecanismos alternativos implicarían la activación de vías de señalización celular, que se inician bien en un receptor de estrógenos de membrana (REm) y desembocan en ERK (Extracellular regulated kinase), bien a través de la activación de un receptor canónico de tipo  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ), citosólico, que modularía positivamente a PI3K (phosphatidylinositol 3-OH kinase) y Akt/PKB (protein kinase B). La activación de ERK y de PI3K bien separadamente, bien de manera sinérgica, induciría actividad transcripcional y la síntesis de factores de supervivencia neuronal.

## MECANISMOS MOLECULARES DE NEUROPROTECCIÓN ESTROGÉNICA: LOS RÁPIDOS TAMBIÉN PARTICIPAN.

Si bien durante décadas se creyó que las acciones estrogénicas en el cerebro tenían lugar por mecanismos denominados clásicos, a través de un único receptor intracelular (RE) que se unía a la hormona para iniciar la transcripción génica de diferentes factores relacionados con la supervivencia y diferenciación celular, estos mecanismos no explicaban la totalidad del rango de acciones estrogénicas en neuronas, incluyendo las acciones rápidas (en pocos minutos) del estradiol. Más recientemente se han propuesto diversos mecanismos para explicar la manera en la que tanto los estrógenos como los moduladores selectivos de los estrógenos (SERMs: *selective estrogen receptor modulators*) ejercerían efectos preventivos de muerte neuronal. De esta manera, los fisiólogos A. Nadal, M. Díaz y M.A. Valverde (A. Nadal *et al.*, 2001) denominaron "Trinidad estrogénica" al conjunto de acciones que engloban: 1) mecanismos clásicos o genómicos mediados por REs; 2) mecanismos alternativos en los que participan segundos mensajeros y señalización por quinasas; 3) mecanismos independientes de REs. Entre ellos, tan sólo los dos primeros, mediados o no por REs, tienen relevancia a dosis fisiológicas y no únicamente como consecuencia de la capacidad antioxidante del estrógeno. Para añadir una mayor complejidad a los mecanismos mediadores de neuroprotección por estrógenos, éstos parecen tener lugar de una manera sinérgica y coordinada para elaborar la respuesta celular final (revisado en Marin *et al.*, 2006). En los últimos años, un número creciente de evidencias en

diversos modelos neuronales han señalado la importancia de las acciones estrogénicas rápidas desencadenadas a nivel de la membrana plasmática en la neuroprotección contra diferentes agentes tóxicos (revisado en Dhandapani y Brann, 2002). Estos mecanismos ocurren a dosis fisiológicas de la hormona, tienen lugar en pocos minutos y se ha demostrado en algunos casos que se ejercen a través de REs no convencionales con localización extranuclear (en el citosol o asociados a la membrana plasmática). Los receptores alternativos han sido identificados en diversas áreas cerebrales vulnerables a procesos neurodegenerativos, si bien se desconoce aún su naturaleza y características estructurales. Dada la dificultad de estudio de los mecanismos no-clásicos en modelos *in vivo*, la mayoría de las evidencias de las potenciales acciones rápidas estrogénicas preventivas de lesión neuronal se han obtenido con experimentos realizados en cultivos de células inmortalizadas procedentes de diversos tejidos de interés en el estudio de diversas neuropatologías (hipocampo, hipotálamo, septum, corteza) expuestos a diversos tipos de toxicidad (deprivación de suero, toxicidad por glutamato o exposición al péptido  $\beta$ -amiloide). En nuestro laboratorio, utilizando una línea neuronal derivada de septum de ratón expuesta al fragmento 1-40 del amiloide ( $\beta A_{1-40}$ ) hemos aportado la primera evidencia de la acción neuroprotectora de dosis fisiológicas de estradiol a través de un receptor asociado a la membrana plasmática (REm) que participa en estos efectos beneficiosos (Marin *et al.*, 2003-b). Este REm parece conservar homologías estructurales con el REa canónico expresado en estas células, si bien su identidad molecular no ha sido aún totalmente elucidada (Marin *et al.*, 2006). Otros estudios en explantes de corteza de ratón han aportado evidencias de la existencia de un receptor en la membrana neuronal asociado a microdominios del tipo caveola, que es funcionalmente distinto de los REs clásicos y que parece participar en la preservación celular.

### DIVERSAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ACTIVADAS POR ESTRÓGENOS DESEMPEÑAN UN PAPEL IMPORTANTE EN LA NEUROPROTECCIÓN.

En lo que se refiere a los desencadenantes intracelulares que podrían participar en la protección neuronal tras la unión del estradiol a la membrana plasmática a través o no de un receptor estrogénico, las evidencias recientes indican que estas uniones podrían activar de manera rápida vías de señalización relacionadas con la fosforilación de diferentes quinasas (Beyer *et al.*, 2003). Las vías principales identificadas en diversos modelos neuronales que parecen desempeñar un importante papel en este efecto son la vía de la **ERKs (MAPKs, extracellular regulated kinases)** y la vía de **PI-3K (phosphatidylinositol-3 kinase)** (Marin *et al.*, 2005) (ver figura). Estos mecanismos son independientes de la síntesis proteica, si bien pueden conducir a medio o largo plazo a la modulación de la expresión de determinados genes y/o a la modificación de la fosforilación de determinadas proteínas para promover las acciones neuroprotectoras del estradiol.

En particular, la activación por estradiol tanto de la vía de MAPKs como de PI-3K podría ser un evento crucial en la supervivencia celular frente a la patología por EA. En este orden de ideas, en las líneas inmortalizadas de septum (SN56) y de hipocampo (HT22) expuestas al péptido  $\beta A$ , se ha demostrado la participación de la vía de MAPKs y, en el caso de SN56, hemos constatado que se inicia por la activación por el estradiol de Raf-1/MEK/MAPK a través de la modulación de un REm (Guerra *et al.*, 2004). La inducción rápida de la fosforilación de MAPKs por el estradiol ha sido igualmente demostrada en cultivos primarios de hipocampo y pituitaria, y en explantes neocorticales de rata, así como *in vivo*, tras la administración aguda de estradiol, observándose la activación simultánea de

la fosforilación de MAPKs en algunos tejidos neurales de manera específica. Otras evidencias experimentales, tanto en cultivos neuronales como en cerebros de ratas adultas, han sugerido que los efectos del estradiol en el cerebro serían parcialmente mediados por la activación de la vía de señalización PI-3K, a través del aumento de la fosforilación de **Akt/PKB (protein kinase B)**. Este mecanismo parece desempeñar igualmente un papel importante en la neuroprotección mediada por estrógenos, como lo demuestran los estudios de modelos de toxicidad frente a glutamato y  $\beta A$  en neuronas corticales e hipocampales, observándose una disminución de la apoptosis celular tras la activación de esta vía de señalización a través de la modulación de receptores estrogénicos. Por otra parte, **GSK-3 (glycogen synthase kinase-3)** es otra quinasa fosforilada por la vía de PI-3K que ha adquirido particular interés en trabajos de última hornada, por su implicación en la modulación de la secreción de la forma no amiloidogénica de la proteína precursora del amiloide (APP: *amyloid precursor protein*) mediada por acciones rápidas del estradiol, produciendo por consiguiente una disminución de la acumulación de  $\beta A$ . Además, la activación de la fosforilación de GSK-3 por estrógenos previene la muerte celular, como se demuestra en paradigmas de EA utilizando modelos de toxicidad por ácido kaínico (un análogo cíclico del glutamato que despolariza membranas pre- y post-sinápticas) en hipocampo. Sin embargo, a pesar de los interesantes y prometedores hallazgos, aún se requieren nuevos datos experimentales para caracterizar los factores potenciales que participan en la modulación de estas vías de señalización como respuesta al daño cerebral.

### ORQUESTACIÓN DE LOS MECANISMOS ESTROGÉNICOS CLÁSICOS Y NO-CLÁSICOS EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROPROTECTORA: LA CÉLULA ELABORA LA COREOGRAFÍA.

