

El cerebro, la comunicación intercelular y los péptidos

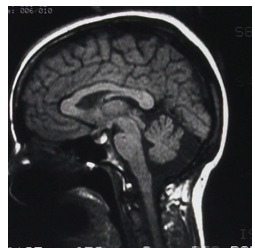
Jean-Louis Charli y Patricia Joseph-Bravo

Desde la antigüedad se ha propuesto al cerebro del ser humano como el sitio de las sensaciones y la inteligencia. Uno de los filósofos que apoyó esta idea fue Hipócrates en el siglo V a.C. Sin embargo, una tradición más antigua consideraba al corazón como el centro del intelecto. Así por ejemplo Aristóteles en el siglo IV a.C. sólo le otorgaba al cerebro la capacidad de enfriar los fluidos que bombea el corazón. El abandono de esta convicción fue paulatino, y estuvo asociado a los descubrimientos sobre la estructura y función del cerebro. Actualmente sabemos que el cerebro, integrando una variedad de señales que se originan tanto del medio interno como del externo y ayudado por el resto del organismo, nos permite responder a estímulos sensoriales (provenientes de nuestros sentidos), controlar nuestros movimientos, aprender y recordar, generar emociones, coordinar las funciones endocrinas y las autónomas, entre muchas otras capacidades.

Nuestro cerebro es parte de lo que se llama el *sistema nervioso*, uno de los sistemas encargados de coordinar las actividades de los animales. El sistema nervioso de los animales sufrió cambios dramáticos durante la evolución. A partir de sistemas nerviosos en forma de red se generaron sistemas en los cuales las células

que los constituyen se agrupan. En los vertebrados ocurre una diferenciación estructural que protege al cerebro, el cerebelo y la médula espinal (que en conjunto forman el sistema nervioso central -SNC) en una cavidad craneana unida a la columna vertebral. El SNC se comunica con los órganos periféricos a través de nervios que salen del cerebro y de la médula espinal, nervios que contribuyen al sistema nervioso periférico (SNP).

Galeno, en el siglo II, inició el estudio anatómico del sistema nervioso al reconocer al cerebro y al cerebelo y mostrar la existencia de cavidades (*ventrículos*) que atraviesan el cerebro llenas de un fluido (*líquido cerebro espinal*). Sugirió, basándose en una asociación entre forma (aspecto y dureza) y función, que el cerebro es responsable de las sensaciones y el cerebelo del movimiento; la circulación del fluido en las cavidades y los nervios permitiría registrar las sensaciones e iniciar los movimientos. Por mucho tiempo, y por la falta de técnicas de análisis de la sustancia cerebral, la atención se mantuvo centrada en esta teoría. Uno de los proponentes ulteriores fue Descartes, quien en el siglo XVII, junto con otros llegó a sugerir que el cerebro de los animales funcionaba como una máquina. Para el final del siglo XVIII se tenía



una buena descripción anatómica del sistema nervioso, pero hasta el siglo XIX se iniciaron los estudios científicos (basados en observación y experimentación) sobre su funcionamiento. Algunos de estos estudios sugerían que las grandes funciones del sistema nervioso tienen localizaciones particulares. Así, Broca correlacionaba la pérdida del habla en un paciente con una lesión, que detectaba, después de la muerte del paciente, en una región particular del lóbulo frontal izquierdo de la corteza cerebral.

Las neuronas y la neurotransmisión

En el siglo XIX se demostró que el cerebro está formado de células, tal como otros tejidos. Las propiedades especiales del sistema nervioso se deben en gran parte a las características de uno de los tipos de células especializadas que lo componen, las *neuronas*, y a su patrón de organización. Golgi y Ramón y Cajal estudiaron la estructura de las neuronas del cerebro de mamíferos y aves aprovechando en particular una técnica de tinción del SNC desarrollada por Golgi, que permite observar con el microscopio óptico en su totalidad una pequeña fracción de las neuronas teñidas al azar. Las neuronas tienen una región central o soma, de la cual se desprenden unas extensiones que se ramifican, llamadas *dendritas*, y otra extensión única, a veces muy larga, llamada *axón*, de donde pueden surgir varias ramificaciones que terminan en un ensanchamiento que se llama *terminal nerviosa*. Asociados en paralelo, los axones forman los nervios. En contraposición con Golgi, Ramón y Cajal propuso que las neuronas son elementos finitos e individualizados asociados de manera seriada a través de contactos célula-célula. Hoy en día reconocemos que nuestro cerebro está constituido por cien billones de neuronas, agrupadas en núcleos y redes que comunican entre sí distintas áreas. Ramón y Cajal demostró que las neuronas están organizadas de manera muy variable, de acuerdo a la región estudiada.

El mismo Ramón y Cajal, basándose en la estructura de las neuronas, generó una hipótesis crítica para el estudio científico de nuestro

cerebro, idea que fue confirmada más adelante: las neuronas transmiten información de manera unidireccional, del compartimiento dendrítico hacia la terminal nerviosa. Se puede, por lo tanto, predecir la dirección de la información nerviosa a través de circuitos neuronales. ¿Cuál es la naturaleza de la información que transmiten las neuronas de las dendritas a las terminales nerviosas? El descubrimiento de la contracción muscular en respuesta a una estimulación eléctrica del nervio por Galvani a finales del siglo XVIII, llevó al abandono de la teoría de los fluidos y a la idea de que el sistema nervioso funciona como una red de cables eléctricos que conducen rápidamente un estímulo entre zonas lejanas.

