



**FOSFODIESTERASAS DEL AMP_c Y DEL GMP_c EN EL
CEREBRO: EXPRESIÓN EN PROCESOS
NEUROINFLAMATORIOS Y NEURODEGENERATIVOS**

Elisabet Reyes Irisarri
Barcelona 2007

Introducción

Todos los seres vivos deben responder y adaptarse a estímulos externos de manera organizada para sobrevivir en el medio. La naturaleza ha desarrollado una amplia maquinaria molecular en todas las células para interpretar y procesar correctamente estos estímulos. Esta maquinaria, o sistema de señalización, controla y coordina todos los aspectos de la función celular. Las cascadas catalíticas de transducción de la señal y sus mediadores intracelulares proporcionan múltiples puntos de amplificación y regulación de las respuestas a estas señales extracelulares y constituyen una forma de percibir y responder al medio.

El concepto de “segundos mensajeros” (pequeña molécula intracelular, producida por una estimulación celular, capaz de regular procesos celulares posteriores) fue creado con el descubrimiento del ATP. De manera estricta, este término sólo es aplicable a algunas moléculas como son el cAMP, cGMP, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) y el calcio. Estas moléculas ubicuas son capaces de controlar miles de procesos celulares mediante un mecanismo de acción muy simple: un estímulo induce un incremento en los niveles de segundo mensajero y éste se une a moléculas efectoras que modifican su actividad dando lugar a una respuesta específica. Esta aparente simplicidad, esconde mecanismos complejos que finalmente permiten que estas pequeñas moléculas controlen muchas funciones diferentes. La acción de estos segundos mensajeros se basa en cinéticas de aumento y disminución, amplitud de la señal y patrones espaciotemporales de expresión.

Un ejemplo de esta compleja integración y regulación de señales lo encontramos en el desarrollo de la respuesta inmune de los vertebrados para hacer frente a microorganismos patógenos invasores. En esta respuesta participan una gran variedad de células y moléculas que facilitan el reconocimiento específico del invasor y, utilizando los sistemas señalizadores intracelulares, eliminan o neutralizan el patógeno.

1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La transducción de la señal es un proceso fundamental y básico para los organismos vivos. Este proceso incluye el reconocimiento de señales procedentes tanto del medio exterior como del interior por parte de la célula además de su transformación a respuestas biológicas. El sistema nervioso central es el centro clave conector donde se reciben millones de señales, o estímulos, que se traducen y se transforman cuidadosamente en reacciones que controlan una gran variedad de procesos en el organismo.

En el modelo clásico de transducción de señales en el cerebro, las neuronas, en respuesta a estas señales, liberan una serie de moléculas en el espacio sináptico (los neurotransmisores), que son reconocidas por proteínas de membrana (los receptores) localizadas en la membrana pre- o post-sináptica. El complejo formado por la interacción neurotransmisor-receptor desencadena una serie de reacciones físico-químicas en cascada (cascadas de segundos mensajeros) que acaban traducándose en la respuesta del organismo al estímulo inicial.

En una misma célula encontramos diferentes cascadas de señalización que pueden interactuar de diferentes maneras (Jordan and Iyengar, 1998): (1) dos ligandos diferentes que actúan por su propia vía y coinciden en uno de los pasos, actuando sinérgicamente, es decir que la respuesta final es mayor que la que se daría al actuar los ligandos por separado, este es el caso de la LTD (*long term depression*) que se da en células de Purkinje; (2) dos ligandos diferentes siguen rutas de señalización diferentes, pero uno de los pasos de una de las vías activadas regula alguno de los puntos de la segunda cascada, como ocurre en la activación de la vía Ras/Raf/ERK1-2 cuando actúan factores de crecimiento y mitógenos, en la que la vía AMPc/PKA es capaz de inhibir la primera ruta por fosforilación de Raf; y (3) retroalimentación: como se observa en la regulación de la adaptación a la luz en la retina, en la que el estímulo externo (la luz) activa su receptor (la rhodopsina) y desfosforila la *phosducin* que en este estado es capaz de unir el complejo $\beta\gamma$ de la transducina (G_t) e inhibir la vía de señalización de la rhodopsina, siendo necesaria más luz para activar esta ruta de nuevo. Éste es un sistema que le permite a la retina adaptarse a condiciones de mucha luz.

2. AMPc

La adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPc) es un segundo mensajero intracelular ubicuo en células animales. El concepto de segundo mensajero empezó a manejarse en 1957, cuando el grupo de Earl W. Sutherland descubrió que la acción sobre el metabolismo hepático de la adrenalina y el glucagón estaba mediada por el AMPc (Sutherland and Rall, 1958). Estudios previos de su grupo en secciones histológicas de hígado y posteriormente en homogenados libres de células permitieron conocer el mecanismo de activación de una fosforilasa hepática mediante su fosforilación tras la administración de adrenalina o glucagón (RALL et al., 1956; BERTHET et al., 1957). Gracias al uso de estos homogenados se descubrió que la respuesta a hormonas en

el hígado estaba dividida en dos fases: (1) la formación de un factor activador termoestable en la fracción particulada (que contenía la membrana), y (2) la formación de la fosforilasa hepática en la fracción sobrenadante o citosólica, en la que las hormonas por sí solas no tenían ningún efecto. Este factor activador era un nuevo ribonucleótido de adenina, el AMPc (Sutherland and Rall, 1958). El descubrimiento del AMPc y el concepto de segundos mensajeros no se aceptó abiertamente hasta que Lipkin y colaboradores determinaron su síntesis y estructura (Beavo and Brunton, 2002). Una década más tarde el grupo de Edwin G Krebs clarificó la transmisión de la información en el interior de las células al descubrir que la adrenalina, a través del AMPc, era capaz de estimular una cascada de cinasas, siendo la primera una fosforilasa-cinasa cinasa (Walsh et al., 1968). A partir de los años 70 se dio un gran empuje al estudio de la transducción de señales por nucleótidos cíclicos gracias a la puesta a punto de ensayos de unión de alta afinidad (*radioimmunoassays and protein-binding assay*) para la determinación de su concentración.

El AMPc está involucrado en el mecanismo de acción y en procesos de transducción de la señal de múltiples moléculas como son hormonas, neurotransmisores, citocinas y factores de crecimiento. Como consecuencia de la gran variedad de moléculas que median su acción vía AMPc, éste se encuentra implicado en procesos tan diversos como la contracción muscular, la exocitosis, procesos metabólicos, neurotransmisión, crecimiento, agregación plaquetaria, diferenciación celular, transformación de fibroblastos, síntesis de esteroides en el ovario, movilización de la glucosa en el hígado o desarrollo embrionario (Iyengar, 1996; Houslay, 1998).

En el sistema nervioso central el AMPc participa en procesos de transcripción génica (Lalli and Sassone-Corsi, 1994), activación de canales iónicos, supervivencia de neuronas dopaminérgicas (Yamashita et al., 1997), potenciación y facilitación sináptica (Zhong and Wu, 1991), liberación de neurotransmisores (Kandel and Schwartz, 1982; Chen and Regehr, 1997; Bouron and Reuter, 1999), en la regulación de la respuesta a neurotransmisores (Morimoto and Koshland, 1991), y en procesos de aprendizaje y memoria (Frey et al., 1993; Tully et al., 2003; Silva, 2003) entre otros.

La concentración intracelular del AMPc, que en condiciones basales es $\leq 1\mu\text{M}$, es un factor importante en su mecanismo de señalización, y puede variar rápidamente, aumentando o disminuyendo en respuesta al estímulo extracelular. Por este motivo es necesaria una rápida velocidad de síntesis, en equilibrio con una rápida velocidad de degradación. Los dos factores claves en la regulación de estos niveles son: la modulación de la actividad adenilato ciclasa (AC), responsable de la síntesis de AMPc a partir de trifosfato de adenosina (ATP), y la actividad fosfodiesterasa (PDE) que degrada el AMPc a 5'-AMPc.

2.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL AMPc

En el primer paso de la transducción de señales vía AMPc encontramos tres componentes de membrana esenciales ("*ternary complex model*"): un receptor, una proteína G heterotrimérica y una adenilato ciclasa (ver Figura 1.1).

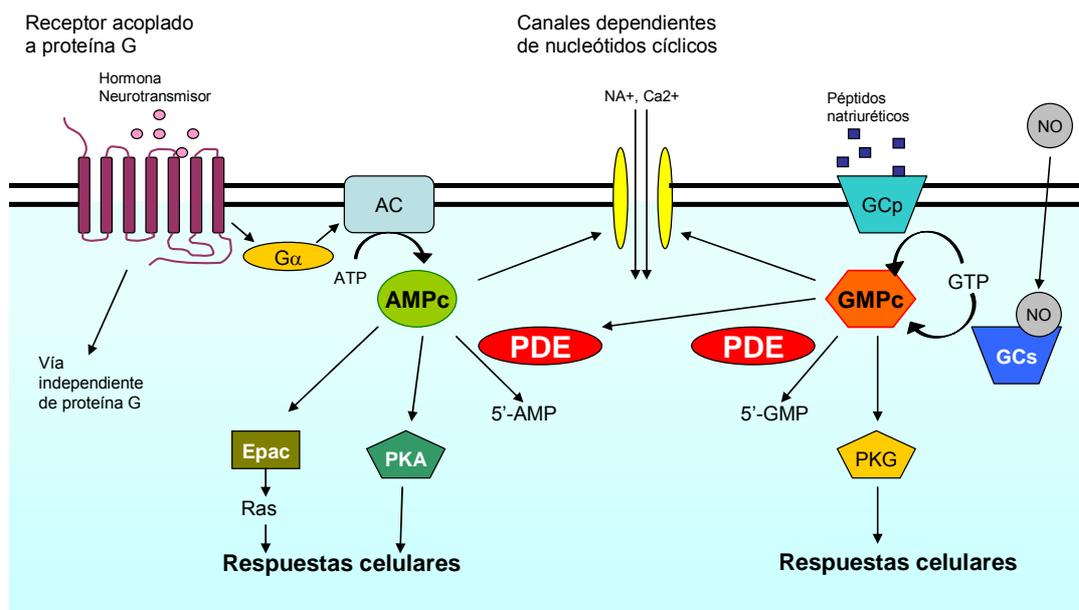


Figura 1.1. Vía de señalización del AMPc y del GMPc (modificado de Beavo y Brunton 2002)

2.1.1. Receptores de membrana acoplados a proteína G

Este tipo de receptor de membrana, al estar acoplado a proteína G, se conoce como “receptor acoplado a proteínas G” (en inglés *G-protein-coupled receptor*, GPCR). La cadena polipeptídica que lo forma contiene siete dominios transmembranales de unos 25 aminoácidos cada uno. El extremo amino está situado en el exterior de la célula y el carboxilo se localiza en el interior de ésta. Los dominios transmembranales están unidos por tres lazos extracelulares y tres intracelulares. De éstos, el lazo intracitoplasmático, que une los segmentos transmembranales quinto y sexto, es la región del receptor que interacciona con las proteínas G. Esta familia de receptores representa el mayor y más versátil grupo de receptores de la superficie celular (Pierce et al., 2002). Estos receptores, de los que se conocen más de 1000 en mamíferos, tienen una diversidad química de ligandos excepcional (Gether, 2000), como pueden ser iones, odorantes orgánicos, aminas, péptidos, proteínas, lípidos, nucleótidos e incluso fotones (Fredriksson et al., 2003).

En algunos casos se ha visto que un receptor específico puede interactuar preferentemente con una combinación de $G\beta\gamma$ específica (Gudermann et al., 1996). Previamente se había observado que varias combinaciones de subunidades $\beta\gamma$ parecían ser capaces de inhibir la adenilato ciclasa 1 (AC1) o estimular la AC2 (Ueda et al., 1994). Así pues podemos hablar de la posible especificidad de receptores, o de ligandos de receptores, por ACs concretas, como ocurre en cultivos de miocitos cardíacos en los que es necesaria la expresión de AC5 para que se produzca AMPc estimulado por el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) (Chen et al., 1995) cosa que sugiere el acoplamiento del receptor de EGF a la AC5.

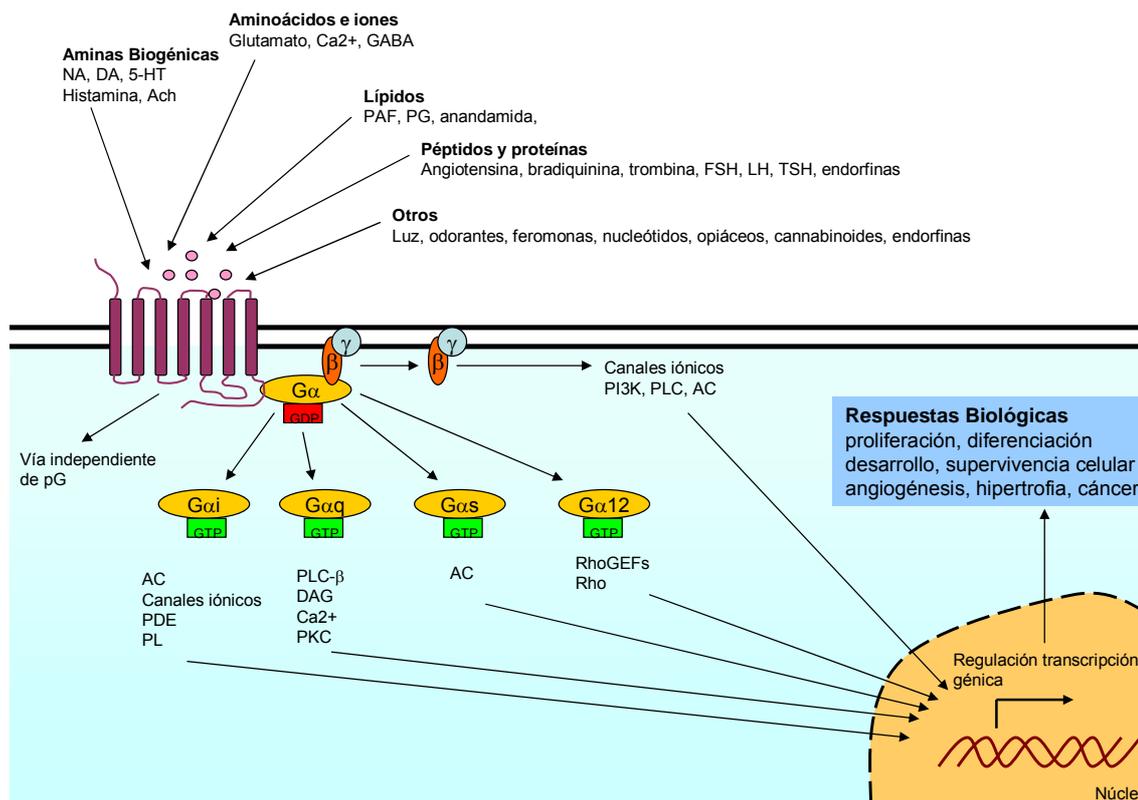


Figura 1.2. Diferentes vías activadas por receptores acoplados a proteína G (modificado de Marinissen y Gutkind 2001).

La familia de receptores de la serotonina (5-HT), tiene subtipos acoplados a diferentes proteínas G (inhibidoras $G_{i/o}$ (5HT1); a $G_{q/11}$ (5HT2); a estimuladoras G_s (5HT4, 6 y 7)) y receptores que integran en su estructura un canal (5HT3). Por ejemplo, el receptor 5HT_{1A}, que está acoplado a proteína $G_{i/o}$, actúa normalmente inhibiendo la AC, y por lo tanto disminuyendo los niveles de AMPc, pero en células que expresan AC2 se ha observado un estimulación de ésta a través de las subunidades $\beta\gamma$ asociadas a $G_{i\alpha 2}$ (Albert et al., 1999). Este receptor también es capaz de estimular otras vías de señalización activando fosfolipasa C (PLC), sintasa del óxido nítrico (NOS), canales de K⁺, etc. También encontramos otros subtipos, como 5HT₄, 5HT₆ y 5HT₇ que estando acoplados a proteína G estimuladoras G_s activan AC, estimulando así vías de señalización del AMPc. Estos receptores también activan la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y regulan varios canales.

2.1.2. Proteína G

El segundo componente del modelo clásico de transducción, la proteína G heterotrimérica, se encarga de transmitir el estímulo desde los receptores GPCR a las adenilato ciclasas (Figura 1.2.). Estas proteínas están formadas por una subunidad α , responsable de la especificidad de la proteína G y de la fijación e hidrólisis del GTP, y dos subunidades más pequeñas β y γ . Se han encontrado 16 genes que codifican para la subunidad α , 5 para la β , y 12 para la γ (Hildebrandt, 1997; Pierce et al., 2002).

Las diferentes subunidades α están agrupadas en 4 familias multigénicas en base a la similitud de su secuencia: α_s , α_i , α_q y α_{12} (Wilkie et al., 1992). De éstas, α_s es la subunidad activadora de las adenilato ciclasas y la α_i la inhibidora. Pero no sólo la subunidad α es la funcional del heterotrímero. Se ha observado que las subunidades $\beta\gamma$, además de cumplir un papel regulador en el ciclo de activación/desactivación de la proteína G, desempeñan también una acción directa sobre algunos sistemas efectores como la adenilato ciclasa, inhibiendo (a la AC-1) o activando (a AC-2 y AC-4) (Marinissen and Gutkind, 2001); la activación de la fosfolipasa A_2 (Logothetis et al., 1987); o la activación de la vía de la MAPK independiente de PKC y dependiente de Ras (Crespo et al., 1994). Estos sistemas efectores, activados o inhibidos por proteínas G, pueden ser canales iónicos de K^+ o de Ca^{+} , o bien algunos enzimas como adenilato ciclasa, fosfolipasa C de fosfoinosítidos, las fosfolipasa A_2 y D, entre otros.

Tabla 1.1. Ejemplo de sistemas efectores activados por pG.