La evidente versatilidad del estrógeno en su manera de interaccionar con la neurona nos lleva irreversiblemente a considerar la existencia de un escenario celular con diversos mecanismos estrogénicos interconectados, actuando de manera complementaria y/o simultánea para la elaboración de la respuesta neuroprotectora final. Sin embargo, si bien atractiva, es aún especulativa la manera en la que se efectuaría la integración de estos mecanismos en un tipo de neurona o de tejido neuronal específico, su regulación durante el desarrollo y la diferenciación, así como en situaciones neuropatológicas. En nuestros estudios llevados a cabo en la línea septal SN56 expuesta a toxicidad por  $\beta A$ , hemos demostrado la participación en la supervivencia celular tanto de un RE $\alpha$  por mecanismos clásicos tras exposiciones largas a estradiol, que conlleva el aumento de la actividad transcripcional del receptor, como de mecanismos rápidos, desencadenados por interacciones del estradiol con la membrana plasmática a través de un REm que provoca la activación de la vía de señalización de MAPKs. Si bien no hemos aún identificado el lugar de convergencia de estos dos mecanismos, estos resultados demuestran la capacidad de estas neuronas para integrar señales intracelulares diferentes y obtener, en última instancia, una respuesta protectora frente a la toxicidad inducida por  $\beta A$ . En línea con estos hallazgos, se ha observado que la activación de la fosforilación de MAPK por REm produce un aumento de la fosforilación del receptor intranuclear necesaria para el inicio de la actividad transcripcional. Las potenciales acciones sinérgicas del estrógeno a través de mecanismos de membrana y genómicos ha sido igualmente demostrado en modelos animales de ratas ovariectomizadas, en los que se puede especular sobre la importancia de las acciones clásicas estrogénicas en la regulación de la expresión neuronal de proteínas asociadas a la membrana

plasmática relacionadas con las acciones rápidas del estradiol. En definitiva, estos mecanismos polifacéticos de los estrógenos podrían proveer a la célula con una adaptabilidad funcional que debería tenerse en consideración en el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para prevenir y contrarrestar la neurodegeneración observada en enfermedades como el EA. Quizás el esclarecimiento de estos mecanismos nos podrá permitir el diseño experimental de combinaciones de moduladores selectivos estrogénicos altamente específicos que conduciría a una mayor eficacia de las terapias, así como a la reducción de los posibles efectos secundarios adversos. Al menos, el escenario celular con la participación del estradiol empieza a entreabrir paulatinamente su telón.

#### Bibliografía

- Beyer, C, Pawlak, J y Karolczak, M. (2003) Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J Neurochem* 87:545-550.
- Dhandapani, KM y Brann, DW. (2002) Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod* 67:1379-1385.
- García-Segura, LM, Azcoitia, I y DonCarlos, LL. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.
- Guerra, B, Díaz, M, Alonso, R y Marin, R. (2004) Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against b-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem*

91:99-109.

- Marin, R, Guerra, B, Hernandez-Jimenez, JG, Kang XL, Fraser, JD, Lopez, FJ y Alonso, R. (2003-a) Estradiol prevents amyloid-beta peptide-induced cell death in a cholinergic cell line via modulation of a classical estrogen receptor. *Neuroscience* 121:917-926.
- Marin, R, Guerra, B, Hernandez-Jimenez, JG, Kang XL, Fraser, JD, Lopez, FJ y Alonso, R. (2003-b) An oestrogen membrane receptor participates in estradiol actions for the prevention of amyloid-b peptide1-40-induced toxicity in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem* 85:1180-1189.
- Marin R., Ramírez C. M., González M., Alonso R. y Díaz M. (2006) Alternative estrogen receptors homologous to classical receptor a in murine neural tissues. *Neurosci. Lett.* 395(1): 7-11.
- Marin, R., Guerra, B., Ramírez C., Alonso R. y Díaz M. (2005) Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection. *Curr. Neurovasc. Res.* 2:287-301.
- Nadal A., Díaz M. y Valverde M. A. (2001) The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol. Sci.* 16:251-255.

Raquel Marín<sup>1</sup> y Mario Díaz<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de La Laguna.

Autor para la correspondencia:

Raquel Marín

Laboratorio de Neurobiología Celular, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife 38320.

Teléfono: 922 319411.