El análisis experimental de las propiedades de los axones tuvo que esperar hasta mediados del siglo XX, cuando Hodgkin y Huxley demostraron, en la membrana plasmática del axón gigante de calamar, la existencia de conductancias específicas para los iones Na^+ y K^+ , cuyo cambio provoca una despolarización transitoria de la membrana plasmática llamada un *potencial de acción*. Propusieron que las conductancias se deben a la existencia en la membrana plasmática de puertas controladas por el voltaje transmembranal, puertas que llamamos *canales iónicos* y que fueron identificadas veinte años más tarde. En respuesta a la suma de informaciones recabadas en el árbol dendrítico, estos canales permiten generar en la zona inicial del axón un potencial de acción que se propaga muy rápidamente (alrededor de 10 metros por segundo) a todo lo largo del axón. El patrón de disparo de los potenciales de acción, variable de célula a célula y en una misma célula, es un código que contiene información que es decodificada por las células blanco.

La prueba de la existencia de los contactos neurona-neurona propuestos por Ramón y Cajal, que Sherrington llamó *sinapsis*, tuvo que esperar hasta la invención del microscopio electrónico, a mediados del siglo XX. Sin embargo, los estudios de Loewi, Katz y Eccles en la primera parte del siglo XX demostraron que, al nivel sináptico, las neuronas se comuni-

can entre sí (o con otras células blanco, como las células musculares) mediante la liberación en el espacio intercelular (espacio sináptico) de sustancias que inciden sobre la célula contigua, causando en ésta cambios que permiten la transmisión del mensaje. Se demostró que buena parte de la comunicación intercelular en el sistema nervioso es de naturaleza química y se lleva a cabo por moléculas que se llamaron *neurotransmisores*. El primer neurotransmisor, la acetilcolina, sintetizada a partir de la colina y del grupo acetyl, se identificó a raíz de los estudios de Loewi en los 1920. Años después, se definieron como neurotransmisores a aminoácidos como el ácido glutámico y la glicina, o a derivados de aminoácidos, como la serotonina proveniente del triptófano, las catecolaminas (dopamina, noradrenalina o norepinefrina, adrenalina o epinefrina) derivadas de la tirosina, y el GABA (ácido gamma amino butírico), producto del metabolismo del ácido glutámico. Estos neurotransmisores son ahora llamados neurotransmisores “clásicos”.

En la segunda mitad del siglo XX, la utilización de técnicas de microscopía electrónica, fraccionamiento subcelular, cultivo celular y marcaje metabólico, permitió un acercamiento a la biología de las neuronas. En el soma, el núcleo, los ribosomas, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi permiten la síntesis de las proteínas, algunas de las cuales son transportadas a lo largo del axón, empaquetadas en vesículas sinápticas. Los neurotransmisores “clásicos” se sintetizan en la terminal nerviosa donde las enzimas responsables de su síntesis han viajado desde el soma. En la terminal nerviosa, los neurotransmisores son concentrados en las vesículas sinápticas por proteínas llamadas transportadores vesiculares.

¿Qué induce la liberación de estos neurotransmisores al espacio sináptico? Éste es un proceso regulado y controlado por la llegada de un potencial de acción a la terminal nerviosa, lo que facilita la entrada de calcio a la misma; esta acción causa cambios conformacionales en proteínas intracelulares que provocan el acercamiento y la fusión de las vesículas sinápticas a la mem-

brana plasmática, permitiendo la liberación de su contenido al espacio sináptico.

Cada uno de los neurotransmisores cuenta con receptores específicos localizados en la membrana plasmática de dendritas, soma o incluso, de la terminal nerviosa. Existen dos grandes tipos de receptores: los *ionotrópicos* y los *metabotrópicos*. La unión del neurotransmisor a receptores ionotrópicos (canales iónicos) provoca cambios conformacionales que se traducen muy rápidamente en un cambio de la permeabilidad del canal iónico, desencadenando alteraciones del potencial de membrana. Dependiendo del tipo de neurotransmisor y del receptor al que se acople, y del potencial de la membrana, el flujo de iones causa una despolarización (interacción del ácido glutámico con el receptor de tipo AMPA) o una hiperpolarización (interacción del GABA con su receptor de tipo A) de la membrana de la célula receptora. Estos cambios transitorios del potencial de membrana se pueden transmitir de manera pasiva a lo largo de las dendritas, sumarse y determinan si se puede iniciar un potencial de acción en el axón. Los cambios que despolarizan la membrana facilitan el disparo de potenciales de acción, por lo que se llaman *estimuladores*; al contrario, los neurotransmisores que inducen una hiperpolarización son llamados *inhibitorios*, porque dificultan el disparo de los potenciales de acción.

Cuando el neurotransmisor se une a un receptor metabotrópico, el cambio conformacional activa una proteína intracelular (proteína G) unida al receptor, desencadenando reacciones intracelulares que transducen el mensaje a través de segundos mensajeros que controlan la actividad de proteínas intracelulares y que pueden también llevar a alteraciones del potencial de membrana, si bien de manera más lenta que en el caso de los receptores ionotrópicos. Un mismo neurotransmisor puede presentar distintos tipos de receptores, tanto ionotrópicos como metabotrópicos.

El neurotransmisor liberado al espacio sináptico genera una señal transitoria. Esto debido, por un lado, a la desensibilización del receptor

por el mismo neurotransmisor mediante eventos rápidos de fosfo-defosforilación que cambian su conformación apagando su actividad y, por otro lado, a mecanismos de inactivación del neurotransmisor que, en general, se llevan a cabo por proteínas (*transportadores plasmáticos*) presentes en las membranas sinápticas que remueven al neurotransmisor del espacio sináptico. La acetilcolina es inactivada por un proceso diferente, siendo degradada por una enzima extracelular (la colinesterasa). La rápida inactivación por los transportadores o enzimas evita la desensibilización de los receptores por el exceso de ligando.