Subunidad proteína G	Sistema Efector	Referencias
$G\alpha_s$	↑ Adenilato ciclasa	(Hanoune et al. 1997) (Gilman 1984)
$G\alpha_t$ (transducina)	↑ Fosfodiesterasa GMPC, retina (PDE6)	(Artemyev et al. 1998)
$G\alpha_i$	↓ Adenilato ciclasa ↑ c-Src tirosina quinasa	(Ma et al. 2000) (Katada et al. 1984) (Bokoch et al. 1984)
$G\alpha_q$	↑ Fosfolipasa C	(Smrcka et al. 1991)
$G\alpha\beta$	↑ Adenilato ciclasa (AC2, AC4) ↑ Fosfolipasa C (PLC β_1 , β_2 , β_3) IP-3 γ (fosfatidilinositol 3-quinasa)	(Boyer et al. 1992) (Camps et al. 1992) (Tang y Gilman 1991) (Stephens et al. 1994) (Logothetis et al. 1987)

2.1.3. Adenilato ciclasa

La adenilato ciclasa (AC) es el enzima responsable de la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) a cAMP y pirofosfato (Figura 1.1). Se han clonado, secuenciado y caracterizado en mamíferos al menos nueve isoenzimas (AC1-AC9), que presentan variantes de *splicing* con características de glicosilación y regulación diferentes entre ellas (Cali et al., 1996). Su peso molecular aproximado es de 120KD, a excepción de una de tamaño inferior (50KD) que sólo se expresa en espermatozoides. La estructura general de las ACs (Tabla1.2) se caracteriza por la presencia de una corta región amino intracelular, de tamaño variable según la isoforma (Hanoune et al., 1997), seguida de seis dominios transmembranales (M1); un dominio citoplasmático de 360-390 aminoácidos (C1a y C1b); un segundo grupo de seis dominios transmembranales (M2); y a continuación otro dominio citoplasmático de 255-330 aminoácidos (C2a y C2b) (Figura 1.3.). Los dominios citoplasmáticos C1a y C2a conforman el dominio catalítico del enzima y están sometidos a regulaciones intracelulares específicas para cada subtipo (Defer et al., 2000)

Las ACs están ancladas en la membrana citoplasmática, a excepción de la “pequeña” isoforma existente en espermatozoides, que es soluble en espermatozoides inmaduros y pasa a anclarse a la membrana citoplasmática durante la maduración de éstos

(Braun and Dods, 1975). La amplia diversidad de isoformas permite localizar la expresión de la adenilato ciclasa en diferentes dominios de la membrana, cosa que permite tener diferentes respuestas compartimentales dentro de una misma célula; así como el control diferencial sobre la síntesis de AMPc a través de la modulación específica por parte de otros procesos de transducción de señales (Sunahara et al., 1996).

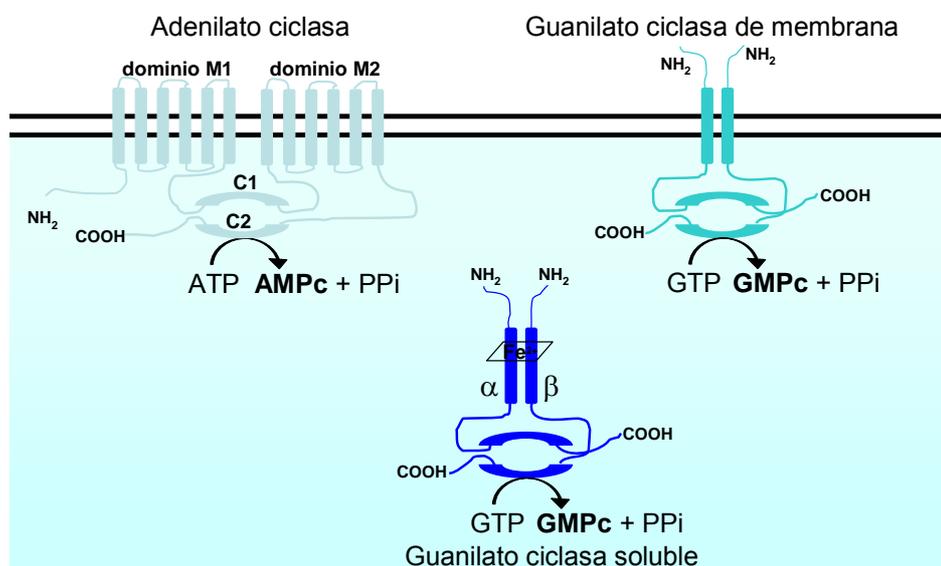


Figura 1.3. Estructura de la adenilato ciclasa y las guanilato ciclasas soluble y particulada.

La estimulación de estos enzimas por hormonas y neurotransmisores está mediada por $G_{s\alpha}$, es decir, por la unión de GTP a la subunidad α de la proteína G estimuladora (G_s), que a su vez estimula las adenilato ciclasas, con la excepción de la isoforma 9 (AC9) que es estimulada por la unión de la molécula hipotensora forskolina (Hanoune et al., 1997).

Existen diferentes mecanismos de regulación de estos enzimas: fosforilación por parte de las proteínas cinasa A (PKA) o C (PKC), cambios en niveles intracelulares de Ca^{2+} (Ca^{2+} /calmodulina); mediante la subunidad α de la proteína G inhibitoria ($G_{i\alpha}$) o bien por las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G ($G_{\beta\gamma}$) (Hanoune and Defer, 2001). En función del mecanismo de regulación se han clasificado en cuatro grupos (Tabla 1.2.).

Tabla 1.2. Propiedades reguladoras de las AC de mamífero. (Modificada de Hannoune y Defer 2001).

Grupo	Adenilato ciclasa	Regulación
1	AC1 AC3 AC8	Estimulación por Ca^{2+} / Calmodulina
2	AC2 AC4 AC7	Estimulación por subunidades $\beta\gamma$ Estimulación por fosforilación por PKC
3	AC5 AC6	Inhibición a baja [Ca^{2+}] (<1 μ M) Inhibición por $\beta 1\gamma 2$
4	AC9	Inhibición por calcineurin Inesible a las subunidades $\beta\gamma$

Diferentes tipos de ACs, tienen diferente capacidad para responder a diferentes estímulos, siendo un punto central en la comunicación entre diferentes sistemas de señalización (Marjamaki et al., 1997). Así pues, los receptores acoplados a las proteínas G_i o G_o , son capaces de enviar respuestas negativas o positivas a las ACs. Este es el caso del receptor adrenérgico α ($\alpha_{2A/D}$ -AR). Después de la activación de $\alpha_{2A/D}$ -AR, normalmente se observa una inhibición, pero es posible encontrar una activación en algunos tipos celulares, que puede ser debida a: (1) el aumento del calcio intracelular y por lo tanto la activación de las AC sensibles a Ca^{2+} /calmodulina (Duzic and Lanier, 1992), (2) al acoplamiento del receptor a proteína $G\alpha_s$ (Eason and Liggett, 1995); (3) al estado de fosforilación alterado de la AC por la activación de PKC o (4) a la acción de $G\beta\gamma$ cuando la AC es estimulada por $G\alpha_s$ (Federman et al., 1992; Mhaouty et al., 1995; Pian and Dobbs, 1995). Por lo tanto los efectos de la activación del receptor α_{2A} -adrenérgico en los niveles de AMPc dependen de la isoforma de AC expresada en las células, es decir, este receptor adrenérgico inicia señales positivas y negativas para AC2 y 4 respectivamente, pero la respuesta final de la célula parece ser el balance final de los dos tipos de señales y puede depender del estado de fosforilación de la AC. Por ejemplo, en células que expresan AC2, si PKC no la ha fosforilado, la activación del receptor α_2 -adrenérgico la inhibe, pero si ésta está fosforilada, el mismo estímulo aumentará la actividad enzimática. En definitiva, la integración de las múltiples señales por las AC es un proceso dinámico que depende del tipo enzimático y de su estado de fosforilación (Marjamaki et al., 1997).

Estos enzimas pueden desempeñar un papel importante en situaciones de administración crónica de toxinas o drogas. Durante un tiempo se propuso las AC como posible indicador de predisposición a alcoholismo crónico, al encontrar en cultivos celulares que la expresión de AC7 era estimulada por etanol (Parsian et al., 1996; Yoshimura and Tabakoff, 1999). Sharma, Klee y Nirenberg en sus estudios *in vitro* de drogodependencia observaron una estimulación del sistema del AMPc que incluía AC, PKA y CREB después de la administración de opioides. Se sabe que algunos de los estados patológicos debidos a mutaciones en varios receptores o subunidades $G\alpha$, conllevan una producción constitutiva de AMPc (Vallar et al., 1987; Parma et al., 1993). El ratón mutante para AC1, generado por el grupo de Storm y colaboradores, presenta una deficiencia de la memoria espacial y alteraciones en la potenciación a largo plazo (LTP *long term potentiation*).

2.1.4. Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas (PDE) son los enzimas responsables de la degradación de los nucleótidos cíclicos. Las PDE, al ser el eje central de esta tesis, serán comentadas más ampliamente en el punto 4 de la introducción.

2.1.5. Sistemas efectores del AMPc

El AMPc, una vez sintetizado por las AC, actúa como segundo mensajero intracelular interaccionando con diferentes tipos de proteínas como PKA (proteína cinasa A), Epac, canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos, PKG (proteína cinasa G), etc, que son los sistemas efectores de la respuesta celular al estímulo inicial o ligando.

Los principales sistemas efectores que están relacionados con el AMPc son:

2.1.5.1. Proteína cinasa A

Es una proteína heterotetramérica con dos subunidades reguladoras (RI y RII), que contienen los sitios de unión del AMPc, y otras dos catalíticas (CI y CII). En ausencia de AMPc, el tetrámero es inactivo. La unión del AMPc a las subunidades reguladoras, reduce su afinidad por las subunidades catalíticas, activas por si mismas (Scott, 1991). Estas subunidades catalíticas liberadas, fosforilando residuos específicos de serina y treonina, alteran la actividad de sus proteínas diana, entre las que encontramos: receptores, otras proteínas cinasas, canales de calcio, fosfodiesterasas, MAPK, factores de transcripción, histonas, etc. Algunas de estas proteínas son enzimas, que cambian el estado de activación según su estado de fosforilación, otras son proteínas estructurales en las que la fosforilación produce cambios conformacionales en su estructura, modificándose así su actividad. Una vez las subunidades catalíticas han ejercido su actividad cinasa, son recapturadas por las subunidades reguladoras, retornando la PKA a su estado basal (Brandon et al., 1997)

Sin embargo, éste no es el único mecanismo para explicar la respuesta fisiológica a un aumento del AMPc en puntos intracelulares específicos. La subunidad reguladora RI es esencialmente citoplasmática, y la RII está localizada en la cara interna de la membrana gracias a la interacción con miembros de una superfamilia de proteínas cinasas A de anclaje denominadas AKAP (*A Kinase anchoring protein*). Estas proteínas, que participan de manera indirecta en múltiples procesos celulares activados vía AMPc, son proteínas específicas de determinados tipos celulares, se expresan predominantemente en el SNC y se encuentran asociadas a una amplia red de estructuras subcelulares que definen la localización intracelular del complejo PKA-RII y de algunas fosfodiesterasas (Houslay and Milligan, 1997; Michel and Scott, 2002). Por lo tanto, la PKA es capaz de mediar fosforilaciones específicas de determinados sustratos en localizaciones subcelulares concretas gracias a su unión con las AKAP. Un ejemplo podría ser el péptido antidiurético arginina-vasopresina que vía AMPc induce la fosforilación y translocación de la aquaporina-2 en el riñón. Esta translocación puede ser inhibida por péptidos que antagonizan o impiden la formación del complejo PKA-AKAP (Klussmann et al., 1999).

Por lo tanto, la PKA puede ser considerada una molécula efectora esencial en un gran número de procesos fisiológicos iniciados por receptores cuya vía de señalización esté vinculada al AMPc. La activación de la PKA por éste nucleótido da lugar a la fosforilación de un gran número de proteínas con una distribución diferenciada en función del tipo celular. Por este motivo, las consecuencias de su fosforilación son variables, desde modificaciones de canales iónicos, que dan lugar a fenómenos de despolarización/hiperpolarización; movilización de Ca^{2+} intracelular, repercutiendo así en procesos de exocitosis, contracción; activación o desactivación de enzimas reguladores del metabolismo; cambios en la síntesis de neurotransmisores o en la expresión de genes específicos.

2.1.5.2. CREB

El AMPc es capaz de activar la expresión de genes cuyo promotor contenga una o varias secuencias CREs (*cyclic AMP response elements*) (Borrelli et al., 1992), (que unen factores de transcripción) como son CREB (*cyclic AMP response element binding protein*), CREM (*cyclic AMP response element modulator*) o ATF-1 (*activating transcription factor*). Una vez se activa la PKA, la subunidad C difunde hacia el núcleo de la célula donde, mediante la fosforilación del residuo de serina 133, activa CREB que, en este estado, activa genes de respuesta al AMPc mediante la unión a las secuencias conservadas CREs. Todos aquellos genes de respuesta al AMPc que presentan una secuencia palindrómica CRE en su promotor están involucrados en procesos fisiológicos en los que también está implicado CREB. Así pues CREB está implicado en una variedad de procesos como el metabolismo celular, el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Mayr and Montminy, 2001), la espermatogénesis, el control del ritmo circadiano o en procesos de memoria (Silva et al., 1998).

Existen estudios en los que se ha observado que la transcripción génica dependiente de CREB es necesaria para diferentes procesos de memoria, como el aprendizaje espacial y social en roedores, sugiriendo que pueda tratarse de un modulador universal para la formación de memoria (Silva et al., 1998).

2.1.5.3. Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GEF (*Ras superfamily guanine nucleotide exchange factor*) es una proteína que cataliza la disociación del GDP de las proteínas G inactivas, permitiendo así la unión del GTP y la activación de éstas. La mayoría de GEFs son proteínas con un dominio catalítico de 200-300 residuos flanqueado por dominios de oligomerización y de interacción con la membrana y con otras proteínas (Cherfils and Chardin, 1999). El descubrimiento de estas proteínas fue motivado por la búsqueda de genes relacionados con la señalización a través de AMPc en cerebro, debido al conocimiento de que la PKA no estaba claramente implicada en procesos neuronales como la neurotransmisión o la neuroplasticidad (Brandon et al., 1997). De esta manera se pudo identificar cAMP-GEFI y cAMP-GEFII (Kawasaki et al., 1998a; Kawasaki et al., 1998b), proteínas que unen AMPc y GEF, que son activadores de Ras y de Ras-like small G proteins (Boguski and McCormick, 1993). Esto sugiere la existencia de genes que codifican para proteínas que, al unir AMPc, acoplan directamente el sistema de transducción de la señal a las cascadas de señalización de la superfamilia Ras. Un ejemplo de este acoplamiento lo describió el grupo de Bos (de Rooij et al., 1998) al clonar una proteína GEF directamente activada por AMPc, que fue nombrada Epac (*exchange protein directly activated by cAMP*) y que activaba Rap1 (*Ras-like GTPase* pequeña involucrada en la supresión de la transformación oncogénica de células por Ras) de manera independiente de PKA. Parece que la vía AMPc-Epac-Rap1 está implicada en el control de las integrinas y la adhesión celular, en la secreción de insulina por las células β pancreáticas, en la regulación tiroidea, etc.

2.1.5.4. Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos

Los canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (*CNGC* o *cyclic nucleotide-gated channel*) son canales de Na^+ y Ca^{2+} heterotriméricos y se abren directamente por la unión de AMPc o GMPc. Los diferentes subtipos de éstos difieren en la sensibilidad a GMPc o AMPc, por ejemplo, el canal olfativo puede ser activado por ambos nucleótidos cíclicos, mientras que los de fotorreceptores son activados únicamente por GMPc. La unión del nucleótido provoca un cambio alostérico en la conformación del canal, que lo activa permitiendo así el influjo de Na^+ y Ca^{2+} produciendo una despolarización de la membrana. Estos canales fueron primeramente caracterizados en los fotorreceptores de conos y bastones (Haynes and Yau, 1985) donde median la transducción de estímulos sensoriales hacia actividad neuronal (Zufall et al., 1994; Wei et al., 1998). Se encuentran en células fotorreceptoras, en epitelio olfativo y en neuronas, y allí participan en la generación de la corriente eléctrica excitadora. Estudios de expresión han encontrado una amplia distribución en SNC incluyendo el sistema olfatorio, corteza, hipocampo y cerebelo (Bradley et al., 1997; Kingston et al., 1999). Debido a su contribución en el cambio de Ca^{2+} intracelular, se ha postulado que estos canales podrían jugar un papel importante como moduladores de la actividad neuronal y la plasticidad sináptica (Zufall et al., 1997). También se han encontrado en corazón y en riñón, entre otros órganos.

2.1.5.5. Transportadores de nucleótidos cíclicos

El GMPc y el AMPc pueden ser eliminados por dos vías diferentes: por hidrólisis, gracias a la actividad de PDE (ver apartado 4) o bien por transporte al exterior de la célula (Davoren and Sutherland, 1963; King and Mayer, 1974; Palm et al., 1981). El transporte de nucleótidos cíclicos y nucleótidos análogos al exterior celular en contra de gradiente está mediado por dos miembros la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), MRP4 y MRP5 (*multidrug resistance protein*) (Kool et al., 1997; Jedlitschky et al., 2000; Chen et al., 2001b) y necesita ATP para realizarse (Borst and Elferink, 2002). Ambos transportadores tienen mayor afinidad por GMPc que por AMPc (Jedlitschky et al., 2000; Chen et al., 2001b).

MRP4 y MRP5 se han detectado en el cerebro y en diferentes cultivos neuronales y gliales (McAleer et al., 1999; Ballerini et al., 2002; Hirrlinger et al., 2002). También están expresados en células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Zhang et al., 2000a). Experimentos en los que algunos inhibidores de las PDEs como el sildenafil, zaprinast, dipiridamole o trequinsin, son capaces de inhibir MRP5 (Jedlitschky et al., 2000; Sundkvist et al., 2002), sugieren la posibilidad de aumentar los niveles de nucleótidos cíclicos con compuestos que actúan en dos vías de regulación de éstos: por inhibición de la hidrólisis o inhibición de su transporte al exterior de la célula. Los niveles de nucleótidos que modifican estos transportadores son mínimos si los comparamos con la actividad hidrolítica de las PDEs, por este motivo, muchos autores consideran que los niveles de nucleótidos son determinados por el estrecho balance entre las actividades de las GC o AC (Cooper et al., 1995; Lucas et al., 2000), y de las PDE (Beavo, 1995b; Conti and Jin, 1999; Dousa, 1999; Francis et al., 2001; Beavo and Brunton, 2002).