Fax: 922 319397.

E-mail: rmarin@ull.es

## OPINIÓN

**Al contrario que la mayoría de los países desarrollados, en España carecemos de estudios universitarios de Audiología. Promocionar la Audiología en todas sus dimensiones, como área del conocimiento, como campo de investigación y como ciencia de apoyo al ciudadano, debería ser un objetivo prioritario de quienes llevan las riendas de la política universitaria.**

### AUDIOLOGÍA: UNA CARENCIA INCOMPRESIBLE. *Enrique A. López Poveda*

Es un hecho: España ocupa el segundo lugar en la lista de los países más ruidosos del mundo; sólo superado por Japón. Es bien sabido que la exposición prolongada al ruido, no sólo produce estrés y ansiedad, también perjudica irreversiblemente la audición. No debería sorprendernos, por tanto, que, tal y como revelan las encuestas del Instituto Nacional de Estadística, aproximadamente diez de cada cien españoles mayores de 65 años manifiesten algún tipo de discapacidad auditiva.

Estos datos son ya suficientemente preocupantes, pero no acaba ahí la cosa. España es también el país con la tasa de natalidad más baja del planeta, lo que significa que nuestra población envejece más rápidamente que la de cualquier otro. Si hacemos las cuentas, el pronóstico es inequívoco: en pocos años, España será también el país con la mayor proporción de ciudadanos sordos del mundo. Pero esto parece importar poco a nuestros políticos; poco... o más bien nada.

España que es, sin duda, un estado singular en muchos aspectos, también lo es, paradójica e incomprensiblemente, en la insignificancia que concede a la Audiología, la ciencia que investiga la audición y sus problemas. Por supuesto, está la otorrinolaringología, que sí recibe la consideración adecuada. Pero la "otorrino" se ocupa del oído, no de la audición.

Es cierto que sin el uno no es posible la otra. Pero de la misma forma que la televisión, en su sentido más amplio, es mucho más que una antena, la audición es mucho más que el oído. La audición es un proceso cognitivo imprescindible para que el individuo alcance la plena integración social.

Al contrario que la mayoría de los países desarrollados, en España carecemos de estudios universitarios de Audiología. Y no me refiero sólo a licenciaturas o diplomaturas, sino a cualquier tipo de estudios sobre esta disciplina. Más aún, el Consejo General de Universidades, responsable de velar por la calidad, modernidad y relevancia social de los títulos universitarios, ni siquiera contempla la Audiología como un área del conocimiento.

La singularidad de nuestro país se pone de manifiesto también

en la escasa importancia que aquí se otorga a la investigación científica en Audiología. Desatendiendo la realidad de las discapacidades auditivas y su pronóstico, el Plan Nacional de Investigación y Desarrollo ni siquiera menciona la investigación en este campo, o en campos afines, entre sus líneas prioritarias. Asimismo carecemos de institutos de investigación comparables al National Institute of Deafness and Other Communication Disorders, USA (<http://www.nidcd.nih.gov/>), o al Institute of Hearing Research (<http://www.ihr.mrc.ac.uk/>), por poner sólo dos ejemplos. Incluso numerosas fundaciones, mecenas de la investigación biomédica, fomentan el estudio de otras enfermedades que son mucho menos frecuentes que los trastornos auditivos. Todo esto explica la escasa representación española en los foros internacionales en los que se discute sobre la audición y sus trastornos. También explica que dependamos de otros países en lo que respecta a su capacidad para generar la tecnología necesaria para tratar las discapacidades auditivas.

Son los ciudadanos quienes, en último extremo, sufren las consecuencias de la carencia de esta disciplina en nuestro país. Es habitual, por ejemplo, que los pacientes con problemas auditivos adquieran el audífono que se les prescribe aconsejados por delegados de ventas sin formación audiológica y casi siempre motivados por intereses económicos. El resultado es que uno de cada dos pacientes acaban frustrados al comprobar que el considerable desembolso que ha realizado resulta inútil para tratar su problema auditivo. La frustración es mayor si se tiene en cuenta que nuestro Sistema Nacional de Salud, al contrario que otros como el alemán, no facilita ayudas para adquirir los "dichosos aparatitos", por lo que el gasto le corresponde exclusivamente al paciente.