Por medio de técnicas histoquímicas se han identificado los somas donde se producen las enzimas responsables de la síntesis de los transmisores, las terminales nerviosas donde se localizan, así como las células que expresan sus receptores y transportadores. Cada neurona puede recibir muchos contactos sinápticos de distintas células provenientes de diversas regiones del sistema nervioso y a su vez incidir en muchas otras células a través de los contactos sinápticos que establecen las terminales nerviosas de cada rama del axón. En general, cada neurona sintetiza un neurotransmisor clásico y existe una asociación estable entre la localización de una neurona y el tipo de neurotransmisor que sintetiza. Las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (que sintetizan ácido glutámico y GABA) se encuentran distribuidas en todas las regiones del cerebro, constituyendo los principales estimuladores e inhibidores de la actividad neuronal. Su función es crítica para la vida. Por ejemplo, la transmisión glutamatérgica contribuye a la plasticidad detectada en varios paradigmas de aprendizaje. Las neuronas que utilizan neurotransmisores como la acetilcolina y las monoaminas se localizan de manera más discreta, pero inervan múltiples regiones, regulando numerosas neuronas postsinápticas a la vez. Por ejemplo, las neuronas dopaminérgicas, cuyos somas se localizan en la *sustancia nigra* de cada hemisferio, proyectan hacia el estriado en donde facilitan la iniciación de los movimientos voluntarios. Estas neuronas de-

generan en las personas que sufren mal de Parkinson, una enfermedad en la cual se dificulta el inicio de los movimientos voluntarios, y la terapia tradicional es la toma de un precursor de la dopamina para incrementar su síntesis en las neuronas que persisten.

Estas redes neuronales, su actividad eléctrica y sus sistemas de neurotransmisión, son el soporte físico sobre el cual se establecen funciones tan dispares como la percepción, la generación de emociones y el control motor. Uno de los retos fundamentales de la neurobiología es entender cómo las propiedades de sistemas de neuronas permiten la elaboración de funciones complejas. Técnicas modernas permiten vislumbrar que múltiples zonas cerebrales se activan en nuestro cerebro al momento de realizar una tarea específica, pero esta cartografía no explica por el momento los comportamientos. Sin embargo, se sospecha que el patrón espacio-temporal de la actividad eléctrica de grandes conjuntos de neuronas puede codificar la percepción de un estímulo. Por otro lado, las redes neuronales son plásticas; o sea, hasta en la vida adulta la existencia, estructura y las propiedades de las sinapsis (su eficacia) varían de acuerdo a la actividad previa. La plasticidad de estas redes parece implicada en los procesos de aprendizaje, un área de investigación muy intensa actualmente. Además, muchas de las actividades que efectúa el cerebro son inconscientes, pero algunas llegan al nivel consciente. Entender cómo se genera la consciencia de nuestras acciones o emociones es un reto todavía más difícil.

Uno de los aspectos de la química cerebral que pudiera correlacionarse con la complejidad de los procesos nerviosos es que la comunicación intercelular en el cerebro es mucho más rica que la adscrita a los neurotransmisores clásicos.

Los péptidos y la comunicación nerviosa

Posterior a la identificación de los neurotransmisores "clásicos" se empezaron a reconocer otras moléculas capaces de afectar la actividad

cerebral. Su naturaleza química es muy variada: algunas reconocidas antes como hormonas periféricas (esteroides), proteínas, un gran número de péptidos, derivados lipídicos como los que actúan sobre los receptores del principio activo de la marihuana (endocannabinoides), nucleótidos (ATP), y hasta gases, como el óxido nitroso (NO) y el monóxido de carbono (CO).

Los péptidos constituyen una gran familia de moléculas que participan en la comunicación celular en todos los reinos de la vida. Su biosíntesis, liberación, acción e inactivación tienen algunas diferencias clave cuando se comparan a los neurotransmisores clásicos. En las neuronas, los péptidos son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, en forma de proteínas de alto peso molecular que son procesadas en la vía de secreción regulada por la acción secuencial de varias enzimas, siendo un evento inicial la actividad de las *convertasas*, enzimas que hidrolizan la cadena peptídica de manera controlada al nivel de pares de aminoácidos básicos. Enseguida una carboxipeptidasa remueve generalmente los aminoácidos básicos del péptido en formación. Se pueden formar así varios péptidos, a partir de un solo precursor, con actividades biológicas distintas, como es el caso de la pro-opiomelanocortina que es procesada a corticotropina y lipotropina, y éstos a su vez a otros péptidos activos como la α -melanotropina y la β -endorfina. Las proteínas precursoras de los péptidos y las enzimas procesadoras son empaquetadas, a partir del trans-Golgi, en vesículas de propiedades distintas a las de las vesículas sinápticas, los *gránulos de secreción*. El procesamiento del precursor ocurre primordialmente dentro de los gránulos de secreción, que se acumulan en la terminal nerviosa. Estos gránulos se fusionan con la membrana plasmática en respuesta a la llegada de trenes de potenciales de acción o en respuesta a neurotransmisores cuyos receptores estén cercanos a la terminal nerviosa. Los péptidos liberados al espacio sináptico actúan sobre receptores, a veces localizados lejos del sitio de liberación, que son casi siempre de tipo metabotrópico. Por lo tanto, los péptidos no

afectan rápidamente al potencial de membrana (lo pueden hacer en forma más lenta), pero modulan la actividad de los neurotransmisores clásicos, por lo que se les ha clasificado en la categoría general de *neuromoduladores*. Su inactivación opera principalmente por la acción de ectopeptidasas, de manera análoga a la inactivación de la acetilcolina.

Los neuropéptidos y los neurotransmisores clásicos normalmente están co-localizados en una misma terminal nerviosa pero en entidades subcelulares distintas (gránulos en vez de vesículas). Se pueden co-secretar, si bien las propiedades de los trenes de potenciales de acción que liberan unos u otros son distintas. Así, las neuronas liberan generalmente un cóctel de neurotransmisores. Este proceso de co-secreción lleva a una modulación de la acción de los neurotransmisores clásicos por los péptidos, que pueden ampliar o modificar su acción de múltiples maneras.