2.1.6. Compartimentalización de la señal del AMPc

Las variaciones de los niveles intracelulares de AMPc son un factor clave para la activación de la vía de señalización. Así pues, tras la estimulación de un GPCR esperaríamos un cambio de concentración del nucleótido cíclico. Sin embargo este cambio no siempre se refleja en el nivel total del AMPc. Por ejemplo, la estimulación del receptor de prostaglandina 1 (PGE1) en células de riñón humanas no produce variación en la concentración del AMPc total, aumento que si se detecta cuando se estudia la concentración del AMPc cercano a la membrana (Rich et al., 2001). Este y muchos otros experimentos sugieren una idea ampliamente aceptada sobre la señalización intracelular: la compartimentalización de segundos mensajeros.

Este concepto engloba la compartimentalización de los complejos o vías de señalización para que se transmitan los mensajes biológicos de manera concisa (Baillie and Houslay, 2005). Las proteínas encargadas de canalizar estas señales externas forman complejos de multidominios, que permiten una comunicación intrincada y una regulación de las respuestas biológicas (Houslay and Kolch, 2000).

Como ejemplos de compartimentalización de la señal del AMPc encontramos la vía de señalización del receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) y la activación de los linfocitos T. En ambos ejemplos existe una localización concreta de las isoenzimas de la PDE4 que permite la regulación localizada de los niveles de AMPc necesaria para que se den estos procesos que serán comentados en el apartado de PDE4 (4.7.3. y 4.7.7.1.)

A modo de resumen, comentar que la concentración intracelular del AMPc está regulada por las actividades adenilato ciclasa y fosfodiesterasa, y depende de las isoformas de cada enzima que se expresen en las células. Por lo tanto, según la combinación de isoformas y los niveles de AC y PDE que exprese la célula, las consecuencias fisiológicas de la modulación de alguno de estos encimas pueden ser muy diferentes (Houslay and Milligan, 1997).

3. GMPc

La guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMPc), considerada también un segundo mensajero intracelular, fue considerada como una molécula con importancia biológica por Ashman y Price en el 1963 (ASHMAN et al., 1963), cuando la identificaron, junto con el AMPc, como la molécula que contenía fosfato orgánico más abundante en la orina. Poco después se descubrieron los enzimas encargados de su síntesis, las guanilato ciclasas, y degradación, las fosfodiesterasas (Hardman and Sutherland, 1969).

Del mismo modo que para el AMPc, la concentración intracelular del GMPc es un punto importante en el mecanismo de transducción de la señal, y puede aumentar o disminuir rápidamente en respuesta al estímulo extracelular. Los dos enzimas claves en la homeostasis del GMPc son la guanilato ciclasa, responsable de su síntesis a partir de guanosin trifosfato (GTP), y la fosfodiesterasa que lo degrada a 5'-GMPc.

En los últimos años se ha despertado un interés por la vía de señalización del GMPc, gracias al uso de sildenafil (Viagra), inhibidor de una PDE específica de este nucleótido, en el tratamiento de la disfunción eréctil y se ha sugerido la implicación del GMPc en la movilidad de los espermatozoides, el desarrollo de las células germinales testiculares, síntesis de testosterona en células Leydig y relajación de la musculatura de los vasos sanguíneos (Middendorff et al., 2000). Con el uso de modelos *in vivo*, a esta vía de señalización también se le ha atribuido un posible papel citoprotector y antiapoptótico en el sistema nervioso central y en el cardiovascular (Andoh et al., 2002) además de intervenir en la embriogénesis (Chen et al., 2001a), y en procesos de aprendizaje y memoria en adulto (van Staveren et al., 2003; Boess et al., 2004; de Vente, 2004).

3.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL GMPc

A parte de la vía clásica de transducción de señales iniciada por la interacción de un neurotransmisor liberado presinápticamente con un receptor acoplado a proteína G localizado postsinápticamente ya comentada, las neuronas también son capaces de transmitir información mediante interacciones no sinápticas (también conocidas como *volume transmisión*, que se da cuando neurotransmisores, moduladores y otras sustancias neuroactivas difunden en el espacio extracelular). Una de las moléculas que media este tipo de transmisión es el óxido nítrico (NO) y está considerado como un mensajero neural atípico (Garthwaite, 1991; Garthwaite and Boulton, 1995; Baranano et al., 2001).

La vía de señalización mediada por GMPc puede ser iniciada por dos tipos de moléculas o primeros mensajeros: el NO, que tiene como diana las guanilato ciclasas solubles (GCs), y los péptidos natriuréticos, cuya diana son las guanilato ciclasas de membrana (GCp) (Figura 1.1).

3.1.1. Óxido nítrico y óxido nítrico sintasa

La primera evidencia sobre la implicación en la modulación neuronal del NO y su posible contribución en la producción del GMPc fue publicada por dos grupos diferentes en el 1989, al descubrirse que la activación de receptores NMDA, por la unión de glutamato, generaba NO (Garthwaite et al., 1989), y que esta unión de glutamato a su vez aumentaba los niveles de GMPc en el cerebelo de manera dependiente de NO (Bredt and Snyder, 1989). Inicialmente se había descrito un factor liberado por células endoteliales (EDRF o *endothelial-derived relaxing factor*) que era capaz de relajar la musculatura lisa (Furchgott and Zawadzki, 1980) estimulando la producción del GMPc. Así pues se identificó este factor como NO (Ignarro et al., 1987a; Ignarro et al., 1987b) y se descubrió un activador endógeno de la GCs (Murad, 1998). De esta manera se identificó una nueva vía de señalización en la que participaban el NO, la GCs y el GMPc (Moncada et al., 1991).

El NO es sintetizado a partir de la L-arginina por acción del enzima óxido nítrico sintasa (NOS), del que se han identificado tres formas en diferentes tejidos: NOS neuronal (nNOS o NOSI); NOS inducible (iNOS o NOSII); y NOS endotelial (eNOS o NOSIII) (Forstermann et al., 1998). Las tres isoformas se han detectado en el cerebro.

La naturaleza lipofílica del NO, junto con su corta vida media (segundos) y una distancia de difusión de 10-100 μm en tejidos biológicos, limita sus efectos a un área local donde se expresa su enzima diana, la GCs (Garthwaite, 1995).

Está implicado en la modulación del desarrollo, la plasticidad sináptica, la secreción neuroendocrina, del procesamiento sensorial y en el flujo sanguíneo (Garthwaite and Boulton, 1995; Zhang and Snyder, 1995).

3.1.2. Guanilato ciclasa

Las guanilato ciclasas son los enzimas que sintetizan el GMPc, pueden ser solubles o bien estar anclados a la membrana, y ser estimulados por NO (en el caso del enzima soluble, GCs) o por NAP (*natriuretic atrial peptide*) (si se trata de la forma particulada o unida a membrana, GCp).

La GCs es un heterodímero formado por dos subunidades, α y β , de las que se han clonado y secuenciado dos isoformas de cada una ($\alpha 1-2$, $\beta 1-2$). Sólo se han encontrado dos combinaciones de heterodímero funcionalmente activas: la $\alpha 1\beta 1$, que es ubícu; y la $\alpha 2\beta 1$, que se ha encontrado en placenta humana y en sistema nervioso central (Hobbs, 1997; Denninger and Marletta, 1999; Mergia et al., 2003; Pifarre et al., 2007).

Cada subunidad posee un dominio regulador de unión al grupo prostético hemo en el extremo N-terminal; un dominio catalítico en el extremo C-terminal que comparte homología de secuencia con el de las subunidades de las formas particuladas de la enzima y con las adenilato ciclasas; y un dominio central de dimerización (Schulz et al., 1991; Foster et al., 1999). Este enzima está ampliamente expresado en cerebro (Pifarre et al., 2007) y se ha detectado en las proximidades de la células que expresan NOS (Schmidt et al., 1992; Southam and Garthwaite, 1993; Furuyama et al., 1993b; Burgunder and Cheung, 1994; de Vente et al., 1998). La unión del NO al grupo hemo de la GCs induce un cambio conformacional del enzima que estimula la producción del GMPc.

La GCp es activada por péptidos natriuréticos (péptido natriurético atrial, el péptido natriurético cerebral o el péptido natriurético tipo C) (Lucas et al., 2000; Wedel and Garbers, 2001). Han sido identificadas siete isoformas de GCp, (GC-A hasta CG-G) de las que se sabe que de la isoforma A a la C se localizan a lo largo del cerebro (Wedel and Garbers, 2001), mientras que la guanilato ciclasa D se expresa en el bulbo olfatorio (Juilfs et al., 1997). Este enzima está compuesto por un dominio extracelular variable de unión para los diferentes ligandos, un dominio transmembrana, un dominio intracelular conservado con gran homología con tirosina cinasas y un dominio catalítico (Lucas et al., 2000). La unión de un ligando al dominio extracelular, la oligomerización, la unión del ATP y la autofosforilación por el dominio cinasa forman parte del complejo proceso de activación del enzima (Tremblay et al., 2002).

3.1.3. Fosfodiesterasas

Estos enzimas serán comentados ampliamente en el apartado 4 de la introducción.

3.1.4. Sistemas efectores del GMPc

El GMPc, una vez sintetizado por las guanilato ciclasas, actúa como segundo mensajero intracelular interaccionando con diferentes proteínas: proteína cinasa G (PKG), canales iónicos dependientes de nucleótidos (CNGC), transportadores de nucleótidos cíclicos y fosfodiesterasas.

3.1.4.1. Proteína cinasa G

Es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas idénticas que continúan asociadas incluso después de la activación por GMPc, a diferencia de PKA, que se disocia una vez se une el AMPc (Lincoln et al., 2001). Cada una de las subunidades contiene una unidad reguladora, y una catalítica (Scott, 1991). La subunidad reguladora está situada en el extremo N-terminal y consta de un dominio de dimerización; un dominio inhibitorio que contiene sitios de autofosforilación (Wolfe et al., 1989; Wernet and Flockerzi, 1989); dos sitios de unión al GMPc que se diferencian en un aminoácido de los sitios de unión del AMPc a la PKA (Weber et al., 1989; Shabb et al., 1990). Así pues, ambos nucleótidos cíclicos son capaces de unir tanto la PKA como la PKG, pero con diferente afinidad (Corbin et al., 1986). La subunidad catalítica se sitúa en el extremo carboxilo del péptido.

En mamíferos se han identificado dos genes que codifican para esta quinasa: PKGI (de la que se han encontrado dos variantes de *splicing* en el extremo amino terminal, PKGI α y PKGI β) y PKGII (Wernet and Flockerzi, 1989; Sandberg et al., 1989; Jarchau et al., 1994). La PKGI tiene una expresión más restringida en el cerebro que PKGII (El Hussein et al., 1999; de Vente et al., 2001).

Este enzima participa en procesos tan diversos como la relajación muscular, la agregación plaquetaria o la regulación de las PDE dependientes del GMPc (Francis et al., 1988; Corbin et al., 1990; Halbrugge et al., 1990; Thomas et al., 1990).

La autofosforilación de este enzima aumenta la afinidad por el GMPc, y su unión puede proteger el nucleótido de la degradación, por este motivo, algunos autores han sugerido que el hecho de proteger el GMPc de la degradación, podría ser una retroalimentación positiva en el mantenimiento de su señal (Kotera et al., 2003).

3.1.4.2. Canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos: comentados en apartado 2.1.5.4.

3.1.4.3. Transportadores de nucleótidos cíclicos: comentados en apartado 2.1.5.5.

4. FOSFODIESTERASAS

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) son metalohidrolasas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos a sus correspondientes 5'-nucleósidos monofosfato en presencia de cationes divalentes. Estos enzimas pueden ser específicos de AMPc, GMPc o bien pueden utilizar ambos sustratos.

Anteriormente hemos comentado que los niveles basales de AMPc en la mayoría de las células son aproximadamente de 1 μM , pero es necesaria una concentración intracelular de 10 μM para que se active la PKA. Si no existiera un sistema capaz de eliminar estos nucleótidos cíclicos generados por las ciclasas correspondientes, los niveles podrían llegar a ser estables, perdiendo así su capacidad de respuesta específica. Así pues, es clave la degradación de estos mensajeros secundarios mediante la actividad enzimática de las PDE. Teóricamente, las concentraciones del AMPc y del GMPc están reguladas por la activación de las AC y GC y/o por la inhibición de la actividad fosfodiesterasa (Houslay, 1998; Houslay, 2001).

La actividad de las PDE fue descrita por primera vez poco después del descubrimiento del AMPc por Rall y Sutherland en 1958 y fue una de las piezas iniciales para apoyar la importancia del nucleótido como molécula fisiológicamente relevante. En la década de los 70, ya se hablaba de gran diversidad entre las PDE cuando, con el uso de purificaciones parciales de la actividad de la PDE a partir de varios tejidos, se observó que estas actividades tenían diferentes afinidades por el AMPc o el GMPc y distintas propiedades fisicoquímicas (Thompson and Appleman, 1971). Desde entonces el uso de técnicas moleculares como la purificación de proteínas o el clonaje de genes han demostrado que las PDE de mamíferos pertenecen a un grupo de isoenzimas estructuralmente relacionados y que pertenecen a familias de genes asociados.

Dentro de la superfamilia de las PDE, existen tres clases: la clase I, que contiene todas las PDE de mamíferos, la PDE *Dunce* de *Drosophila melanogaster*, o las PDE de *Caenorhabditis elegans*...; la clase II que se ha encontrado en bacterias, levaduras y hongos; y la clase III que únicamente está presente en bacterias (Richter, 2002).

En esta tesis solamente nos centramos en las PDE de clase I.

A nivel general, estas proteínas pueden actuar como efectores en la transducción de la señal por su interacción con GPCRs (Stryer, 1996); como reguladores homeostáticos controlando los niveles de AMPc y GMPc (Conti et al., 1995); como factores clave en vías celulares dependientes de estos nucleótidos cíclicos (Conti et al., 1995; Manganiello et al., 1995a; Beavo, 1995b); o como responsables de su compartimentalización (Houslay, 1995; Houslay and Milligan, 1997; Baillie et al., 2005; Baillie and Houslay, 2005). Esta importante implicación en procesos de transducción de señales ha señalado las PDE como diana farmacológica ideal para controlar los niveles intracelulares de ambos nucleótidos (Beavo et al., 1994; Manganiello et al., 1995a; Beavo, 1995b; Houslay, 1998; Dousa, 1999; Houslay, 2001).

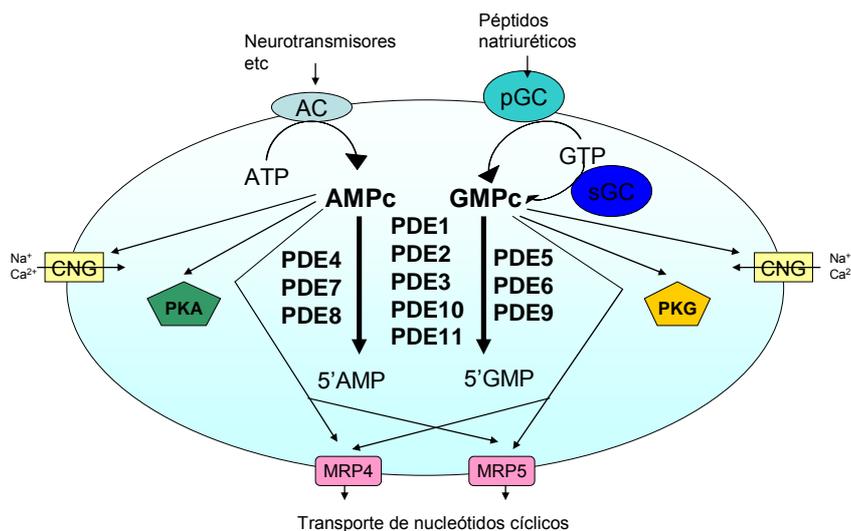


Figura 1.4. Metabolismo del AMPc y del GMPc y sus fosfodiesterasas.

4.1. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS PDE

Las once familias de PDE (PDE1-PDE11) que conforman esta superfamilia han sido clasificadas en base a su secuencia de aminoácidos, propiedades bioquímicas, sensibilidad a inhibidores, mecanismos reguladores y por sus afinidades por el AMPc o el GMPc. (Tabla 1.3.).

Inicialmente fueron clasificadas en función de si eran o no enzimas citosólicas, junto con su “alta” o “baja” afinidad enzimática o K_m . Posteriormente se observaron diferencias en la especificidad de sustrato, el AMPc o el GMPc, y la regulación por Ca^{2+} /Calmodulina(CaM) o por el GMPc, entre algunas actividades de las PDE. Así pues, el uso de técnicas de clonaje de genes y purificación de proteínas, permitió determinar que las diferencias entre estas actividades correspondían a diferentes enzimas. La cromatografía de intercambio iónico, fue la técnica que permitió clasificar por primera vez las diferentes PDE en función de su orden de elución (Beavo et al., 1971; Thompson and Appleman, 1971). Pero este sistema de clasificación resultó ser limitado y confuso debido a la aparición de nuevas PDE que cada vez eran más homólogas entre ellas. De esta manera se creó un comité regulador de la nomenclatura y los criterios de clasificación para poder englobar las nuevas PDE que iban apareciendo gracias a la biología molecular (Beavo et al., 1994). La actual nomenclatura se indicaría de la forma siguiente:

rPDE4B2

donde r indica la especie, en este caso rata (si se trata de otra especie encontramos HS para homo sapiens, M para monkey, m para mice...), PDE4 la familia, B el gen dentro de la familia y 2 la variante de *splicing*.