El panorama es, pues, deprimente. Comparativamente, en España las discapacidades auditivas son tan frecuentes como las visuales y, sin embargo, estas últimas están mucho mejor



atendidas. Por resumirlo de algún modo, parece que, entre nosotros, del ciego todo el mundo se compadece, mientras que del sordo sólo se mofan. Y eso que, como advirtió Kant, "no poder ver te aísla de los objetos; no poder oír te aísla de la gente." Promocionar la Audiología en todas sus dimensiones \_como área del conocimiento, como campo de investigación y como ciencia de apoyo al ciudadano\_ debería ser un objetivo prioritario de quienes llevan las riendas de la política universitaria. El momento actual, en que se está procediendo a la actualización del catálogo de titulaciones universitarias y se avanza hacia la convergencia europea en educación superior, parece el idóneo. Desgraciadamente, aunque soy de naturaleza optimista, me temo que se va a dejar pasar una oportunidad extraordinaria. Los que empujamos para que esta disciplina científica adquiera en España la relevancia que merece,

contemplamos con preocupación la ausencia de signos en otro sentido.

Para rectificar la escasa sensibilidad que se percibe en nuestro medio hacia la Audiología, tal vez sea lamentablemente necesario esperar a que el pronóstico se cumpla, y contemplar cómo se incrementa el número de personas afectadas por discapacidades auditivas y cómo se incrementa, de forma aún más evidente, nuestra dependencia tecnológica de terceros países para tratarlas. Es posible que, sólo entonces, quienes tienen la capacidad política para cambiar las cosas se decidan a hacerlo.

Enrique A. López Poveda  
Director de la Unidad de Computación Auditiva y Psicoacústica del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca

## LA VENTANA DEL FISIÓLOGO

**PAUL BROCA: FRENOLOGÍA Y CIENCIA.** Emilio Fernández-Espejo

Paul Broca fue un brillante neurocientífico francés del siglo XIX. Como neurólogo, aportó una contribución esencial al origen de la afasia. Describió que la lesión de un área de la corteza frontal se asociaba a la pérdida del habla, y afirmó que dicha zona del cerebro controla la emisión articulada del lenguaje. Su afirmación es cierta y, en su honor, a dicha área situada en la tercera circunvolución del lóbulo frontal izquierdo, se le denomina área de Broca. Los trabajos de Paul Broca se enmarcaban en una línea de pensamiento propia de la época: la frenología. Los frenólogos afirmaban que todas las funciones cerebrales podían ubicarse en zonas concretas del cerebro, lo cual estuvo muy en boga en su época. Actualmente, la mayoría de las afirmaciones frenológicas son consideradas como pura charlatanería pseudocientífica, pues en su afán de ubicar todo, los frenólogos ubicaron hasta los lugares cerebrales de la personalidad, de la bondad, del amor, de la metafísica, etc. Sin embargo, algunas aportaciones de la frenología se han mostrado ciertas, pues algunas funciones cerebrales son localizables, como el habla, la visión, la audición y otras, haciendo cierto el dicho de que no hay mal que por bien no venga.

Entre los charlatanes frenológicos, Paul Broca era un científico más serio pero, a pesar de su brillantez "frenológica", mantuvo algunas teorías que son, como mínimo, llamativas, como que el peso del cerebro es indicativo de la capacidad intelectual de una persona. Según él, cuanto más peso cerebral, más inteligente se es. Otro científico francés y a la par rival de Broca, Gratiolet, se puso manos a la obra pesando cerebros de catedráticos de Universidad y de obreros donados a la Universidad, observando que la afirmación no era cierta porque "no siempre los cerebros de los catedráticos son los más grandes". Broca le contestó que no todos los que llegan a catedráticos son los más inteligentes, hecho que, siendo irrefutable, lleva al absurdo la demostración de su teoría. Broca también afirmaba que el peso del cerebro masculino es mayor que el del femenino, razón de la supuesta inferioridad intelectual de la mujer, dogma de fe machista del siglo XIX. A pesar de estos graves deslices, Broca sí acertó en que el peso del cerebro va disminuyendo con el envejecimiento, sentando las bases del proceso de degeneración.