El reconocimiento de los péptidos como una gran familia de moléculas mensajeras empieza en la década de los 70 del siglo XX con el descubrimiento de los péptidos hipotalámicos. El hipotálamo es una región del cerebro que integra señales de diversas fuentes hacia un final común: las neuronas hipotalámicas que regulan la función endocrina al controlar a su director, la pituitaria anterior. Dos grupos encabezados por Guillemin y Schally, trabajando por 10 años con extractos de medio millón de hipotálamos bovinos y múltiples métodos cromatográficos, dilucidaron una estructura poco convencional, el piroglu-his-pro-NH₂, un péptido con ambas terminales bloqueadas responsable de provocar la liberación de una hormona de la pituitaria anterior, la tirotropina, por lo que se denominó *hormona liberadora de tirotropina* (TRH). Siguieron otras estructuras de péptidos, incluyendo la de la hormona liberadora de gonadotropinas y la de la hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (somatostatina).

En poco tiempo fue descubierta la sustancia P y su papel en la transmisión del dolor, así como los péptidos endógenos que reconocen el receptor de la morfina, las encefalinas. La lista

de péptidos activos en el SNC se ha incrementado considerablemente (existe por lo menos una centena), ya que péptidos caracterizados en el sistema gastrointestinal, y muchos otros, se expresan también en el cerebro. Las funciones que desempeñan los péptidos están aún en vía de exploración pero son muy numerosas, y dependen estrechamente del tipo de neurona que los secretan.

Bioquímica de un fenotipo peptidérgico en el sistema nervioso central

La eficiencia de la transmisión sináptica a través de péptidos depende de su tasa de secreción, de los mecanismos de transducción al nivel del receptor y de la velocidad de eliminación del péptido. Nuestro laboratorio trabaja desde hace varios años para comprender cómo se regula la cantidad del péptido activo que llega a la célula blanco, tomando como modelo experimental uno de los primeros péptidos caracterizados, el TRH. Nuestro estudio se ha enfocado principalmente a dos niveles: la síntesis y la inactivación del péptido.

Hemos llevado a cabo la mayoría de estos estudios en el contexto del sistema neuroendocrino del roedor, por el conocimiento existente del papel fisiológico del TRH en la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-glándula tiroidea. El TRH sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo es liberado, en respuesta a un estímulo, de la eminencia media del hipotálamo a la circulación portal que irriga la pituitaria anterior; ahí incrementa la síntesis y liberación de la tirotropina a la circulación general, causando en la tiroides un incremento de las secreciones de las hormonas tiroideas, responsables de controlar el metabolismo energético en casi todas las células del organismo. La secreción de TRH es regulada por varias categorías de información, como la temperatura ambiental, que

al caer induce su secreción de manera refleja. Como en el caso de otros ejes neuroendocrinos, las concentraciones circulantes de las hormonas liberadas por el último órgano blanco se mantienen en un rango normal, ya que al aumentar las concentraciones de hormonas tiroideas, ejercen un efecto retroalimentador negativo sobre el hipotálamo, inhibiendo la síntesis y liberación de TRH, y sobre la pituitaria anterior, inhibiendo la síntesis y liberación de tirotropina así como la expresión del receptor de TRH. Además, el TRH puede secretarse en respuesta a la succión del pezón y estimular la secreción de la prolactina, una hormona de la pituitaria anterior con múltiples funciones incluyendo la producción de leche durante la lactancia.

Como para otros péptidos, el TRH proviene de la transcripción de un gen único. La traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) lleva a la generación de un precursor de alto peso molecular, cuyo procesamiento en la vía de secreción regulada permite la generación de varias copias del TRH y de péptidos intermedios, y su acumulación en gránulos de secreción en las terminales nerviosas (**figura 1**). En el laboratorio hemos identificado dos de las convertasas que están presentes en las neuronas de TRH del NPV, y que contribuyen al procesamiento del precursor.¹ En el hipotálamo, este proceso biosintético complejo se establece paulatinamente durante el desarrollo de los mamíferos, un poco después de la aparición de las neuronas que van a sintetizar el TRH. La expresión de TRH inicia en etapas tardías del desarrollo pre-natal; en el hipotálamo de rata se detecta el ARNm del precursor a partir del día embrionario 14, si bien el péptido procesado aparece días más tarde, posiblemente debido al tiempo requerido para la maduración del aparato secretor. Hemos mostrado que la expresión de TRH es baja hasta los primeros días postnatales, incrementándose luego hasta alcanzar un pico a los 20 días.²

¹ Sánchez, E. *et al.*, en *Brain Res.* 761, pp. 77-86, 1997.

² Covarrubias, L. *et al.*, en *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 151, pp. 615-622, 1988.