4.2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LAS PDE

La familia de las PDE presenta propiedades diferentes, aún así, todas ellas comparten una estructura muy similar que puede dividirse en tres dominios: un extremo amino (NH_2), una región conservada o dominio catalítico y un extremo carboxilo (COOH) (Figura 1.5.).

El dominio catalítico es una región de unos 270 aminoácidos altamente conservada entre los miembros de una misma familia (hasta un 80% de homología en la secuencia de aminoácidos) y localizada cerca del extremo COOH . Esta región contiene los elementos específicos de cada familia, causantes de las diferencias de afinidades por el sustrato y de la sensibilidad a distintos inhibidores. En algunos isoenzimas de las PDE se ha ubicado en esta región el lugar de unión del GMPc (Manganiello et al., 1995a; Beavo, 1995b). Por otro lado, también se han identificado dos residuos de histidina fundamentales para la unión de cationes divalentes (Zn^{2+} y Mg^{2+}), que, a su vez, son esenciales para la actividad catalítica de las PDE (Francis and Corbin, 1994; Omburo et al., 1998).

Al lado del centro catalítico, y próximo al extremo amino se encuentra el dominio regulador, que presenta mayor divergencia en tamaño y estructura entre todas las PDE. Esta región contiene distintas secuencias en función de las propiedades reguladoras de cada PDE. Por ejemplo podemos encontrar el dominio de unión a calcio-calmodulina (PDE1); dos dominios de unión no catalítica al GMPc también conocido como dominio GAF (PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 y PDE11); dominios de asociación a membrana (PDE3); regiones conservadas conocidas como la UCR (PDE4); sitios de fosforilación por la PKA o la PKG (PDE3 y PDE4); dominios inhibitorios (PDE1 y PDE4); y el dominio PAS en PDE8.

En general hay una homología de aproximadamente el 65% al comparar la secuencia de aminoácidos entre miembros de una misma familia, mientras que disminuye a menos de un 40% al comparar miembros de diferentes familias (Beavo, 1995b). Las diferentes familias de las PDE están altamente conservadas entre especies, como demuestra el hecho de encontrar una homología elevada (incluso más de un 90%) en la misma familia génica de especies diferentes. Por ejemplo, el isoenzima PDE3A de la rata presenta mayor homología con su correspondiente humano que con el isoenzima PDE3B murino (Degerman et al., 1997). Sin embargo, las distintas isoformas de PDE presentan una gran divergencia en su localización cromosómica al compararla entre especies, por ejemplo, la PDE4B, que está localizada en el cromosoma 5 de la rata y en el 1 humano, o la PDE4D, que se encuentra en el cromosoma 2 de la rata y en el 5 humano (Szpirer et al., 1995).

Una de las principales características que presentan la mayoría de las PDE es que a partir de un único gen se obtiene diferentes isoformas generadas por *splicing* alternativo del ARNm. Debido al elevado número de genes clonados y a la posibilidad de, algunas de ellas, ser procesadas por *splicing* alternativo, encontramos que los nucleótidos cíclicos pueden ser degradados por un gran número de isoformas de PDE. Se han identificado más de 20 genes de PDE y se estima que hay más de 50 enzimas

diferentes (Lugnier, 2006). Es necesario mencionar que el número de las PDE descritas derivan de tejidos de diferentes especies (humano, perro, rata, ratón, etc) y cabe la posibilidad de que alguna de las PDE se expresen en alguna especie y no en las otras (Yuasa et al., 2000; Yuasa et al., 2001b).

La mayoría de las variantes de *splicing* se diferencian en el extremo 5', aunque también se han encontrado isoformas que difieren en el extremo 3', como pueden ser la PDE1 y la PDE10. La existencia de *splicing* alternativo permite producir diferentes formas enzimáticas que interaccionen con diferentes dianas moleculares y con diferentes propiedades bioquímicas. Por otro lado, al ser un mecanismo altamente específico de tejido, da la posibilidad de expresar selectivamente un tipo de isoenzima (Kotera et al., 1999b; Miró et al., 2001; Yuasa et al., 2001a; Sasaki et al., 2002; Rentero et al., 2003).

Se han realizado numerosos trabajos para estudiar el patrón de distribución en sistema nervioso central de las 11 familias descritas (Kincaid et al., 1992; Repaske et al., 1993; Furuyama et al., 1993a; Iwahashi et al., 1996; Reinhardt and Bondy, 1996; Kotera et al., 1997; Fujishige et al., 1999a; Fawcett et al., 2000; Andreeva et al., 2001; Miró et al., 2001) y se ha descrito que muchas células contienen miembros de diferentes familias que pueden expresarse en cantidades, proporciones y localizaciones subcelulares diferentes. Por ejemplo, las neuronas olfatorias expresan la PDE1C y la PDE4 en diferentes compartimentos en la misma célula (Juilfs et al., 1997; Beavo and Brunton, 2002).

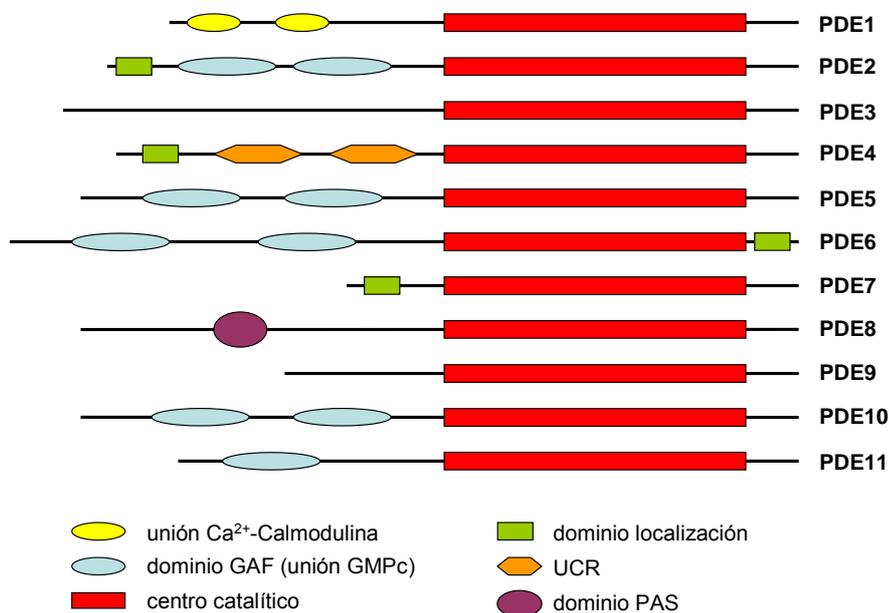


Figura 1.5. Esquema de las familias de PDE de mamífero.

4.3. INHIBIDORES DE LAS PDE

Como ya hemos comentado anteriormente, uno de los criterios de clasificación de las once familias de las PDE se basa en el grado de afinidad por el gran número de inhibidores de éstas descritos. Algunos de estos compuestos ya se utilizaban como fármacos en la práctica médica mucho antes de conocer sus características

inhibidoras. De hecho, en 1860 Henry Hyde Salter's ya publicó un trabajo utilizando inhibidores de fosfodiesterasas, en el que se recomendaba la toma de dos tazas de café concentrado con el estómago vacío para mejorar el asma. Incluso en el antiguo Egipto utilizaban *Nymphaea caerulea* (flor de loto azul), cuyos extractos, que contienen algunos compuestos inhibidores de esta superfamilia, se utilizaban para la buena salud, el tratamiento del dolor, incrementar la memoria, aumentar la circulación, el deseo sexual y crear sensación de euforia y éxtasis (<http://www.healthherbs.com/products/singleherbtinctures/bluelotus.pdf>). En los años 60, Butcher y Sutherland (1962) demostraron que las metilxantinas, como la cafeína y la teofilina, inhibían la degradación de nucleótidos cíclicos.

Podemos dividir los inhibidores de las PDE en dos tipos: (1) la primera generación de inhibidores de las PDE, que incluyen la metilxantinas (cafeína, teofilina, IBMX o papaverina) y son inhibidores no selectivos con efectos secundarios; y (2) la segunda generación de inhibidores, que tienen mayor afinidad y selectividad por las diferentes familias. Dentro de este grupo encontramos inhibidores de la PDE5 (vardenafil, tadalafil) o de la PDE4 (cilomilast y roflumilast que se están utilizando como agentes terapéuticos para la disfunción sexual (Kim et al., 2001) o enfermedades respiratorias como el asma (Huang et al., 2001; Dyke and Montana, 2002; Lagente et al., 2005), respectivamente, o bien rolipram, que se empezó utilizando por sus propiedades antidepressivas (Bobon et al., 1988; Bertolino et al., 1988).

El hecho de que las diferentes familias de las PDE tengan secuencias únicas en los dominios catalíticos y reguladores, y un patrón de expresión selectivo, ofrece la posibilidad de modular la actividad de los isoenzimas individuales usando fármacos específicos (Beavo and Reifsnyder, 1990).

A continuación se resumirán las principales características de las diferentes familias de las PDE y de sus isoenzimas.

4.4. PDE1 (dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina, hidroliza el AMPc y el GMPc)

Existen 3 genes en esta familia (PDE1A, B y C) (Beavo, 1995b) que dan lugar a múltiples isoformas por *splicing* alternativo, que difieren entre ellas en su secuencia de aminoácidos en ambos extremos, el carboxilo y el amino, y tienen como característica común dos dominios de unión a calmodulina (CaM) localizados en el extremo amino (Conti and Jin, 1999).

Algunas variantes de *splicing* presentan más afinidad por el GMPc (PDE1A), otras por el AMPc (PDE1B) y otras muestran la misma afinidad por ambos nucleótidos (PDE1C). Por ejemplo, la PDE1A y la PDE1B tienen distinta especificidad por ambos (K_m 2-70 μ M para el AMPc y 2-20 μ M para el GMPc), mientras que las isoformas de la PDE1C hidrolizan ambos nucleótidos con la misma afinidad.

Las isoformas de esta familia parecen actuar como dímeros solubles (Alexander et al., 2004) y necesitan Ca^{2+} y CaM para su actividad, de hecho el complejo Ca^{2+} /CaM aumenta hasta 10 veces la actividad enzimática. Este complejo además regula otras proteínas intracelulares que también influyen en los niveles intracelulares de **Tabla 1.3**.

Principales características de las familias de fosfodiesterasas (Souness et al. 2000; Houslay 2001; Francis 2002)

PDE	Genes	Sustratos	Km (μM) AMPc/GMPc	Vmax	Regulación	Inhibidores
PDE1	1A,B,C	AMPc/GMPc	2-70 / 2-20	AMPc \approx GMPc	Ca ²⁺ /calmodulina fosforilada PKA/PKG CaMKII	Nicardipine, vinpocetine, calmidazolium, SCH51866, zaprinast, 8-MMX, IBMX
PDE2	2A	AMPc/GMPc	30-50 / 15-30	AMPc \approx GMPc	estimulada por GMPc	EHNA, IBMX
PDE3	3A,B	AMPc/GMPc	0.1-0.8 / 0.1-0.8	AMPc>GMPc	inhibida por GMPc fosforilada por PKA	Milrinone, ciclostamide, amrinone, enoximone, SK&F 95654, IBMX
PDE4	4A,B,C,D	AMPc	1-3 / >50	AMPc>>GMPc	fosforilada ERK/PKA	Rolipram, RO 20-1724, cilomilast, roflumilast, BAY 19-8004, zardaverine, CDP840, RS25344, LAS31025, IBMX,
PDE5	5A	GMPc	>300 / 1-5	AMPc<GMPc	unión GMPc fosforilada PKG/PKA	Sildenafil, vardenafil, taldelafil, zaprinast, dipyridamole, SCH 51866, SK&F 96231, WIN 65579, DMPPO, E4021, KF31327, t-1032, T-0156, GF284, IBMX
PDE6	6A,B,C,D	GMPc	>500 / 0.06-1	AMPc<<GMPc	activada por transducina fosforilada PKG/PKA	Sildenafil, vardenafil, zaprinast, dipyridamole, DMPPO, E4021, GF284, IBMX
PDE7	7A,B	AMPc	0.2-1 / >1000	AMPc>>GMPc	fosforilada por PKA	dipyridamole, SCH 51866, papaverine, benzothieno dioxides, benzothiadiazine dioxides, IBMX
PDE8	8A,B	AMPc	0.06-15 / >100	AMPc>>GMPc		Dipyridamole
PDE9	9A	GMPc	230 / 0.07-0.17	AMPc<<GMPc		zaprinast, SCH 51866
PDE10	10A	AMPc/GMPc	0.05 / 3	AMPc<GMPc	fosforilada por PKA	zaprinast, dipyridamole, E4021, SCH 51866, IBMX
PDE11	11A	AMPc/GMPc	1.04 / 0.52	AMPc \approx GMPc	fosforilada por PKA/PKG	zaprinast, dipyridamole, E4021, SCH 51866, IBMX

nucleótidos cíclicos (algunas isoformas de AC, NOS o las proteínas quinasas II y IV). Por lo tanto, la amplitud y duración de la señal en respuesta al AMPc o al GMPc depende de varios sistemas enzimáticos dependientes de Ca^{2+} /CaM (Beavo, 1995b). El extremo amino puede ser fosforilado por la PKA, disminuyendo la afinidad por Ca^{2+} /CaM de la PDE1A1 y de la PDE1A2 (Beavo, 1995b; Yan et al., 1996).

Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* revelan una amplia distribución diferencial de las 3 isoformas de esta familia en sistema nervioso central y periférico (Kincaid et al., 1992; Yan et al., 1994; Polli and Kincaid, 1994). En el cerebro del ratón, el ARNm de la PDE1A está localizado en la corteza cerebral así como en las células piramidales del hipocampo y su proteína se encuentra predominantemente en terminales sinápticos. El mensajero de la isoforma PDE1B se expresa en regiones cerebrales ricas en receptores dopaminérgicos, como el estriado o el tubérculo olfativo (Han et al., 1999). El uso de anticuerpos monoclonales contra la PDE1 en humanos reveló una distribución similar a la del cerebro de la rata (Lal et al., 1999). Esta familia también presenta una amplia distribución en tejidos periféricos como corazón, pulmón, riñón, testículo, hígado y músculo (Zhao et al., 1997; Dousa, 1999).

La gran variabilidad en su localización celular y en su comportamiento frente a diversos agentes farmacológicos ha permitido el diseño de inhibidores específicos para algunos de sus isoenzimas.

Estos compuestos han sido de gran utilidad para el estudio de los procesos fisiológicos en los que participan estas PDE (Kakkar et al., 1999). De esta manera se han elaborado derivados del ginseng para el tratamiento del fallo cardiaco, así como antipsicóticos y anticonvulsivos (Takahashi and Tokuyama, 1998), que inhiben selectivamente la actividad de la PDE1A1 en el corazón y de la PDE1A2 en el cerebro. Otros inhibidores de la PDE1A2 como el deprenilo (conocido como inhibidor de la monoamino oxidasa-B, MAO-B) o de la PDE1 como la dihidropiridina (antagonista del Ca^{2+}) tienen propiedades antiparkinsonianas (Kakkar et al., 1996). Últimamente de ha visto la vinpocetina como posible agente terapéutico para enfermedades del tracto urogenital, como la incontinencia (review:(Montorsi et al., 2004).

4.5. PDE2 (estimulada por el GMPc)

La familia de la PDE2 consta de un único gen, la PDE2A, del que se conocen tres variantes de *splicing*, que difieren entre ellas en su secuencia de aminoácidos del extremo amino (Yang et al., 1994; Rosman et al., 1997; Conti and Jin, 1999), donde se localiza la región reguladora, y que presenta dos dominios GAF o sitios de unión no catalíticos específicos para el GMPc (Dousa, 1999). Es por ello, que esta familia está caracterizada por ser estimulada por el GMPc, y aunque es capaz de hidrolizar ambos nucleótidos, presenta mayor afinidad por el GMPc como sustrato (K_m 15-30 μ M). No obstante la unión alostérica del GMPc a uno de estos dominios GAF aumenta su afinidad por el AMPc (Beavo, 1995b; Francis et al., 2002b). El dominio GAF también participa en la dimerización de la proteína (Martinez et al., 2002), que encontramos en forma de homodímero anclado a la membrana (Alexander et al., 2004).

El estudio de la distribución de la PDE2A mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, describe una distribución en humano en el corazón, riñón, pulmón, páncreas, arteria pulmonar, cerebro y musculatura esquelética (Sadhu et al., 1999). En el cerebro de roedor se ha detectado la expresión del ARNm de la PDE2A en corteza cerebral, cerebelo, bulbo y tubérculo olfativos, hipocampo, amígdala, habénula y estriado (Repaske et al., 1993; van Staveren et al., 2003). También se encuentra en capilares de riñón y corazón humano y en células endoteliales de venas, sugiriendo una posible implicación de la PDE2A en el efecto mediado por nucleótidos cíclicos en células inflamatorias que atraviesan la barrera hematoencefálica (Sadhu et al., 1999). De hecho existen estudios en los que se ha visto que el aumento de nucleótidos cíclicos en células endoteliales de arterias aumenta la función de la barrera (Suttorp et al., 1993) (Suttorp et al., 1996a; Suttorp et al., 1996b) y modula la expresión de moléculas de adhesión (Poher et al., 1993; Ghera et al., 1994; Morandini et al., 1996).

Esta peculiaridad de hidrolizar el AMPc tras su estimulación por el GMPc, le permite participar en aquellos procesos fisiológicos en los que el efecto mediado por el GMPc es opuesto al realizado por el AMPc. De esta manera la PDE2A tiene un papel relevante en la síntesis de aldosterona en las células glomerulares de la corteza renal, donde el aumento de los niveles del GMPc provocado por la activación de la GCp por acción del ANP, produce una activación de la PDE2A que hidroliza el AMPc, disminuyendo así sus niveles y la síntesis de aldosterona (MacFarland et al., 1991). De manera similar, la PDE2A se encuentra implicada en la liberación de adrenalina por parte de las células cromafines de la médula adrenal. También se ha visto que la PDE2, junto con la PDE3 y la PDE5, parecen mediar la comunicación entre los sistemas de señalización del AMPc y el GMPc en células cardíacas (Maurice, 2005). También participa en otros procesos fisiológicos como la agregación plaquetaria, la regulación de canales de Ca^{2+} que forman parte de las vías de señalización del sistema olfativo (Juilfs et al., 1997); o bien en la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo-L que desempeñan un papel, importante en la actividad eléctrica y la contracción en miocitos de conejo, no así en los de otras especies como humanos o gatos, en los que este papel es llevado a cabo por la PDE3 (Fischmeister and Mery, 1996; Fischmeister et al., 2005).