Es evidente que las descripciones frenológicas caían con facilidad en concepciones sexistas y racistas, a las que eran dados los frenólogos del siglo XIX y que fueron utilizadas por políticos y juristas sin escrúpulos. Por ejemplo, la esclavitud era consecuencia de la inferioridad de la raza negra, pues era un rasgo evidente que la forma más inclinada del hueso frontal del cráneo de la raza negra indicaba una menor masa de tejido cerebral. Algunos juristas "frenólogos" buscaron huellas neuromorfológicas en los ladrones y asesinos, como que la tendencia a robar y matar se debe a un prominente entrecejo. O la lapidaria frase: "Occipucio saliente, criminalidad innata". En el siglo XIX toda persona con prominente entrecejo o notorio occipucio era sospechosa. En España, la moda de la frenología se consideraba lo más "avanzado" para las mentes médicas de la época. Era tal que intentaban ajustar la realidad a la teoría. Recordemos el famoso caso de José Díaz de Garayo "Sacamantecas", un individuo acusado de violar, estrangular y destripar a seis mujeres entre 1870 y 1879. El Sacamantecas fue ampliamente estudiado en la cárcel por un perito llamado Dr. Esquerdo, médico madrileño que defendía la teoría frenológica y que incluso dio una conferencia en el Ateneo de Madrid con el significativo título de "Locos que no lo parecen" (afirmaba que, aunque aparentemente no lo pareciera, un experto distinguiría signos frenológicos en todo loco). Para el Doctor Esquerdo, tras sesudos estudios, el "Sacamantecas" era una especie de monstruo, con cráneo deformado. Dictaminó que "basta con ver y oír al acusado para darse cuenta de que es un anormal". Sin embargo, resulta por lo menos lla-

mativo que periodistas de la época, no adheridos a la doctrina frenológica por cierto, describen al supuesto monstruo como simpático e incluso apuesto. En la segunda mitad del siglo XIX, los psiquiatras solían analizar a un sujeto midiéndole las orejas y el cráneo en busca de rasgos criminales. Curiosamente, siempre era en personas que ya estaban en la cárcel acusadas de un crimen. Es evidente que la frenología, en su conjunto, fue una "aberración" del siglo XIX que contribuyó a consolidar ideas erróneas.

Además de su afán neurológico, Broca tuvo un gran interés por la antropología. Creó en París una Sociedad dedicada al estudio de esta ciencia, pero no sin arduos esfuerzos. En Francia, tanto el ministro de Instrucción Pública como la Policía creían que la antropología, como toda ciencia encaminada a profundizar en el conocimiento del ser humano, era subversiva para el Estado, y pusieron freno a la creación de dicha asociación. Sin embargo, tras diversas prohibiciones y gracias al apoyo de varios colegas influyentes, Broca obtuvo licencia para crearla, pero con la condición de que asistiera un delegado gubernativo para escuchar lo que se afirmara en tales reuniones y, en su caso, prohibirlas si se vertían graves amenazas contra el Estado francés. La primera reunión de la 'Société d'Anthropologie' tuvo lugar el 19 de mayo de 1859 y, tras cada autorización gubernativa, se repitieron periódicamente con la asistencia de destacados antropólogos, y el "espía" del Gobierno de París. Al cabo de varias y variadas sesiones, que trataron sobre arqueología, psicología, lingüística, fisiología, etc., como podemos deducir de las Actas que todavía se conservan, el delegado gubernativo optaba por echarse una relajada siesta debido al aburrimiento que le producían tales reuniones "subversivas". En otra reunión, el delegado del Gobierno, queriendo ahuyentar el aburrimiento, se levantó para dar un paseo, pero Broca le espetó: "Oiga, no puede dar una vuelta tan libremente. Siéntese y gane su sueldo".