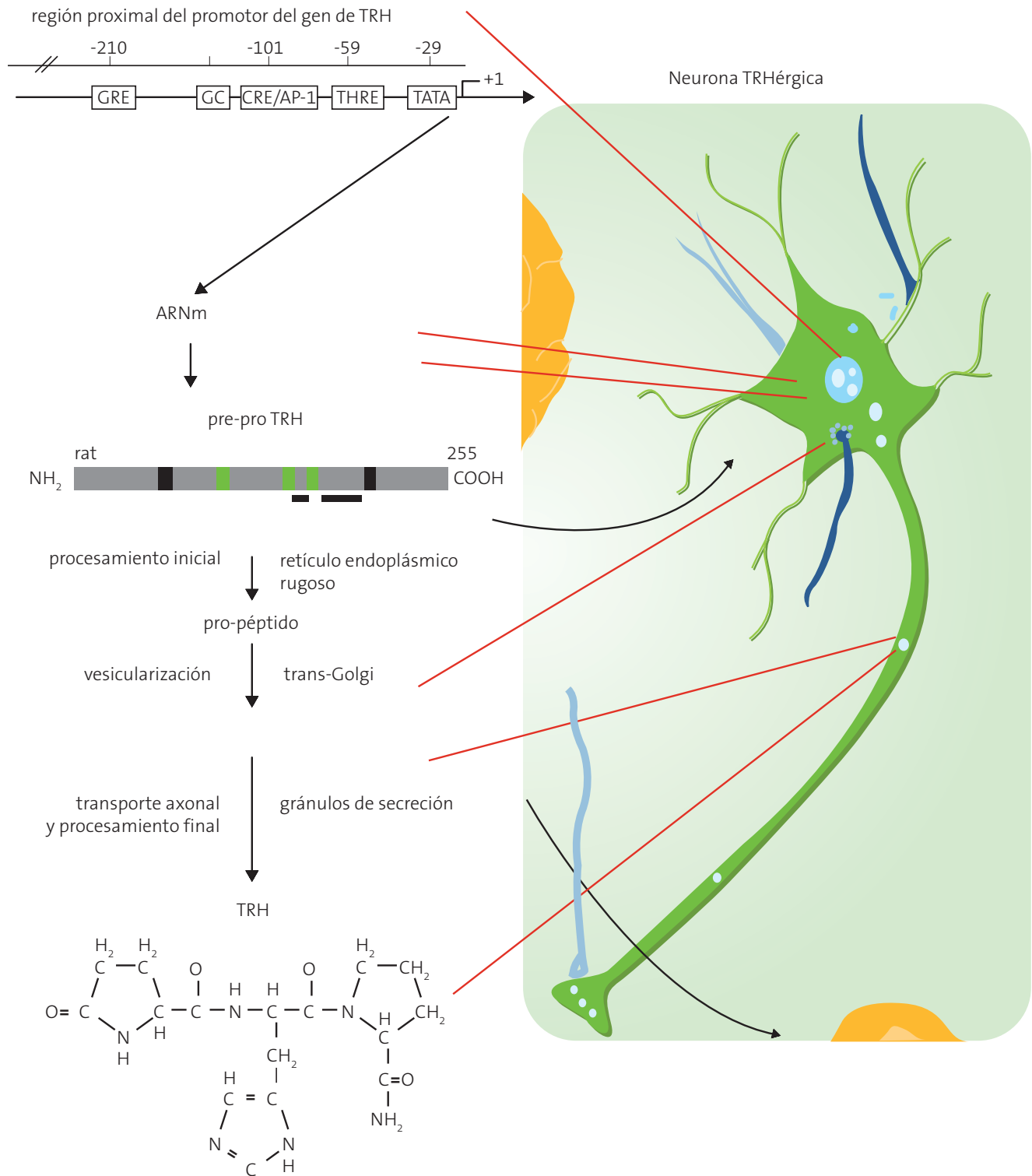


Figura 1.

Biosíntesis del TRH en el sistema nervioso central. En la parte derecha se muestra un esquema de una neurona TRHérgica del núcleo paraventricular del hipotálamo (en verde) con algunas terminales nerviosas (en azul) haciendo contacto sináptico sobre ella.

Arriba a la izquierda, parte del promotor del gen de TRH con la identificación de algunos elementos de respuesta a factores transcripcionales. Abajo a la izquierda, el procesamiento del precursor del TRH en la vía de secreción regulada.

Uno de los esfuerzos del laboratorio se ha dirigido a identificar los eventos que son responsables del proceso de inducción de la síntesis del TRH. El comportamiento observado *in vivo* se pudo reproducir en cultivos de neuronas hipotalámicas fetales, que mostraron un incremento gradual en la expresión de TRH hasta llegar a una meseta,³ validando estos cultivos como un modelo útil para el estudio del desarrollo en condiciones controladas. En la búsqueda de factores extracelulares que influyeran en la diferenciación de las neuronas TRHérgicas, hemos evidenciado, por un lado, el papel de proteínas de la matriz extracelular cuyo efecto parece focalizado a la inducción traduccional⁴ y, por el otro, la importancia de factores tróficos, que regulan los niveles del ARNm de TRH. El factor neurotrófico derivado de neuronas (BDNF) incrementa los niveles del ARNm de TRH en células hipotalámicas, únicamente en el subconjunto de neuronas TRHérgicas que expresan el receptor del BDNF.⁵ Estas son neuronas del núcleo paraventricular, por lo que sugerimos que en este núcleo el BDNF contribuye al establecimiento del fenotipo TRHérgico, incrementando la síntesis del ARNm y la acumulación de péptido.⁶

Con el objetivo de identificar otros factores implicados en el desarrollo del fenotipo TRHérgico, decidimos aislar las neuronas TRHérgicas fetales y comparar su transcriptoma (conjunto de los ARN expresados en la célula) con el de las células hipotalámicas en general. Con esta estrategia esperábamos identificar factores de transcripción sobre-expresados en neuronas TRHérgicas durante el inicio de su vida postmitótica que podrían ser reguladores de la expresión de TRH. Debido a que las neuronas que expresan al péptido representan un porcentaje mínimo de las células hipotalámicas, para en-