Uno de los inhibidores selectivos que se conoce para la PDE2, EHNA (*erythro-9(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine*), presenta la capacidad de impedir la estimulación de la PDE2 por parte del GMPc, bloqueando así su actividad enzimática. El uso de inhibidores permite estudiar la participación de la PDE2A en diferentes procesos, como por ejemplo en la regulación, a través del GMPc, de los canales de entrada de Ca^{2+} en tejido cardíaco (Mery et al., 1995); o bien en el metabolismo del AMPc en timocitos a bajas concentraciones de GMPc (Michie et al., 1996). Estudios recientes relacionan la PDE2, junto con la PDE3 y la PDE5, con diversos procesos de memoria (Blokland et al., 2006). Estudios *in vitro* (en cultivos neuronales y rebanadas de hipocampo) e *in vivo* (en ratones) realizados por el grupo de Jan de Vente demostraban que la administración de Bay 60-7550, un nuevo y potente inhibidor selectivo de la PDE2,

producía una mejora en la LTP de la transmisión sináptica y de la memoria de trabajo (Boess et al., 2004).

Trabajos en los que la actividad de la PDE2 puede ser inhibida en plaquetas por un análogo del AMPc, el 8-BDB-TAMPc (*8-[4-bromo-2,3-dioxobutyl]thio]AMPc*), sugieren la posibilidad del uso de este tipo de análogos de nucleótidos cíclicos como base para el diseño de nuevos inhibidores de la PDE2 (Mseeh et al., 2000).

4.6. PDE3 (inhibida por el GMPc)

La familia PDE3 está formada por dos genes, PDE3A y PDE3B, aislados en plaquetas y corazón (Macphee et al., 1986; Harrison et al., 1986) y en tejido adiposo (Degerman et al., 1988), respectivamente. El isoenzima PDE3A tiene tres variantes de *splicing* que difieren entre ellas en el extremo amino (Choi et al., 2001) y, mediante el uso de diferentes sitios de iniciación de la transcripción, puede dar lugar a formas solubles (variantes cortas) y transmembranales (variantes largas) (Kasuya et al., 1995). En estudios inmunohistoquímicos realizados en tejidos del sistema cardiovascular o en cultivos primarios de musculatura lisa de aorta de rata, encontraron la proteína de la PDE3A de 120 KDa únicamente en la fracción citosólica, mientras que la proteína de la PDE3B de 153 KDa estaba limitada a la fracción particulada (Liu and Maurice, 1998).

Esta familia es capaz de degradar el AMPc o el GMPc y tiene una elevada afinidad por ambos nucleótidos (K_m 0.1-0.8 μ M). Aunque el GMPc es capaz de unirse al centro catalítico de estas enzimas, la baja velocidad de hidrólisis hace pensar que en este caso la función fisiológica de este nucleótido es la de inhibir la hidrólisis del AMPc por parte de estas PDE (Manganiello et al., 1995b; Francis et al., 2002b).

Ambas isoformas presentan una región de unos 300 aminoácidos que forman un gran dominio hidrofóbico con 6 hélices transmembranales. Contigua a estas hélices, se encuentra una segunda región de 50 aminoácidos, que también presenta características hidrofóbicas (Kenan et al., 2000). Los miembros de esta familia se caracterizan por la inserción de 44 aminoácidos en su dominio catalítico que no se encuentran en ninguna otra familia de PDE (Manganiello et al., 1995a; Manganiello et al., 1995b). Ambos isoenzimas están activados mediante mecanismos de fosforilación por la serina/treonina cinasa o por la PKA (Dousa, 1999), y en el caso de la isoforma PDE3B, también por la proteína cinasa dependiente de insulina (Rondinone et al., 2000).

Los primeros estudios de distribución tisular de las isoformas de la PDE3 se realizaron por hibridación *in situ* en roedores. En ellos, se observa que el ARNm de la PDE3B se expresa de forma abundante en tejido adiposo y hepático, en el epitelio de conductos renales y en espermatozoides. En cambio el mensajero de la PDE3A es más abundante en corazón y en musculatura lisa (Reinhardt et al., 1995). En el SNC, el ARNm de la PDE3B se expresa en el epitelio neuronal durante el desarrollo, mientras que en estado adulto, su expresión se localiza tanto en células neuronales como gliales y predominantemente en hipocampo y cerebelo. En cambio, el ARNm de la PDE3A muestra un patrón de localización diferencial durante el desarrollo, expresándose en el

epitelio neuronal en estadios iniciales, en núcleos del tálamo y médula, en estados post-natales y en el estriado e hipocampo en estado adulto (Reinhardt and Bondy, 1996). Posteriormente se observó este mismo patrón a nivel de proteína. Otros estudios han localizado la PDE3A en ovario (Shitsukawa et al., 2001) y en tejido cavernoso del pene (Kuthe et al., 2000), así como ambas isoformas en glándulas submandibulares de roedores (Murata et al., 2000).

De manera general, el papel fisiológico llevado a cabo por la PDE3 tiene lugar en aquellos tejidos donde tanto el AMPc como el GMPc tienen efectos similares. Un ejemplo de esto lo encontramos en la musculatura lisa, donde la liberación del factor relajador del endotelio (ERF, o NO) provoca un aumento de los niveles del GMPc intracelular, que inhibe la PDE3A, aumentando así los niveles de AMPc, con la consiguiente activación de la PKA que a su vez activa por fosforilación a la PDE3A, lo que provoca la hidrólisis del AMPc, y por consiguiente la relajación de la musculatura lisa (Beavo, 1995b). Otro ejemplo lo encontramos en la regulación de la lipogénesis en hígado por parte de la PDE3B, donde provoca una disminución en la liberación de ácidos grasos libres por parte de los adipocitos (Tang et al., 2001). Este isoenzima también se encuentra implicado en la regulación de la liberación de insulina por parte de las células β del páncreas (Soderling and Beavo, 2000; Sano et al., 2001; Pyne and Furman, 2003; Yang and Li, 2003). Otros estudios demuestran la participación de la PDE3 en procesos neoplásicos (Murata et al., 2001), en la maduración de oocitos por parte de la PDE3 (Conti and Jin, 1999; Conti, 2000), concretamente de la PDE3A (Richard et al., 2001) o bien su coimplicación junto con la PDE5 en la regulación de la erección del pene (Kuthe et al., 2000).

Existe un gran número de fármacos descritos que son inhibidores selectivos de la PDE3, y son utilizados en un amplio rango de aplicaciones gracias a la gran diversidad de estructuras y a su elevada selectividad. Entre las variadas aplicaciones encontramos antihipertensivos o cardiotónicos efectivos a concentraciones del orden micromolar (milrinona, vesnarinona) (Beavo, 1995a; Smith et al., 1997; Gouault et al., 2004; Adachi et al., 2005) antitrombóticos (cilostazol) (Nishi et al., 2000; Kambayashi et al., 2003). Numerosos estudios han destacado que fármacos desarrollados como antiagregantes plaquetarios realizan su función vía GMPc y este efecto está mediado en parte por la inhibición de la PDE3. Debido al hecho que tanto el AMPc como el GMPc inhiben la agregación de plaquetas, se ha especulado sobre la utilización conjunta de inhibidores de fosfodiesterasas (independientemente de su sustrato) como antiagregantes plaquetarios (Sudo et al., 2000). Estudios recientes en ratas a las que se les produjo una isquemia y fueron tratadas con cilostazol mostraron una disminución del área de infarto cerebral, proponiendo este inhibidor como posible agente terapéutico contra el daño local de la isquemia cerebral (Hong et al., 2006).

También se ha descrito que inhibidores de la PDE3, además de inhibidores de la PDE4 y la PDE5, podrían utilizarse como tratamiento de enfermedades renales crónicas (Cheng and Grande, 2007).

4.7. PDE4 (específica de AMPc y sensible a rolipram)

La familia PDE4 está representada por cuatro genes (PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D) que producen una gran variedad de isoformas que pueden ser solubles o estar asociadas a la membrana (Houslay and Adams, 2003). Los cuatro genes se expresan específicamente en determinados tipos celulares, y presentan diferencias en su actividad, distribución intracelular y regulación.

Esta familia se caracteriza por mostrar una elevada afinidad por el AMPc (K_m 1-3 μ M), y una muy baja o nula afinidad tanto por calmodulina como por el GMPc, pudiendo ser considerada insensible a estas moléculas (Beavo and Reifsnyder, 1990; Beavo et al., 1994; Francis et al., 2002b). Sin embargo, todas las isoformas de esta familia son inhibidas selectivamente por rolipram y sus derivados. El potente efecto farmacológico de estos inhibidores, tanto en sistemas celulares como fisiológicos, demuestra la importancia de estos enzimas dentro de la célula (Houslay, 2001).

A principio de los años 80 se realizaron estudios de purificación de enzimas de fosfodiesterasas específicas de AMPc, insensibles a calcio e inhibidos por rolipram (Marchmont and Houslay, 1980; Marchmont et al., 1981), pero, por problemas metodológicos, su identificación y caracterización como enzimas con actividad PDE4 se retrasó hasta finales de esa década, cuando estudios realizados en corazón por cromatografía de intercambio iónico, permitieron identificar un pico cromatográfico de actividad PDE que era específica para el AMPc e inhibible por rolipram (Reeves et al., 1987).

Posteriormente, gracias al avance de las técnicas moleculares, se clonaron los cuatro genes pertenecientes a la familia de la PDE4. El cribaje de una librería de ADNc en cerebro de rata con el gen *dunce* (de una PDE de *Drosophila melanogaster*), permitió identificar el gen RD1 (actualmente PDE4A1) (Davis et al., 1989). Paralelamente se demostró la existencia de diferentes isoenzimas de la PDE4, generados a partir de varios genes y con una elevada complejidad debida al *splicing* diferencial de sus ARNm (Swinnen et al., 1989a). Ya en los 90, se aislaron los cuatro genes que forman la familia PDE4 en humanos y sus correspondientes en roedores, estando todos ellos directamente relacionados con el gen *dunce* de *Drosophila melanogaster* (Bolger et al., 1993).

El descubrimiento de este gen de la mosca del vinagre fue un gran avance dentro de la neurobiología, puesto que fue el primer gen identificado dentro de un organismo que estaba directamente implicado en conducta. (Dudai et al., 1976). Mutaciones de este gen daban lugar a moscas deficientes en aprendizaje y memoria, de ahí el nombre (Davis, 1996). Estudios bioquímicos de extractos de cerebro procedentes de estas moscas mutadas demostraban una deficiencia en la actividad PDE dependiente del AMPc, que presentaba además especificidad de sustrato y propiedades cinéticas similares a las encontradas para las PDE específicas del AMPc de mamíferos (Byers et al., 1981), pero, a causa de la disparidad entre los dominios catalíticos, no era susceptible de ser inhibida por rolipram ni por sus análogos (Bolger et al., 1993). Diversos estudios han demostrado gran homología funcional entre las isoenzimas de

la PDE4 de mamífero y de *Drosophila*. Ejemplo de esto es el hecho de que la expresión del ARNm de la PDE4 de rata en *Drosophila* es capaz de recuperar la deficiencia en memoria y aprendizaje producida por la mutación del gen *dunce* de *D. melanogaster* (Dauwalder and Davis, 1995).

Como se acaba de mencionar, la familia PDE4 está formada por cuatro genes tanto en rata (Davis et al., 1989; Swinnen et al., 1989a) como en humano (Bolger et al., 1993). Cada uno de estos genes se ha clonado a partir de distintas librerías de ADNc humanas. Así, el ADNc de la PDE4A fue aislado a partir de monocitos (Livi et al., 1990); el de la PDE4B de corteza frontal (McLaughlin et al., 1993b); el de la PDE4C de sustancia negra (Engels et al., 1995b); y el de la PDE4D de corazón (Baecker et al., 1994). A partir de estos cuatro genes se han podido clonar múltiples variantes de *splicing* de cada uno de ellos, conservados entre distintas especies (Bolger et al., 1997). Los genes de la PDE4 en humanos se encuentran distribuidos en tres cromosomas distintos: la PDE4A se localiza en el cromosoma 19p13.1 (Horton et al., 1995; Sullivan et al., 1998); la PDE4B en el 1q31 (Milatovich et al., 1994; Szpirer et al., 1995); la PDE4C en el 19p13.1 (Sullivan et al., 1999); y la PDE4D en el 5q12 (Szpirer et al., 1995).

4.7.1. Estructura

La secuencia de aminoácidos de los isoenzimas de la PDE4 está muy conservada y dividida en distintos dominios (Beavo and Reifsnyder, 1990; Bolger et al., 1993) que conforman una estructura modular común a todas ellas. Esta estructura se basa en una región reguladora en el extremo amino (formada por dos regiones conocidas como UCR1 y UCR2 (*upstream conserved regions*)) y un dominio catalítico en el extremo carboxilo.

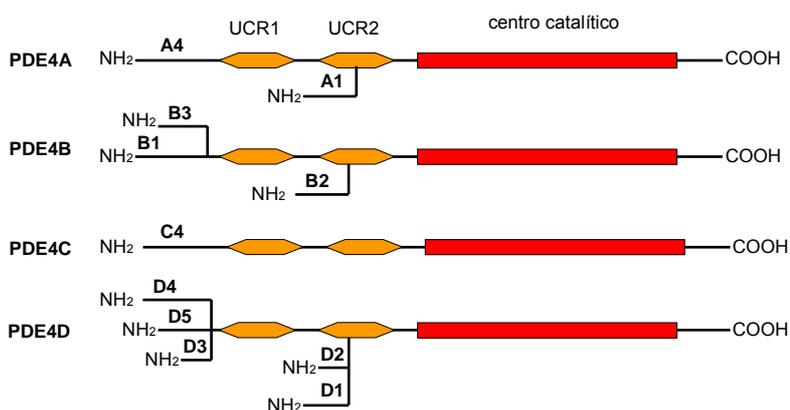


Figura 1.6. Esquema de la estructura de los isoenzimas de la familia PDE4 (modificado de Souness et al 2000)

Los dominios reguladores UCR están formados por secuencias muy conservadas de 60 aminoácidos para UCR1 y de 80 para UCR2 (Bolger et al., 1993; Bolger et al., 1994) y están unidos por una secuencia de unión LR1 (*linker region*) de 33 aminoácidos. La secuencia del extremo amino se genera por *splicing* alternativo dando lugar a una región reguladora con una secuencia exclusiva para cada isoforma. Esta región parece estar involucrada en la señalización intracelular ya que es a través de

esta región que las PDEs pueden interactuar con dominios de otras proteínas (ver Tabla 1.4.).

Tabla 1.4. Proteínas que interactúan con diferentes miembros de la familia PDE4 (McPhee et al., 1999; Beard et al., 1999; Yarwood et al., 1999b; Tasken et al., 2001; Dodge et al., 2001; Houslay et al., 2005)

Nombre proteína	Isoforma PDE4	Tipo interacción	Inhibición por rolipram
Proteína con dominios SH3 (familia de tirosina quinasas Src)	PDE4A4, PDE4D4	PDE4A5, PDE4A interacción débil con SH3 vía LR2	↑ sensibilidad PDE4A
RAK1	PDE5D5	Por región N-terminal	↓ sensibilidad
<i>Myomegalin</i>	PDE4D3	Por UCR2. Todas las isoformas pueden interactuar	Desconocido
β-arrestina	PDE4D5; PDE4	todas las Por dominio catalítico. PDE4D5 también por N-terminal	= sensibilidad
mAKAP	PDE4D3	Por N-terminal. Si PKA fosforila Ser13, ↑ interacción	Desconocido
AKAP450	PDE4D3	N-terminal	Desconocido
XAP (AIP, ARA9)	PDE4A4, PDE4A5	N-terminal y UCR2	↑ sensibilidad

Aunque las PDEs no sólo interactúan con proteínas, también se ha encontrado que lo hacen con lípidos, como es el caso de PDE4A1 a través del dominio TAPAS-1 (Baillie et al., 2002) (ver apartado 4.7.3. PDE4A).

Si bien las secuencias UCR se encuentran sólo en la familia PDE4, no todas sus isoformas contienen estos dos módulos reguladores. Así pues, en función de la presencia o no de UCRs podremos clasificarlas en: (1) isoformas largas, cuando presentan ambos dominios altamente conservados; (2) isoformas cortas, si carecen del dominio UCR1 (Bolger et al., 1993); y (3) isoformas supercortas, que sólo contienen el dominio UCR2 truncado (Sullivan et al., 1999) (Figura 1.7).

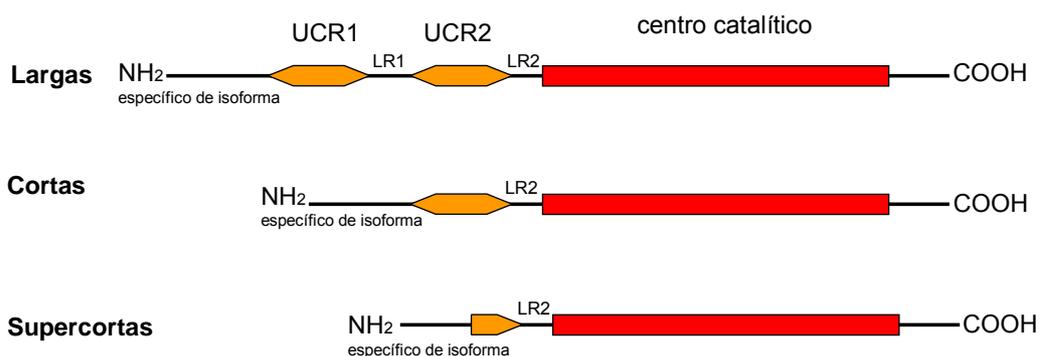


Figura. 1.7. Representación esquemática de las isoformas largas, cortas y supercortas de la familia de PDE4 (modificado de Houslay et al. 2003).