Gracias a la 'Société d'Anthropologie', Broca pudo poner freno a sus desvarios frenológicos y demostrar con más precisión científica la existencia de un área del lenguaje. Un día se presentó en su consulta un paciente con parálisis del lado derecho e incapacidad de hablar. Dicho paciente murió a los pocos días y Broca tuvo la oportunidad de examinar su cerebro, observando que presentaba una lesión en el lóbulo frontal. Con rapidez frenológica dedujo: "el habla se localiza en el lóbulo frontal". Presentó sus resultados en la Sociedad, pero surgió la oposición de su eterno rival, Louis Pierre Gratiolet, que le espetó que esa conclusión era errónea: "si así fuera los monos hablarían porque tienen lóbulo frontal, como todo el mundo (incluido usted) sabe". Broca reconoció la superficialidad de su conclusión, pero con el ahínco que le caracterizaba consiguió acumular 32 casos de afasia a lo largo de los años, y pudo delimitar con mayor precisión el sitio de la lesión, localizado en una pequeña área del lóbulo frontal izquierdo, ahora llamada área de Broca. Esta teoría fue confirmada por los científicos alemanes Gustav Fritsch y Eduard Hitzig en 1870, que además localizaron la corteza motora en perros. De este modo, la supersticiosa teoría frenológica se fue desvaneciendo y la más moderna de las localizaciones cerebrales comenzaba su madurez. Actualmente, se considera que el cerebro posee funciones bien localizadas como el habla, pero otras, como la memoria y la inteligencia, se distribuyen en zonas amplias y diversas del órgano. En otros términos, hay localización de ciertas funciones pero otras están distribuidas.

Emilio José Fernández Espejo  
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Av. Sánchez Pizjuan 4,  
E-41009 Sevilla, Spain. Tel: +34 954556584; Fax: +34 954551769; E-mail: efespejo@us.es

## áreas de aplicación

- fluorescencia inducida por láser
- microscopía de alta resolución
- microscopía de luminiscencia
- microscopía de electrones
- fluorescencia espectroscópica (NIR: Infrarrojo Cercano) bioluminiscencia
- quimioluminiscencia
- procesamiento de imagen con niveles de luz bajos
- procesamiento de imagen de biomarcadores (GFP: Proteína Verde Fluorescente)
- espectroscopía en tiempo resuelto
- análisis de spray
- hidrodinámica
- electroforesis
- espectroscopía de absorción y luminiscencia
- procesamiento de tintes potencialmente sensibles (Neurociencia)
- visión nocturna
- seguridad
- astronomía
- análisis de procesos de combustión
- procesamiento geles inyección de carburantes

## especificaciones

- excelente resolución (2048 x 2048 píxeles)
- rango dinámico de 14 bits
- grabación rápida de imagen - 160MB/s
- memoria de imagen en cámara (RAM hasta 4GB)
- bajo nivel de ruido:  $12e^-$  rms a 10MHz
- refrigeración termoeléctrica de  $-50^{\circ}\text{C}$  vs. temperatura ambiente
- interfaces estándar (IEEE 1394, camera link, ethernet)

## distribuidor oficial



vision hi-tech machines

www.vhtm.com

Distribuidor oficial de sistemas  
de visión artificial en España y Portugal

+34 91 601 13 68  
+34 605 81 37 51  
FAX 91 601 13 67  
info@vhtm.com

C/ Rosa de Luxemburgo nº 9  
Local 5 posterior  
28903 Getafe (Madrid)  
España



pco.  
imaging

pco.2000





Experience + Innovation

## Revealing the Future of Electrophoresis.

*Whether you work with RNA or proteins, Bio-Rad's new automated Experion™ system will change the way you look at electrophoresis.*

The Experion automated electrophoresis system is a powerful, compact, and affordable separation and analysis system that applies microfluidic technology to reinvent the way that you perform one-dimensional electrophoresis. The Experion system transforms the way you obtain your data through:

- Automated separation, detection, and analysis
- High resolution and sensitivity comparable to mini-gel results
- Fast, 30 minute batch runs of 10–12 samples
- Single-step sizing and quantitation
- Familiar data formats — electropherograms, gel views, and tables
- Minimal sample and reagent requirements

For more information, visit us on the Web at [www.bio-rad.com/ad/experion/](http://www.bio-rad.com/ad/experion/)