riquecerlas tuvimos que transfectar las células hipotalámicas embrionarias con un vector de expresión de la proteína verde fluorescente bajo el control de una parte del promotor de TRH. Esto generó, de manera específica, una señal fluorescente en las neuronas TRHérgicas, lo que nos permitió enriquecerlas con la ayuda de un separador de células activado por fluorescencia.⁷ Se purificó el ARN total a partir de las células enriquecidas y se utilizó en un micro-arreglo de ADN para identificar los ARN cuya expresión era mayor en esta población que en la de las células no fluorescentes. Así identificamos varios factores de transcripción cuya expresión es elevada en neuronas TRHérgicas fetales; uno de ellos es el factor 4 similar a Krüppel (KLF4), un factor cuya expresión no había sido descrita en el SNC. Hemos podido demostrar que KLF4 se expresa durante el desarrollo hipotalámico, que se une *in vitro* a secuencias del promotor de TRH y que su sobre-expresión en neuronas hipotalámicas fetales incrementa la transcripción del TRH.⁸ Estos datos identifican uno de los factores de transcripción involucrados en la inducción de la expresión de TRH; el KLF4 sería uno de los primeros factores transcripcionales identificados con un efecto específico sobre la inducción de un fenotipo peptidérgico. Actualmente estamos analizando su papel *in vivo*, así como el de otros factores identificados durante el análisis del transcriptoma.

En una sección anterior se mencionó que un evento importante en la transmisión sináptica es la inactivación de los neurotransmisores liberados al medio extracelular. Al final de los años 70 del siglo XX se inició la búsqueda de los mecanismos responsables de la inactivación de los péptidos. Muchas evidencias mostraron que el mecanismo principal de inactivación de neurotransmisores clásicos, la captura por

³ Pérez-Martínez, L., J. L. Charli y P. Joseph-Bravo, en *Dev. Brain Res.* 130, pp. 73-81, 2001.

⁴ Niquet, J. *et al.*, en *Dev. Brain Res.* 120, pp. 49-56, 2000.

⁵ Guerra-Crespo, M. *et al.*, en *Eur. J. Neurosci.* 14, pp. 483-494, 2001.

⁶ Ubieta R. *et al.*, en *Brain Res.*, 11-74, pp. 28-38, 2007.

⁷ Guerra-Crespo, M., J. L. Charli y L. Pérez-Martínez, en *Ciencia* 56, pp. 67-76, oct-dic 2005.

⁸ Pérez-Monter, C. *et al.*, en *Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 2006.

transportadores plasmáticos, no operaba en el caso de los péptidos. Para el TRH, mostramos que si bien se observa una internalización del péptido del medio extracelular al citosol en rebanadas de cerebro, la muy baja velocidad del fenómeno sugiere que no es un mecanismo eficaz de remoción.⁹

Identificamos en membranas de cerebro una actividad que degrada al TRH; esta actividad se encuentra concentrada en sinaptosomas (estructura formada por la terminal nerviosa que se sella posterior a la homogenización del tejido nervioso en soluciones iso-osmóticas, a la que queda pegada parte de la membrana post-sináptica).¹⁰ Posteriormente caracterizamos a la actividad como una metalo-enzima, con actividad de piroglutamil peptidasa, o sea que hidroliza el enlace peptídico piroglu-his del TRH.^{11, 12} Fue nombrada piroglutamil peptidasa II (PPII) para distinguirla de la piroglutamil peptidasa I, cuyas propiedades son muy distintas y que no degrada al TRH *in vivo*.¹³ Mostramos que la actividad de la PPII está principalmente localizada en el SNC y en menor grado en la pituitaria anterior. La distribución de la actividad de la PPII en SNC es heterogénea;¹⁴ la de su ARNm coincide generalmente con la de los ARNm de los dos receptores identificados para TRH. En el cerebro se encuentra únicamente en neuronas, posiblemente en el compartimiento post-sináptico.^{15, 16}

La PPII es una ectoenzima, es decir que su sitio activo está presente en la interfase membrana plasmática-medio extracelular,¹⁷ por lo que tiene una topología ideal para hidrolizar al TRH una vez liberado. La región extracelular

de la PPII tiene varios dominios, incluyendo un dominio catalítico y un dominio C-terminal. Hemos mostrado que en el cerebro el empalme alternativo del ARNm de la PPII genera un ARN que tiene el potencial de traducir una forma truncada, carente del dominio C-terminal. Esta PPII truncada no tiene actividad enzimática, pero funciona como dominante negativa.¹⁸ Estamos analizando las consecuencias fisiológicas de su expresión en el SNC, debido a que pudiera ser un nuevo mecanismo de regulación de la actividad de ectoenzimas.

A diferencia de otras peptidasas, la PPII es muy específica porque degrada sólo al TRH o péptidos muy similares, cuya existencia en el cerebro es aún controversial. Mediante comparaciones estructurales con enzimas de la familia de peptidasas a la que pertenece la PPII (las aminopeptidasas de la familia M1) y mutagénesis dirigida, hemos identificado algunos de los posibles lugares de reconocimiento del sustrato en el sitio activo; estos datos explican en parte lo que hace a la PPII una enzima tan específica.¹⁹ Actualmente intentamos obtener más información sobre los determinantes estructurales de su actividad.

Todos estos datos sugieren que el mecanismo responsable de la inactivación del TRH liberado al medio extracelular en el SNC ó en la pituitaria es la actividad de la PPII (**figura 2**).²⁰ Ahora bien, ¿existen ajustes de la actividad de la PPII que pueden afectar la transmisión TRH-érgica? Utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, hemos demostrado que el metabolismo del TRH es regulable a distintos niveles. Estímulos para la secreción del péptido también lo son para

⁹ Charli, J. L. *et al.*, en *J. Neurochem.* 42, pp. 981-986, 1984.

¹⁰ Joseph-Bravo, P. *et al.*, en *Brain Res.* 166, pp. 321-329, 1979.

¹¹ Garat, B. *et al.*, en *Neuropeptides* 6, pp. 27-40, 1985.

¹² Torres, H. *et al.*, en *Neurochem. Intern.* 9, pp. 103-110, 1986.