Estas secuencias ejercen un papel regulador sobre la unidad catalítica, de manera que las isoformas largas, cortas o supercortas tienen diferentes propiedades reguladoras. La eliminación de la región UCR2 resulta en un aumento de la actividad PDE4 (Jin et al., 1992), sugiriendo que UCR2 tiene un efecto de inhibición constitutiva. Con estudios de doble híbrido en levadura, se demostró que la región hidrofóbica carboxilo de UCR1

interacciona con la región hidrofílica amino de UCR2 (Beard et al., 2000). Se cree que dicha interacción provoca un cambio conformacional en el centro catalítico de las PDE, modificando así sus propiedades de regulación (Houslay, 2001). Todas las isoformas largas contienen un sitio de fosforilación por la PKA en UCR1, cuya fosforilación provoca un cambio conformacional que afecta a la interacción inhibitoria de UCR2 sobre el dominio catalítico, provocando así un aumento de la actividad PDE. De hecho existen anticuerpos que unen UCR2 que también activan la PDE4D3 (Lim et al., 1999), probablemente por el bloqueo de la asociación de UCR2 con el dominio catalítico.

En la mitad carboxilo de la proteína se sitúa el dominio catalítico, formado por unos 380 aminoácidos cuya secuencia está muy conservada en todas las PDE (30-40% similaridad) (Charbonneau et al., 1990). Este dominio está unido a UCR2 por una secuencia de unos 28 aminoácidos, el LR2, que junto con el LR1 (que como hemos mencionado une UCR1 y UCR2) presentan un grado de homología muy bajo entre los diferentes enzimas de la familia PDE4 y confieren una funcionalidad específica al gen (Houslay et al., 1998). En este dominio se localiza el sitio de unión con el sustrato fisiológico de las PDE4, el AMPc, sitio con el que inhibidores, como rolipram, con características similares al nucleótido, también interaccionan (Houslay et al., 1998). Por mutagénesis dirigidas se determinó la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico (Jin et al., 1992; Jacobitz et al., 1996; Jacobitz et al., 1997), y se demostró que mutaciones puntuales dentro de este dominio provocaban la pérdida de actividad del enzima. También se describieron en esta región residuos de histidina muy conservados, fundamentales para la unión de cationes divalentes (Mg^{2+}), y que son esenciales para la actividad catalítica de la PDE4 (Wilson et al., 1994), y del resto de fosfodiesterasas (Omburo et al., 1998). Posteriormente, mediante estudios de cristalografía se determinó la estructura tridimensional del dominio catalítico. La primera estructura publicada fue la del dominio catalítico de la PDE4B2 (Xu et al., 2000), que consta de 17 hélices α que conforman tres subdominios y se identificó como un gran espacio hueco (Lynch et al., 2006). Posteriormente se determinó la estructura catalítica de la PDE4D y se vió que unía zardaverina, inhibidor de la PDE4, en la región hidrofóbica de esta cavidad. Inhibidores más selectivos como rolipram, cilomilast y roflumilast tienen grupos funcionales adicionales que se unen a una región más amplia, además de al hueco con actividad catalítica, aumentando así la selectividad y la fuerza de unión (Lee et al., 2002).

Huai y colaboradores (2003) evidenciaron la importancia de los residuos del dominio catalítico, las moléculas de agua y los iones metálicos como factores clave en la hidrólisis del AMPc. Todos estos estudios han permitido avanzar en el conocimiento de la estructura de la familia PDE4 y atribuir sus propiedades funcionales y su especificidad a las diferentes regiones descritas (extremo amino de las diferentes variantes de *splicing*, dominios reguladores UCR1 y UCR2, dominio catalítico y al extremo carboxilo específico de cada isoforma).

4.7.2. Regulación

La gran variedad estructural que presenta esta familia permite hablar de distintas formas de regulación de sus miembros dependiendo de la presencia o ausencia de

dominios UCR1 y UCR2 que, como hemos visto, son los responsables de mediar la activación y/o funcionalidad del dominio catalítico.

La regulación de las isoformas cortas (carentes de UCR1), como la PDE4D1 y la PDE4D2, se realiza a nivel de su transcripción (Swinnen et al., 1989b). Se observó que un incremento de los niveles de AMPc producía un aumento de la transcripción de la PDE3.1 (conocida más tarde como la PDE4D1) en células de Sertoli de rata. Este mecanismo de activación fue atribuido a la existencia de promotores controlados por el AMPc (Vicini and Conti, 1997). Como hemos comentado anteriormente estos promotores contienen secuencias CRE y por lo tanto serán regulados por el AMPc y proteínas que unen estas secuencias. Otro ejemplo de este mecanismo lo encontramos en la activación de la PDE4B2 en neuronas corticales que requieren CREB y AMPc para estimular la expresión de su ARNm, ya que se había demostrado que mutantes negativos de CREB, inhibían la actividad del promotor, mientras que una forma de CREB constitutivamente activa lo estimulaba (D'Sa et al., 2002).

Algunas de las isoformas cortas también pueden ser activadas por fosforilación, como es el caso de la PDE4B2 que, formando un complejo con la cadena ϵ de CD3 se asocia al receptor de linfocitos T (TCR, *T cell receptor*) para ser fosforilada posteriormente en el residuo de Tyr523 aumentando así su actividad y regulando los niveles de AMPc (Baroja et al., 1999).

Otro mecanismo de regulación es la fosforilación en el dominio UCR1 de las isoformas largas por parte de varios biorreguladores como la PKA, el ácido fosfatídico, las ERK-MAP cinasas (*extracellular signal regulated kinasa-mitogen activated protein kinasa*) o la fosfatidilinositol-3 cinasa (IP-3 quinasa).

Fosforilación por la PKA

Este tipo de fosforilación se describió por primera vez para la PDE4D3. Este enzima tiene dos sitios de fosforilación por la PKA, la Ser13 en la región amino-terminal y la Ser54 en UCR1, siendo esta última necesaria para su activación (Sette et al., 1994; Alvarez et al., 1995; Sette and Conti, 1996; Hoffmann et al., 1998b). Todas las isoformas largas de la familia PDE4 contienen un sitio de fosforilación por la PKA en UCR1, cuya fosforilación estimula la actividad enzimática PDE (MacKenzie et al., 2002).

Contiguo a la Ser54 de UCR1 hay un residuo de glutamato (Glu53), muy conservado en las distintas isoformas de PDE4, que parece ser inhibidor de la fosforilación, puesto que de la mutación Glu53→Ala en la PDE4D3 resulta una isoforma que se fosforila por la PKA más rápidamente (Hoffmann et al., 1998b). Parece ser que Glu53 provoca una unión iónica, llevando la PDE a un estado de baja actividad, y la fosforilación por la PKA de la Ser54 o bien la mutación del Glu53 permitiría la activación de la PDE. También se cree que esta fosforilación de UCR1 influye en la interacción electrostática entre UCR1 y UCR2, y por lo tanto en la interacción y la regulación del dominio catalítico, tanto a nivel estructural como funcional (Houslay et al., 1998; Beard et al., 2000). Existen diversos modelos de esta interacción en los que se considera que UCR1 es un dominio regulador y UCR2 inhibidor (Kovala et al., 1997). También se ha

sugerido que la interacción UCR1/UCR2 intervendría en la dimerización de la PDE4D3. Esta dimerización de la PDE4D3 es crítica para la fosforilación por la PKA (Richter and Conti, 2002; Richter and Conti, 2004) y para la unión del ácido fosfatídico (comentada en el siguiente subapartado), dos eventos que se dan en diferentes sitios de UCR, y que son cruciales para la estabilización y la transducción de la actividad hidrolítica de las PDE4 dentro de la célula. Diversos autores postulan que la interacción de UCR1/UCR2 se da en situación basal, y que modificaciones en las PDE4 inhiben esta interacción permitiendo así la dimerización (Lynch et al., 2006).

La fosforilación por la PKA de la PDE4D3 aumenta su sensibilidad a ser inhibida por rolipram, aunque parece que no ocurre lo mismo con otras isoformas (Hoffmann et al., 1998b; MacKenzie et al., 2002).

Esta fosforilación por la PKA de las PDE4 y su consiguiente activación es importante en la regulación rápida de los niveles del AMPc en respuesta a estímulos determinados en diversos tipos celulares. Ejemplo de esto es la estimulación de células FRTL-5 (*Fischer rat thyroid cells*) de tiroides con tirotrópina (TSH), que, provocando un aumento de los niveles intracelulares del AMPc, activa la PKA y ésta a su vez la PDE4D3, atenuando así el incremento del AMPc (Sette et al., 1994; Oki et al., 2000). Otro ejemplo lo encontramos en la estimulación por isoproterenol en células de la musculatura lisa en las que la PKA regula los niveles de AMPc mediante la fosforilación de la PDE4 (Murthy et al., 2002), o bien activación de la PKA, que fosforila las isoformas de la PDE4D que conlleva la regulación de la difusión del AMPc en las células del epitelio respiratorio expuestas a adenosina (Barnes et al., 2005).

Fosforilación por ácido fosfatídico

El ácido fosfatídico (PA) es un importante mediador de la señal intracelular. Se genera como resultado del estímulo de las vías de señalización lipídica, y sus niveles intracelulares se ven también incrementados tras la activación de determinadas células inflamatorias. Poco se conoce sobre cómo el PA interacciona específicamente con proteínas de señalización, pero diversos estudios mostraron un aumento de la actividad enzimática de la PDE4 tras la administración de PA, así pues se ha postulado que el PA puede actuar como mediador de la regulación de la actividad de las isoformas de la familia PDE4 (Marcoz et al., 1993; El Bawab et al., 1997; Nemoz et al., 1997). Un comportamiento de activación similar también se observó utilizando fosfatidilserina (PS) (fosfolípido ácido) pero no así con fosfolípidos neutros, por esto se pensó que la estimulación por PA y PS podría ser una estimulación mediada por carga. De hecho, UCR1 es una estructura anfipática con una carga neta positiva que la hace ideal para interactuar con PA/PS (Houslay and Adams, 2003). Los estudios sobre la acción del PA sobre las PDE4 se han centrado en la isoforma PDE4D3; y han demostrado que sólo las formas largas de la familia PDE4 son sensibles a la activación por PA, debido a la interacción del PA con el dominio UCR1, ya que la eliminación de parte del UCR1 de la PDE4D3 imposibilita la activación de este enzima por el PA. El PA provoca un cambio conformacional similar al que se observa con la fosforilación por la PKA (Houslay et al., 1998). Se ha destacado el papel de la PDE4D3 en la miogénesis gracias a su activación por el PA (Naro et al., 1999) y el de la PDE4

en la disminución del AMPc necesario para que se dé la mitogénesis de las células T de rata gracias a la intervención del PA (Marcoz et al., 1993).

Fosforilación por ERK-MAP cinasas

La vía de señalización de las proteínas ERK-MAP cinasas, reguladas por mitógeno y asociadas a señales extracelulares como factores de crecimiento y hormonas, está involucrada en numerosos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, desarrollo y supervivencia celular (Blumer and Johnson, 1994; Cano and Mahadevan, 1995; Lewis et al., 1998; Dumaz and Marais, 2005; Lynch et al., 2006) es decir, en el destino celular. Esta vía de señalización comienza por la activación de Ras (proteína pequeña de unión a GTP) que, al intercambiar GDP por GTP, forma un complejo GTP-Ras que activa Raf (que es una MAPKKK, *mitogen activated protein kinase kinase kinase*). Una vez Raf está activada, ésta fosforila y activa a MEK1 o MEK2 (MAPKK), que finalmente fosforila y activa ERK1 y ERK2 (MAPK). Dentro de esta secuencia de fosforilaciones, la duración e intensidad de la actividad de estas últimas (Pouyssegur and Lenormand, 2003), ERK1 y ERK2, tiene un papel importante en la determinación del destino celular, puesto que las isoformas de éstas son específicas para múltiples sustratos que constituyen el punto final de esta cascada de fosforilaciones (Houslay and Kolch, 2000). Un ejemplo de la importancia de la duración e intensidad de estas MAPKs lo encontramos en los precursores neuronales, en los que una señalización de ERK fugaz estimula proliferación, mientras que un mantenimiento en el tiempo de la señal de ERK induce diferenciación de estas células (Dumaz and Marais, 2005).

Entre los múltiples sustratos que es capaz de fosforilar ERK encontramos las PDE, siendo también la isoforma larga PDE4D3 la primera descrita como sustrato de la ERK2 MAP cinasa (Hoffmann et al., 1999; MacKenzie et al., 2000). La fosforilación de la PDE4D3 por parte de la ERK2 tiene lugar en la Ser579, que forma parte de una secuencia consenso (Pro-Xaa-(Ser/Thr)-Pro) localizada en el dominio catalítico de la isoforma (MacKenzie et al., 2000). La fosforilación de esta Ser provoca una disminución en la velocidad de hidrólisis del AMPc (Hoffmann et al., 1999), comparada con el aumento de actividad catalítica cuando es fosforilada por la PKA (Hoffmann et al., 1998b). Esta disminución de la velocidad de hidrólisis mediada por la fosforilación por ERK, también se ha observado en otras isoformas largas de la PDE4D, la PDE4B y la PDE4C. Por el contrario, la PDE4A, al no contener esta secuencia consenso en su dominio catalítico, no es fosforilada ni, por consiguiente, inhibida por la ERK2 (Hoffmann et al., 1999; MacKenzie et al., 2000).

En estudios realizados en cultivos celulares se ha observado el cambio producido en la actividad catalítica de la PDE4 como resultado de la fosforilación por ERK y su mecanismo regulador. Estos estudios muestran que la inhibición de la PDE4D3 mediada por la fosforilación de ERK, va seguida de un aumento de los niveles intracelulares del AMPc, y de una activación de la PKA con su consecuente activación de la PDE4D3 por fosforilación. Es decir, analizando la actividad catalítica de esta isoforma se observa una primera disminución que precede a un rápido y pronunciado incremento en la actividad catalítica de la PDE4D3 (Hoffmann et al., 1999; MacKenzie et al., 2000). Para el resto de isoformas largas de la PDE4B, la PDE4C y la PDE4D se

ha observado el mismo comportamiento. Así pues, las isoformas largas de la familia PDE4 parecen estar reguladas por la interconexión de las vías de fosforilación de ERK y de PKA (Houslay, 2001). Sin embargo sería necesario conocer la localización subcelular de estas isoformas para determinar el efecto neto producido por ambas fosforilaciones.

Ya hemos comentado anteriormente que las isoformas cortas de la PDE4, como por ejemplo la PDE4B2 y la PDE4D1, no pueden ser fosforiladas por la PKA por carecer de la región UCR1. Sin embargo, éstas son susceptibles de ser fosforiladas por la ERK ya que contienen el dominio UCR2 completo (MacKenzie et al., 2000; Baillie et al., 2000). Parece ser que la presencia o ausencia de las regiones UCR1 o UCR2, concretamente las interacciones entre ellas, determinan los efectos mediados por las fosforilaciones por ERK2 y PKA sobre PDE4. Se cree que el complejo UCR1-UCR2 constituido en las isoformas largas modula la inhibición por ERK, mientras que en las cortas, la región UCR2 libre revierte la inhibición producida por la fosforilación por ERK resultando una activación del enzima. Este cambio de funcionalidad parece estar mediado por el extremo amino de UCR2, ya que la falta de éste, como ocurre en las isoformas supercortas como la PDE4D2, impide su activación por la ERK2 (Houslay, 2001). Beard y colaboradores (2000) han descrito un modelo en el que se considera responsable de la regulación diferencial por ERK2 al extremo amino de UCR2. En este modelo, el UCR2 de las isoformas cortas interacciona con el dominio catalítico del enzima, probablemente tras ser fosforilado por la ERK2, dando lugar a una estimulación del enzima. Sin embargo, UCR2 está unido a UCR1 en las isoformas largas, así que no puede interaccionar con el dominio catalítico, y por lo tanto hay inhibición de la actividad.

En cuanto a las subunidades supercortas, algunos autores dicen que no hay efectos sobre la actividad al ser fosforiladas por ERK (Houslay 2001) y otros comentan que esta fosforilación provoca una suave inhibición de esta actividad (Lynch 2005, via Hoffmann 1999, Mackenzie 2000).

Esta regulación diferencial por parte de la ERK sobre los diferentes tipos de isoenzimas de la PDE4A/B/D (largas, cortas o supercortas) provoca cambios muy diferentes en la regulación de los niveles de AMPc. Así pues, el acoplamiento positivo o negativo entre las vías del AMPc y de ERK, en base a la degradación del AMPc por las PDE, estará regulado por la proporción entre las distintas isoformas, largas y cortas, de que disponga la célula (Baillie et al., 2000).

Fosforilación por IP-3 cinasa

La actividad de ciertos isoenzimas de la familia PDE4 ha resultado de gran interés en el control de la respuesta frente a agentes inflamatorios como interferón gamma (IFN- γ) y lipopolisacárido (LPS), ya que estos mediadores proinflamatorios son capaces de provocar un incremento de la actividad PDE4 en determinados tipos celulares (Ma et al., 1999; Jin et al., 2005a). De hecho, se ha observado que el LPS y el IFN- γ son capaces de inducir un aumento rápido de la actividad de la PDE4A4 en líneas celulares de monocitos (U937), aunque esta activación es inhibida por wortmannin, un

inhibidor de la IP-3 cinasa, y por el agente inmunosupresivo rapamycin, sugiriendo así que la PDE4A4 es activada por IP-3 cinasa (Scott and Lawrence, 1998).