¹³ Charli, J. L. *et al.*, en *Neuropeptides* 9, pp. 373-378, 1987.

¹⁴ Vargas, M. *et al.*, en *Neurosci. Lett.* 79, pp. 311-314, 1987.

¹⁵ Cruz, C. *et al.*, en *J. Neurochem.* 56, pp. 1594-1601, 1991.

¹⁶ Joseph-Bravo, P. *et al.*, en *Neurosci. Lett.* 178, pp. 243-246, 1994.

¹⁷ Charli, J. L. *et al.*, en *Neurochem. Intern.* 13, pp. 237-242, 1988.

¹⁸ Chávez-Gutiérrez, L. *et al.*, en *J. Neurochem.* 92, pp. 807-817, 2005.

¹⁹ Chávez-Gutiérrez, L. *et al.*, en *J. Biol. Chem.* 281, pp. 18581-18590, 2006.

²⁰ Charli, J. L. *et al.*, en *Neurobiology* 6, pp. 45-57, 1998.

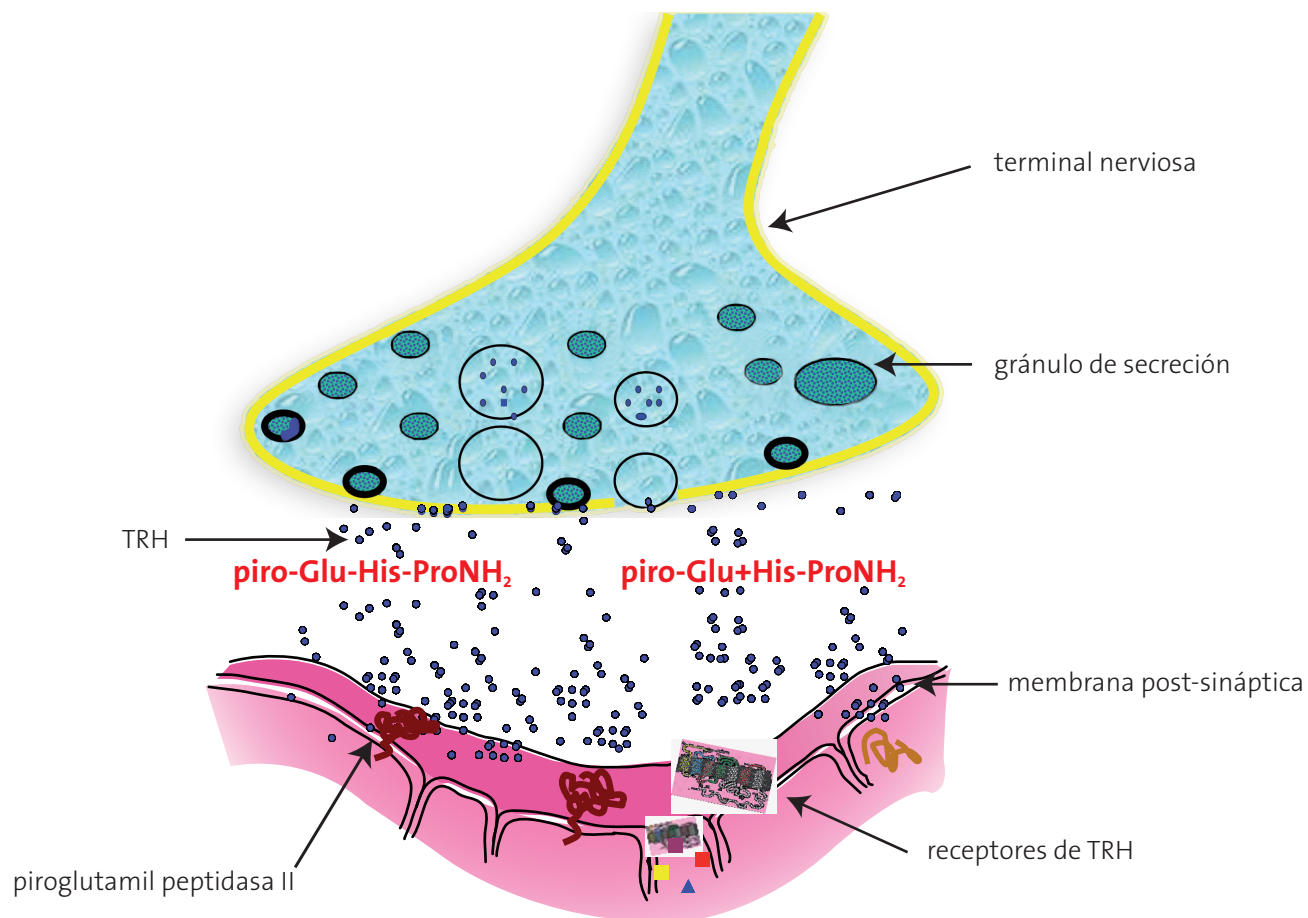


Figura 2.

Esquema de una sinapsis TRHérgica con la terminal nerviosa repleta de gránulos de secreción que contienen el péptido (en azul), la membrana post-sináptica (en rosa) y el espacio sináptico donde el TRH difunde una vez liberado, interacciona con sus receptores y es inactivado por la piroglutamil peptidasa II.

su biosíntesis. La degradación del TRH está a su vez sujeta a un estricto control, en particular en la pituitaria anterior. Demostramos que en esta glándula las hormonas tiroideas incrementan la actividad de la PPII,²¹ además de que el TRH y otros efectores importantes en la regulación endocrina regulan la expresión y actividad de la PPII en la pituitaria anterior, debido a la activación de los receptores de membrana de estos factores y de vías de transducción específicas.^{22, 23, 24, 25}