La isoforma PDE4A5 de roedor, homóloga a la PDE4A4 humana, también puede ser activada por la IP-3 cinasa, tal y como se determinó en una línea celular de adipocitos estimulada con hormona de crecimiento (MacKenzie et al., 1998). El efecto producido por la activación de la PDE4A5 es inhibible también por inhibidores de la IP-3 cinasa y por el agente inmunosupresor rapamycin. Posteriormente se ha determinado que un estímulo hormonal produce el incremento del AMPc intracelular capaz de activar una cascada de cinasas en las que se encuentran implicadas las cinasas JAK (*Janus Kinases*), p70S6 e IP-3 (Yarwood et al., 1999a), activando así a la PDE4A5 la cual contribuye a la diferenciación celular de estos adipocitos. No obstante, esta contribución es tan sólo una pequeña parte del total de actividad llevada a cabo por el resto de las PDE, demostrando así que determinadas isoformas de fosfodiesterasas presentan una compartimentalización celular que les permite participar en la regulación de distintos procesos celulares.

4.7.3. Compartimentalización intracelular

Tal y como ya se ha comentado, existe un gran número de moléculas que interaccionan con la PDE4. Algunas de estas moléculas son, en parte, responsables de la localización intracelular de los miembros de esta familia.

Entre los diferentes miembros de la familia PDE4 se han identificado diferencias en el extremo amino responsables de la localización intracelular de cada isoforma (Shakur et al., 1993).

PDE4A

Los primeros estudios que se realizaron para ver el papel de la localización de las PDE fueron con la PDE4A1, que es un enzima asociado exclusivamente a la membrana. La supresión de la región amino de esta isoforma produce una proteína soluble totalmente activa (Shakur et al., 1993; Scotland et al., 1998). Estos estudios sugieren que el papel principal del extremo N-terminal de las PDE es la localización intracelular de estos enzimas. Por otro lado, se ha visto que este mecanismo de asociación a la membrana no es por translocación e inserción en ésta, ya que mutaciones en el extremo amino de la PDE4A1 presentan la misma capacidad de unión a membrana (Smith et al., 1996). Además, estudios con quelantes como el EDTA no liberan este isoenzima de su asociación a la membrana, en cambio el uso de detergentes no iónicos, como Tritón X-100, sí que son capaces de liberar la PDE4A1. Estos estudios sugieren que la unión a membrana es debida a interacciones hidrofóbicas entre el extremo amino de la PDE4A1 y la bicapa lipídica (Houslay, 2001). De hecho se ha descubierto un dominio conservado conocido como TAPAS-1 en la PDE4A1, que, uniéndose preferentemente al PA, dirige la inserción de la proteína en la bicapa lipídica mediada por un aumento de iones de Ca^{2+} (Baillie et al., 2002).

Es muy probable que la PDE4A1 y otras PDE4 largas (como la PDE4A4 y la PDE4A5) formen complejos señalizadores a través de diferentes dominios de señalización,

puesto que contienen varias regiones conservadas (Pro-Xaa-Xaa-Pro-Xaa-Xaa-Arg) que unen dominios SH3 de ciertas proteínas. La PDE4A4 une preferentemente dominios de la familia Src de tirosina cinasa a través de una interacción dinámica entre la región amino y la LR2, lo que provoca un cambio conformacional en su dominio catalítico que la hace más sensible a rolipram (O'Connell et al., 1996). La PDE4A5 y, tal y como veremos más adelante, la PDE4D4 también interaccionan con estos dominios. El dominio regulador de la PDE4A5 presenta además una secuencia que es reconocida por la caspasa-3, enzima inductor de apoptosis. La sobreexpresión de esta isoforma en células cromafines PC-12 y fibroblastos RAT-1 de rata las protege contra agentes inductores de apoptosis como la *staurosporine* (Huston et al., 2000). Algunos autores sugieren que la interacción PDE-caspasa3 es importante en la muerte celular y la homeostasis durante el desarrollo del cerebro y del sistema nervioso central (Porter and Janicke, 1999; Cellerino et al., 2000). La PDE4A5 es capaz de interaccionar selectivamente también con la immunofilina XAP2 (Bolger et al., 2003), que forma parte un grupo de proteínas diana de fármacos inmunosupresores como la ciclosporina y la rapamicina. El hecho de que la unión PDE-XAP2 inhiba la fosforilación por la PKA, sugiere que esta unión produce un cambio en la estructura terciaria de la PDE, interfiriendo en la interacción de sus dominios UCRs y, por consiguiente, disminuyendo así su actividad (Bolger et al., 2003). Esta isoforma, la PDE4A5, es capaz de localizarse perinuclearmente en células COS-7, posiblemente por la unión de su UCR2 a *myomegalin* (Verde et al., 2001).

También se ha observado en cultivos celulares, que ciertos inhibidores selectivos de la PDE4 no afectan solamente la actividad catalítica de la PDE4A4, si no que también mediante el cambio conformacional de ésta provocan su redistribución en la célula (Terry et al., 2003).

PDE4B

Se ha determinado la existencia de esta isoforma tanto en la fracción citosólica como en la particulada del cerebro de roedor mediante estudios inmunológicos por análisis Western (Lobban et al., 1994). Estudios de expresión realizados en células COS-7 han corroborado que la localización de las isoformas largas, la PDE4B1 y la PDE4B3, y la isoforma corta PDE4B2 se da tanto en la fracción citosólica como en la no citosólica (Huston et al., 1997), sin embargo, la isoforma larga PDE4B4, que consta de 17 aminoácidos más en la región N-terminal, se distribuye únicamente en el citosol (Shepherd et al., 2003).

Se ha visto que la isoforma corta PDE4B2 puede unirse a la cadena de CD3 ϵ del receptor de linfocitos T donde se activará al ser fosforilada en el residuo Tyr523 (Baroja et al., 1999) o ser reclutada cerca del CD28 de estos linfocitos mediante su interacción con β -arrestina (Baillie and Houslay, 2005; Tasken and Stokka, 2006), y parece estar involucrada en la regulación de la respuesta de estas células inflamatorias (punto ampliado en el apartado 4.7.7.1).

PDE4C

No existen evidencias claras que puedan determinar la localización intracelular de la PDE4C, ni si está presente mayoritariamente en la fracción citosólica o en la membrana. Esta falta de información podría deberse a la pobre expresión de este isoenzima en la gran variedad de tejidos analizados (Houslay 1998).

Pocos trabajos se han realizado para estudiar la localización intracelular de la PDE4C, pero existe un trabajo en que encuentran que la isoforma PDE4C2 (y la PDE4D3) está ligada a AKAP450 y se localiza en el área centrosomal de las células COS-1 (McCahill et al., 2005). En este trabajo utilizaron la técnica de dominantes negativos, que consistía en sobreexpresar la isoforma a estudiar con una mutación en el centro catalítico que la incapacitase para hidrolizar el AMPc. Como resultado la isoforma mutada (inactiva) sobreexpresada desplazaba a la isoforma endógena (activa) y provocaba un aumento de los niveles de AMPc en la zona que activaban la PKA y ésta hiperfosforilaba la PDE. Se vió que en este caso se activaba la PKA-II y no la PKA-I, proponiendo la existencia del complejo de señalización AKAP450/PKA-II/PDE4C2.

PDE4D

Inicialmente se hicieron experimentos en células COS-7 de mono en las que se expresaba de forma transitoria las cinco variantes de *splicing* humanas de la PDE4D (HSPDE4D1-5) (Bolger et al., 1997). De ellos se reveló que la HSPDE4D1 y la HSPDE4D2 eran isoformas citosólicas, mientras que el resto se encontraban tanto en la fracción citosólica como en la particulada. Las formas largas responden de manera diferente a los tratamientos con diferentes detergentes utilizados para la solubilización de su fracción no citosólica (Houslay et al., 1998).

Las diferencias en el extremo amino entre sus 5 variantes son responsables de su asociación a distintas estructuras subcelulares. Estudios de doble híbrido realizados con la PDE4D3 han identificado una proteína de anclaje, la *myomegalin*, cuyo extremo carboxilo interacciona con la porción amino de UCR2 de la PDE y que localiza la isoforma en la región perinuclear en Golgi/centrosomal de células de tejido humano y en la región del sarcómero en células de musculatura estriada (Verde et al., 2001). Tal y como ya hemos apuntado en el apartado anterior, la PDE4D3 también interacciona con AKAP450 por la región UCR2 (Tasken et al., 2001; McCahill et al., 2005). Este isoenzima se ha visto además asociado al complejo de señalización formado por mAKAP/PKA/Epac1/ERK5 en la musculatura cardíaca (cardiomiocitos) donde la PDE4D3 hace de adaptador manteniendo ligadas Epac1 y ERK5 a mAKAP y a la vez se encarga de devolver los niveles de AMPc a estado basal, para regular el módulo de señalización de mAKAP (Dodge et al., 2001; Dodge-Kafka et al., 2005).

La isoforma PDE4D5 es capaz de interactuar con el receptor de la cinasa C activada (RACK1, en inglés *receptor for activated c-kinase*), que es una proteína de anclaje con una homología relativamente alta con la subunidad β de la proteína G (G_{β}) y es capaz de interactuar y activar a PKC (Ron et al., 1994; Mochly-Rosen et al., 1995). Se cree que esta interacción es importante en procesos de señalización (Steele et al., 2001; McCahill et al., 2002), debido a la capacidad de RACK1 de interactuar con Ras-GAP, Src tirosina cinasa, Dynamin-1, la subunidad β de las integrinas, $G_{\beta\gamma}$ y en la

señalización por adenilato ciclasas (Chang et al., 1998; Lilliental and Chang, 1998; Chang et al., 2002; Chen et al., 2004; Chen et al., 2005).

Como ya se ha comentado, las arrestinas son un grupo de proteínas de anclaje que se translocan del citosol hacia los GPCRs e inician el proceso de desensibilización de la señal comenzada por el receptor (Baillie and Houslay, 2005). Un buen ejemplo de esto lo tenemos en la activación de β_2 -AR (Figura 1.8.), en el que la β -arrestina recluta PDE4D5 hacia el complejo del receptor adrenérgico, donde al disminuir la concentración de AMPc inactiva PKA bloqueándose la vía Gi/ERK, y por lo tanto el efecto de la activación de este sistema.

En este apartado citamos una serie de ejemplos con los que podemos llegar a la conclusión de que la localización de la actividad de PDE explica la señalización compartimentalizada de AMPc por la formación de gradientes de AMPc en la célula que serán descifrados ("read") a continuación por moléculas PKA unidas a AKAP (Houslay and Adams, 2003).

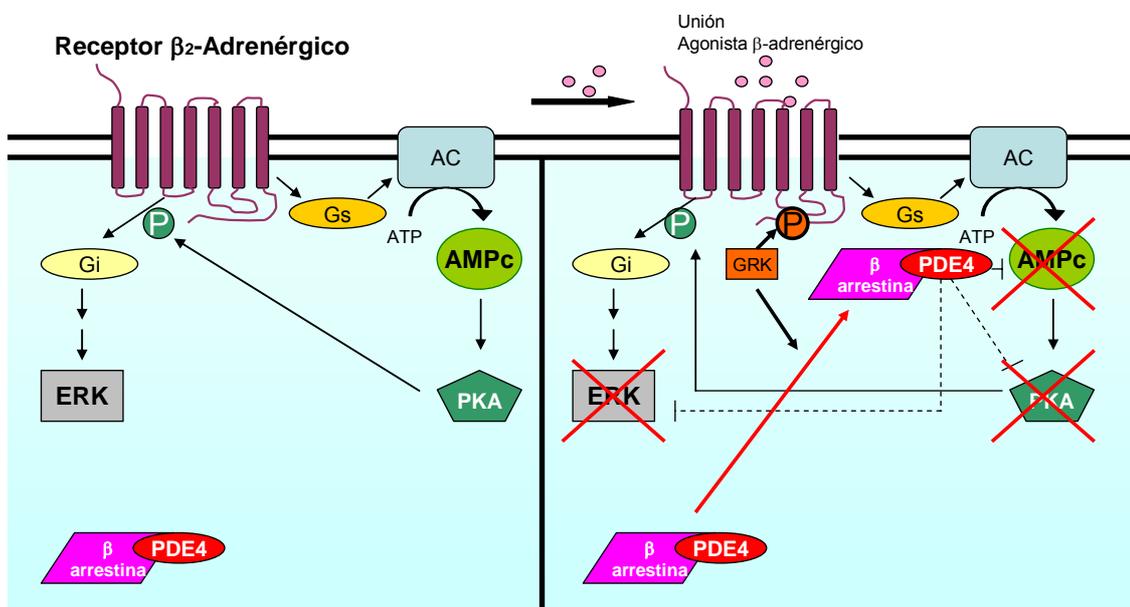


Figura.1.8. Esquema de la desensibilización del receptor β_2 -Adrenérgico (modificado de Baillie 2005)

4.7.4. Distribución tisular

Nuestro grupo ha publicado varios trabajos en los que, por hibridación *in situ*, se ha estudiado la distribución de los ARNm de los cuatro isoenzimas de la familia PDE4 en cerebros de rata, mono y humano (Pérez-Torres et al., 2000) y de las variantes de *splicing* de la isoforma PDE4D (Miró et al., 2002b). Existe un patrón de expresión diferencial entre las cuatro isoformas a nivel regional y celular en estas tres especies. La amplia localización neuroanatómica de los mensajeros de la PDE4A, la PDE4B y la PDE4D en las tres especies coincide en la mayoría de las regiones y se diferencia en otras. Por ejemplo, la PDE4A se expresa en varios núcleos del tronco encefálico de rata mientras que sólo se observa en el núcleo pontino humano. La distribución de la PDE4B en los tractos de la sustancia blanca es común a las tres especies, sin embargo, se localiza en núcleos cerebelares y en células de Purkinje de humano pero no de rata. En cuanto a la distribución de la PDE4D, ésta presenta una expresión alta

del ARNm en los núcleos interpeduncular y reticulotegmental y en colículo superior de rata y no se expresa en humano. La PDE4C tiene un patrón mucho más limitado en las tres especies (cortex, algunos núcleos talámicos y cerebelo en humano; claustrum, cortex y cerebelo en mono; y exclusivamente en bulbo olfatorio en rata).

Por RT-PCR se encontraron niveles elevados de la expresión del ARNm de la PDE4A en rata y humano en cerebro, corazón, pulmón, riñón, placenta e hígado (Engels et al., 1994) y por análisis *Northern* se localizó en musculatura esquelética y leucocitos humanos (Owens et al., 1997). Mediante estudios de hibridación *in situ* en el cerebro de rata se detectó el ARNm de la PDE4A en bulbo olfativo, formación hipocampal, corteza cerebral, determinados núcleos talámicos, cerebelo y núcleos del tronco cerebral (Engels et al., 1995a), expresión que, de manera general, correlaciona con la encontrada por inmunohistoquímica en el cerebro de ratón (Cherry and Davis, 1999) y de mono (Lamontagne et al., 2001).

El ARNm de la PDE4B se detectó, por análisis *Northern* en corazón, pulmón, musculatura esquelética y cerebro humanos (McLaughlin et al., 1993b), y posteriormente se confirmó esta expresión en la rata mediante RT-PCR (Engels et al., 1994). Estudios de hibridación *in situ* revelaron que el ARNm de esta isoforma en el cerebro de roedor se encontraba en corteza cerebral, ganglios basales, formación hipocampal y determinados núcleos del tálamo. Localización que se correspondía, de manera general, con la expresión de la proteína en el cerebro de roedor (Cherry and Davis, 1999).

La expresión del mensajero de la PDE4C también fue determinada por RT-PCR (Engels et al., 1994) y por análisis *Northern* (Engels et al., 1995a; Obernolte et al., 1997) realizados en diversos tejidos de rata y humano, como riñón, corazón, placenta, hígado, páncreas, musculatura esquelética, pulmón, testículos y cerebro. Más tarde se detectó la presencia en capas internas del bulbo olfativo en cerebro de roedor por estudios de hibridación *in situ* (Engels et al., 1995b; Pérez-Torres et al., 2000).

El estudio de la expresión de la PDE4D por *Northern* (Baecker et al., 1994) y de RT-PCR (Engels et al., 1994), la localizó en la musculatura esquelética, el corazón, la placenta, el riñón, el pulmón y el cerebro humanos y de ratón. Posteriormente se demostró su presencia en los testículos (Salanova et al., 1999). Estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica realizados en el cerebro de roedor (Engels et al., 1995a; Cherry and Davis, 1999) y del mono (Lamontagne et al., 2001), han detectado la presencia de la PDE4D en la corteza cerebral, el septum, la formación hipocampal, el tálamo, el cerebelo, en determinados núcleos del tronco cerebral como el rafe dorsal y en el area postrema. El estudio de la localización en el cerebro de la rata del ARNm de las cinco variantes de *splicing* de esta isoforma reveló una expresión diferencial y, en algunos casos, asociada a vías o circuitos específicos en el cerebro. Por ejemplo, la PDE4D2 es la única variante de *splicing* que se expresa en el rafe dorsal y medial, y por lo tanto sería la variante que podría participar en la regulación de la actividad de las neuronas serotoninérgicas (Miró et al., 2002b).

Es importante señalar dentro de la amplia distribución de los isoenzimas de la familia PDE4 su presencia en células inflamatorias y del sistema inmunológico tales como neutrófilos, macrófagos, basófilos, plaquetas, eosinófilos, linfocitos T y B, células epiteliales, mastocitos y monocitos. Parece ser que la PDE4C, es el único miembro de esta familia que no está presente en estas células (Engels et al., 1995b) y que la PDE4B2 es la forma predominante en eosinófilos y monocitos (Wang et al., 1999).