Aparte de su papel neuroendocrino, al TRH se le han descubierto múltiples efectos en el SNC, donde parece tener un papel de regulador homeostático. Debido a que la mayor actividad de la PPII se localiza en el SNC, nos preguntamos si es también regulable en el cerebro, en particular en condiciones en las que son activadas las neuronas TRHérgicas. Recurrimos a un modelo de epilepsia experimental que consiste en la diaria estimulación eléctrica sub-umbral de la amígdala, lo que produce un aumento progresivo en la excitabilidad neuronal que, a su vez, provoca cambios químicos y morfológicos en zonas epileptogénicas (amígdala, hipocampo y corteza), incluyendo un aumento en la síntesis y liberación de TRH. Encontramos que, concomitante con la activación de las neuronas TRHérgicas, la expresión y actividad de la PPII es modulada en forma similar a la de los receptores de TRH y sólo en las regiones epileptogénicas.^{26, 27} Para estudiar la especificidad del fenómeno utilizamos un paradigma de inhibición neuronal que se logra produciendo narcosis con alcohol. Observamos que durante la

inducción de la narcosis, la expresión del TRH y de la PPII son moduladas en las regiones blanco de la droga: corteza, hipocampo y núcleo accumbens.²⁸ Por lo tanto, el patrón de regulación de la PPII en el cerebro tiene una distribución que depende del paradigma experimental, lo que sugiere que la actividad enzimática está controlada por vías neuronales específicas.

Estos hallazgos demuestran que la PPII es regulable en condiciones que modulan la actividad de las neuronas TRHérgicas, probablemente en las células blanco del TRH, tal como ocurre en el caso de los receptores a TRH. Estamos buscando las evidencias experimentales que comprueban que estos ajustes son críticos para la transmisión peptidérgica. Para esto necesitamos herramientas que nos permitan manipular específicamente a la PPII. Hemos identificado inhibidores de la actividad enzimática; en particular uno muy específico aislado a partir de un gusano muy abundante en las costas de Cuba.²⁹ Con estas herramientas hemos mostrado que en la pituitaria anterior la disminución parcial de la actividad de la PPII es suficiente para alterar los niveles de prolactina secretada en respuesta al TRH³⁰ y que, en rebanadas de cerebro, la inhibición de su actividad incrementa la recuperación de TRH *in vitro*.³¹ Actualmente estudiamos, en el circuito hipocampal *in vitro*, cómo la PPII modula el efecto del TRH sobre la transmisión GABAérgica. Esta línea de investigación debería permitir determinar el significado de los ajustes de los mecanismos de inactivación de péptidos en la fisiología nerviosa, un tema que no ha sido

²¹ Ponce, G. *et al.*, en *Neuroendocrinology* 48, pp. 211-213, 1988.

²² Vargas, M. A., P. Joseph-Bravo y J.L. Charli, en *Neuroendocrinology* 60, pp. 323-330, 1994.

²³ Vargas, M. A. *et al.*, en *J. Neuroendoc.* 10, pp. 199-206, 1998.

²⁴ Bourdais, J. *et al.*, en *Neuropeptides* 34, pp. 83-88, 2000.

²⁵ Vargas M. A. *et al.*, en *J. Neuroendocrinol.* 14, pp. 184-193, 2002.

²⁶ De Gortari, P. *et al.*, en *Brain Res.* 679, pp. 144-150, 1995.

²⁷ De Gortari, P. *et al.*, en *Neurochem. Intern.* 38, pp. 31-42, 2006.

²⁸ De Gortari, P. *et al.*, en *Neurochem. Intern.* 46, pp. 347-356, 2005.

²⁹ Pascual, I. *et al.*, en *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, pp. 138-152, 2004.

³⁰ Charli, J. L. *et al.*, en *Molecular Endocrinology*, P. Joseph-Bravo (ed.), 2006.

³¹ Charli, J. L. *et al.*, en *Neuropeptides* 14, pp. 191-196, 1989.

estudiado. Nuestra hipótesis es que el ajuste de los procesos de inactivación es uno de los mecanismos plásticos que en el cerebro contribuyen a la modulación de las propiedades sinápticas.

El conocimiento del mecanismo de inactivación de los péptidos no sólo es de interés en ciencia básica, sino que permite eventualmente el desarrollo de fármacos capaces de inhibirlo. Tomar como blanco farmacológico a los mecanismos de inactivación de neurotransmisores tiene ventajas cuando se compara con el uso de agentes que activan los receptores, porque en teoría se afecta a la transmisión de manera proporcional a la actividad natural de cada vía. Los inhibidores de los mecanismos de inactivación de neurotransmisores se utilizan actualmente para el tratamiento de varias enfermedades del SNC. El *prozac*, por ejemplo, utilizado para tratar la depresión, es una droga que inhibe específicamente al transportador plasmático de serotonina, permitiéndole permanecer activo más tiempo en el espacio sináptico. También se usan inhibidores de peptidasas para el tratamiento de la hipertensión arterial, y es probable que algún día también se utilicen para tratar desórdenes del SNC. ●

Agradecimientos

La obtención de resultados novedosos, y las hipótesis que de ellos se generan, han sido posibles gracias a la entusiasta participación de investigadores, técnicos y estudiantes asociados al grupo, así como de investigadores de otros grupos del IBT. El laboratorio no podría funcionar sin el apoyo cotidiano de Manuel Villa, Elena Martel y Miguel Ángel Olvera, así como el de las unidades de bioterio, biblioteca y cómputo, y por supuesto la administración del IBT. La investigación del grupo ha sido apoyada en parte por fondos del Conacyt y de la DGAPA-UNAM.

Bibliografía

Neuroscience: exploring the brain, M.F. Bear, B.W. Connors y M.A. Paradiso (eds.), 2a. edición, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Rose, S., *The future of the brain. The promise and perils of tomorrow's neuroscience*, Oxford University Press, 2005.