4.7.5. Ratones mutantes nulos de la PDE4

La gran diversidad que presentan los isoenzimas de la PDE4, y a pesar de que a algunos de éstos ya se les habían atribuido funciones concretas, hizo pensar inicialmente que podría darse cierta redundancia de actividad cuando, por lo menos dos de ellos, se encontraban en determinadas células o tejidos (Burns et al., 1996). Esta idea de la redundancia de funciones fue rebatida con la generación de ratones en los que se ha eliminado la expresión de uno o más genes, ratones *knockout* o KO (en inglés) para alguno de los cuatro genes de la PDE4, llegándose a la conclusión de que no sólo no eran actividades redundantes, sino que eran actividades complementarias (Ariga et al., 2004). La PDE4D fue el primero de los cuatro genes de la familia PDE4 para el que se generaron ratones mutantes nulos en los que se observó que este gen no realiza una función redundante en la hidrólisis del AMPc *in vivo* (Jin et al., 1999). Estos ratones deficientes en la PDE4D son viables, aunque esta viabilidad está reducida respecto a la esperada, y además presentan retraso en su crecimiento e infertilidad en las hembras. En estudios de la actividad PDE en estos ratones KO para PDE4D, se observó una disminución de la actividad PDE sensible a rolipram, y no se vieron cambios en la insensible a rolipram. Además, la expresión de la PDE4A y de la PDE4B no estaba alterada respecto a los ratones normales.

Estos ratones se han utilizado para estudiar la implicación de la PDE4D en la regulación de la señal del AMPc sobre la patofisiología y farmacoterapia de la depresión, ya que estos ratones mutantes nulos para la PDE4D presentan un perfil antidepressivo en varios estudios de comportamiento (Zhang et al., 2002b); o bien en el balance de la contracción y relajación de la musculatura lisa del tracto respiratorio (Mehats et al., 2003), en los que está alterada. Recientemente se han utilizado para el estudio de alteraciones cardíacas (Lehnart et al., 2005), ya que se ha visto que la inactivación del gen de la PDE4D origina una cardiomiopatía progresiva (fallo cardíaco y arritmias) en estos ratones.

También se han desarrollado ratones mutantes nulos para la PDE4A y la PDE4B, cuya viabilidad es mayor que la de ratones deficientes para la PDE4D, y presentan una talla, peso, crecimiento y contenido sanguíneo idéntico a los ratones salvajes. Existen varios trabajos con ratones KO en los que se pone de manifiesto el papel predominante de la PDE4B en la respuesta inflamatoria tras la administración de lipopolisacárido (LPS). Una de las características más destacadas de los ratones a los que se les ha eliminado el gen de la PDE4B es su falta de respuesta en monocitos y macrófagos a la estimulación por el LPS, además de la incapacidad de producir TNF α por parte de sus leucocitos estimulados con este superantígeno (Jin and Conti, 2002). En trabajos posteriores se ha observado que la administración del LPS vía respiratoria

Introducción

en ratones deficientes en la PDE4B o la PDE4D afecta al reclutamiento de neutrófilos hacia las estas vías y su funcionalidad, cosa que no ocurre en los ratones deficientes en la PDE4A (Ariga et al., 2004). Con estos experimentos se ha demostrado que la PDE4B y la PDE4D realizan un papel complementario y no redundante en la respuesta inmunológica. Experimentos más recientes han revelado que la PDE4B es la isoforma reguladora de la respuesta inflamatoria en macrófagos estimulados por LPS, puesto que su inactivación, y no la de la PDE4A o la de la PDE4D, produce una disminución de los niveles de TNF α producidos por éstos. De esta manera han demostrado una función altamente especializada de la PDE4B en macrófagos y en la señalización del LPS (Jin et al., 2005a).

Tabla 1.5. Fenotipo de ratones mutantes nulos para la PDE4A, la PDE4B y la PDE4D (Alvarez et al., 1995; Jin et al., 1999; Hansen et al., 2000; Jin and Conti, 2002; Robichaud et al., 2002; Zhang et al., 2002b; Mehats et al., 2003; Ariga et al., 2004; Houslay et al., 2005; Jin et al., 2005b).

Respuesta	PDE4A KO	PDE4B KO	PDE4D KO
Crecimiento y supervivencia, fertilidad hembras	normal	normal	alterada
Producción de TNF α por leucocitos circulantes estimulados por LPS	normal	↓ 90%	normal
Hiperreactividad de las vías respiratorias en respuesta a alérgenos y agonistas colinérgicos	↓	↓	ausente
IL4, IL5 e IL13 en fluido broncoalveolar mediado por alérgeno		↓	normal
Reclutamiento de eosinófilos en fluido broncoalveolar mediado por alérgeno		64%	normal
Reclutamiento de neutrófilos en fluido broncoalveolar mediado por LPS	normal	↓ 31%	↓ 48%
Contracción traqueal inducida por agonistas colinérgicos	normal	normal	↓34% en eficacia máxima, ↓5x sensibilidad
Disminución del tiempo de anestesia mediado vía α 2-AR inducido por inhibidores de la PDE4 (comportamiento equivalente la émesis en especies que no vomitan)		normal	↓
Cognición (memoria a largo plazo)		normal	↑
Comportamiento antidepresivo		↑	↑
Comportamiento ansiolítico		↓	normal
Velocidad de contracción de miocitos mediada por β 2-AR	normal	normal	↑

El desarrollo de estos ratones ha permitido confirmar *in vivo*, el papel destacado de algunos de los isoenzimas de la PDE4 en la regulación de patologías tan variadas como la inflamación, la depresión o alteraciones cardíacas, sugiriendo así nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos.

4.7.6. Inhibidores de la PDE4

Tal y como se ha comentado anteriormente, el uso de inhibidores de PDE ya se daba en el antiguo Egipto, al utilizar, en el tratamiento de afecciones varias, el extracto de una flor que contenía, entre otros compuestos, inhibidores de la actividad PDE, o bien, unos siglos más tarde, en el siglo XIX, cuando se recomendaba la ingesta de café para mejorar el asma. Pero no se comenzó a hablar del efecto inhibitorio sobre la actividad PDE de determinados compuestos (como cafeína o teofilina), hasta que no se hubo purificado y caracterizado la actividad de estos enzimas (Butcher and Sutherland,

1962; Thompson and Appleman, 1971). Posteriormente, en 1976, se describió por primera vez la existencia de un compuesto, el rolipram, que inhibía selectivamente la actividad PDE4 (Schwabe et al., 1976). Este compuesto fue inicialmente utilizado como fármaco antidepressivo debido a la acción estimuladora sobre la transmisión noradrenérgica en el SNC producida por la inhibición de la actividad PDE4 (Wachtel, 1983; Zeller et al., 1984) y también se llegó a la fase II de ensayos clínicos para la enfermedad de Parkinson (Parkes et al., 1984). Sin embargo estos ensayos clínicos se suspendieron a causa de los efectos secundarios provocados por su actuación en el sistema nervioso central como efectos gástricos o émesis. Recientemente, debido a su acción antiinflamatoria, se ha despertado nuevamente el interés por el uso de inhibidores de la PDE4 en el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio como EPOC y asma (Souness et al., 2000a; Vignola, 2004; Lagente et al., 2005) o en trastornos autoinmunes como esclerosis múltiple (Zhang et al., 2002a) (Bielekova et al., 2000).

La implicación de la PDE4 en procesos patológicos asociados con células y tejidos tan variados como leucocitos, musculatura lisa vascular, endotelio vascular y cerebro, sugiere que esta familia de fosfodiesterasas puede ser una diana farmacológica importante en una gran variedad de alteraciones inflamatorias, vasculares, angiogénicas y neurológicas. Por este motivo se ha dado un gran empuje al estudio de la interacción del rolipram (y otros inhibidores de esta familia) con la PDE4.

La idea más extendida es que la unidad catalítica de los cuatro isoenzimas de la familia PDE4 puede adoptar diferentes estados conformacionales. Esta idea surgió de las siguientes observaciones: (1) diferentes preparaciones que contenían enzimas de la PDE4 tenían diferentes sensibilidades a inhibición por rolipram; (2) la diferente actividad inhibitoria entre enantiómeros R(-)-rolipram y S(+)-rolipram y (3) de los ensayos de unión realizados con rolipram tritiado ($[^3\text{H}]$ -rolipram) con los que se identificó la existencia de sitios de unión de alta y baja afinidad (Schneider et al., 1986; Kelly et al., 1996; Souness and Rao, 1997). Durante mucho tiempo, se aceptó la idea de que los inhibidores de la PDE4 capaces de interactuar con sitios de unión de alta afinidad por rolipram (HARBS, del inglés *high-affinity rolipram binding sites*) y con los de baja afinidad (LARBS, del inglés *low-affinity rolipram binding sites*), tenían mayor probabilidad de provocar émesis y secreciones gástricas ácidas que los compuestos que unían únicamente LARBS, que desarrollaban acciones antiinflamatorias (Souness and Rao, 1997). Por otro lado se observó que el tratamiento repetido con antidepressivos que median su acción a través de la vía noradrenérgica (desipramine) o serotoninérgica (fluoxetina) aumentaban la unión de los inhibidores a HARBS pero no LARBS en la corteza y el hipocampo de la rata, y esta unión a HARBS era bloqueada si se lesionaban estos sistemas de neurotransmisión, sugiriendo que estos efectos antidepressivos eran posteriores a la estimulación de estas vías de neurotransmisión (Sung et al., 2003).

En un primer momento no se conocía la naturaleza de estos sitios de unión, pero a partir de evidencias experimentales se sugirió la posibilidad de que pudiese tratarse de un cambio conformacional, o de dos estados de afinidad, del dominio catalítico de la

PDE4 (Souness and Rao, 1997). Uno de los modelos *in vitro* utilizaba la PDE4A recombinante y mostraba que las alteraciones en la unión al rolipram y a sus enantiómeros podían ser debidas a la unión de Mg^{2+} en el sitio activo del enzima (Laliberte et al., 2000; Liu et al., 2001). En experimentos en los que expresaban enzimas recombinantes en *Escherichia coli*, observaron una menor afinidad de interacción del rolipram con el apoenzima (enzima libre) (K_d 150 nM) que con el holoenzima (enzima unido a Mg^{2+}) (K_d 3-8 nM). El hecho de que en condiciones fisiológicas exista suficiente Mg^{2+} como para saturar su sitio de unión de todas las PDE4. y por lo tanto tenerlas todas en forma de holoenzima (Sette and Conti, 1996), hace pensar en la existencia de otros mecanismos por los que un isoenzima de la PDE4 pueda cambiar su conformación entre LARBS o HARBS. Por otro lado se han encontrado formas activas de la PDE4 que pueden presentar alta o baja sensibilidad a inhibición por rolipram (Huston et al., 1996), como es el caso de la PDE-46 (o HSPDE4A4B) que, al ser expresada en células COS7, su fracción particulada presenta una mayor sensibilidad a inhibición por rolipram que la fracción citosólica. Además es posible generar estructuras catalíticamente activas pero con baja afinidad por rolipram con enzimas unidos a Mg^{2+} (Houslay et al., 2005).

Estos estudios sobre la posible implicación del Mg^{2+} en la conformación del isoenzima, han sugerido la posibilidad de que cambios en la orientación de residuos estarían coordinando la interacción del catión divalente con la unidad catalítica de la PDE4 para producir un cambio conformacional en el lugar catalítico. Un ejemplo de esto lo encontramos en la fosforilación de las isoformas largas de la PDE4 por la PKA que provoca un pequeño incremento en su afinidad por Mg^{2+} y por rolipram (Sette and Conti, 1996; Hoffmann et al., 1998b). La fosforilación de la PDE4D3 por la PKA, aumenta la sensibilidad de este isoenzima a ser inhibido por rolipram (Alvarez et al., 1995), al parecer, por un cambio conformacional diferente al ocurrido cuando se da la activación del enzima (Hoffmann et al., 1998b) y que podría estar relacionado con cambios en la interacción UCR1/UCR2 (Beard et al., 2000) o por homodimerización (Richter and Conti, 2004). Ya se ha comentado anteriormente que algunas regiones del dominio regulador son necesarias para estimular cambios conformacionales que alteran la sensibilidad a inhibición por rolipram (Rocque et al., 1997). De hecho, la interacción de estas regiones con varias proteínas, puede afectar la sensibilidad de la PDE a ser inhibida por rolipram. Así pues, podríamos decir que este cambio conformacional del isoenzima, que provoca una alteración de la sensibilidad a rolipram, puede darse por diferentes rutas, y que probablemente el sitio de unión a Mg^{2+} también esté implicado dando lugar a lo que se conoce como apoenzima (enzima libre, estado de baja afinidad por rolipram) y holoenzima (enzima unido a Mg^{2+} , estado de alta afinidad por rolipram) (Laliberte et al., 2000).

La existencia de diferentes estados conformacionales intrínsecos a las isoformas de la familia PDE4 (por la interacción con proteínas o por su estado de fosforilación), se debe tener en cuenta a la hora de determinar la potencia y características de los nuevos compuestos diseñados como inhibidores de esta familia (Houslay et al., 2005) (O'Donnell and Zhang, 2004b).

Hasta la fecha se han diseñado nuevos compuestos con actividad inhibitoria selectiva para la PDE4, con constantes de inhibición (IC_{50}) muy similares entre los distintos isoenzimas, comprendidas desde un rango nanomolar hasta micromolar (Muller et al., 1996; Houslay et al., 1998; Souness et al., 2000a).

Existe una gran diversidad de familias a los que pertenecen estos compuestos. Encontramos los derivados de xantinas que en general son inhibidores débiles y no selectivos de la PDE4, que incluyen: teofilina (que fue el primer inhibidor utilizado terapéuticamente); 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX); *arofylline* (en ensayos clínicos de fase III); *doxofylline* (en el mercado); y *cipamfylline*.

La familia *dialkoxyphenil* (catecol) es la familia de inhibidores de fosfodiesterasas 4 mayor y mejor caracterizada. Forman parte de esta familia el rolipram (inhibidor selectivo de PDE4 por excelencia, con propiedades antidepressivas y antiinflamatorias), y compuestos estructuralmente relacionados como la zardaverina, filaminast, mesopram, IC-485 y piclamilast. Estos compuestos fueron utilizados en el tratamiento clínico del asma pero, debido a su estrecho margen terapéutico (émesis y náuseas) dejaron de utilizarse. Otros compuestos de esta misma familia están siendo sometidos a ensayos clínicos como el atizoram, tetomilast, CC-1088 y ONO-6126. Dentro de esta familia encontramos el cilomilast y roflumilast como compuestos que han completado los ensayos clínicos fase III y están a la espera de ser aprobados como tratamiento para el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Souness et al., 2000b).

La búsqueda de inhibidores de la familia PDE4 sin efectos eméticos y con una mayor ventana terapéutica ha conducido al desarrollo de nuevas clases. Entre estos nuevos compuestos encontramos : AWD-12-28 (indol que actualmente se encuentra en fase II para el tratamiento del asma), YM-976 (derivado de pyridopyrimidinone que no ha pasado la fase I de ensayos clínicos), tofomilast (derivado de indazol en desarrollo clínico), lirimilast (derivado benzofuran que no pasó la fase II de ensayos para tratamiento del asma) y el ibudilast (compuesto pyrazolopyridine inhibidor de la PDE3 y la PDE4, que se utilizó extensamente en el mercado asiático como controlador de asma y actualmente está en fase II de ensayos clínicos para la esclerosis múltiple).

La gran mayoría de los inhibidores de la PDE4 no son selectivos exclusivamente para uno de los isoenzimas de esta familia (Muller et al., 1996), es decir, inhiben más de un isoenzima en mayor o menor grado, lo que provoca una alteración de los niveles de AMPc intracelular en un gran número de células, incluso en aquellas sobre las que no estamos interesados en actuar. Como resultado de este incremento de los niveles de segundo mensajero, la expresión de otras proteínas puede verse alterada dando lugar a efectos secundarios no deseados (Houslay et al., 1998). Como efectos adversos se ha observado un aumento de las secreciones gástricas por parte de las células parietales del estómago así como un aumento de la somnolencia. Sin embargo el mayor inconveniente de estos compuestos es el efecto emético asociado a una inhibición no selectiva del estado de alta afinidad por rolipram (HARBS) de la PDE4 (Duplantier et al., 1996; Souness and Rao, 1997).

La mayoría de inhibidores de la PDE4 producen náuseas y vómitos en mayor o menor grado, cosa que sugiere que el aumento de los niveles de AMPc en el centro del vómito podría estar asociado con dicho efecto emético. Estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* han determinado la expresión de la PDE4B y la PDE4D en áreas cerebrales (área postrema y núcleo solitario) (Cherry and Davis, 1999) involucradas en el desarrollo de la émesis (Borinson H.L. and Wang, 1953; Carpenter et al., 1988).

Se ha descrito un nuevo compuesto inhibidor de la PDE4, el L862-141, que a dosis antiinflamatorias presenta una mejor tolerancia ya que, al no traspasar la barrera hematoencefálica, no produce efectos eméticos (Frenette et al., 2002; Moore et al., 2006).

Actualmente el estudio de la estructura del gran número de inhibidores de la PDE4 mediante cristalografía permitirá diseñar inhibidores de esta familia cada vez más potentes y más selectivos (Card et al., 2005).

4.7.7. Papel fisiológico de la PDE4

A lo largo de los años se han utilizado diferentes estrategias para descubrir el papel regulador que ejercen las PDE4. Entre éstas encontramos el uso de inhibidores altamente selectivos (Castro et al., 2005), la generación de ratones mutantes nulos para las isoformas PDE4A, PDE4B y PDE4D desarrollados por el grupo de Conti y colaboradores (Jin et al., 1999; Jin and Conti, 2002; Mehats et al., 2003; Ariga et al., 2004), la ablación por siRNA (*small inhibitory RNA*) (Lynch et al., 2005), o bien el uso de dominantes negativos para la interrupción de la localización intracelular del enzima (McCahill et al., 2005).

Tal y como hemos comentado anteriormente, se ha demostrado la implicación de la PDE4 en procesos patológicos muy variados y se ha sugerido una terapia con inhibidores de esta familia para una serie de patologías relacionadas con estos procesos (Tabla 1.6.)

Tabla 1.6.. Principales patologías para las que se ha sugerido un terapia con inhibidores de PDE4 (Houslay et al., 1998; Huang et al., 2001; Houslay et al., 2005; Sanz et al., 2005)

Alzheimer	Esclerosis múltiple
Artritis reumatoide	Esquizofrenia
Asma	Isquemia cerebral
Cáncer	Leucemia linfocitaria crónica
Colitis ulcerosa	Disfunción cognitiva leve
Depresión	Osteoporosis
Dermatitis atópica	Parkinson
Diabetes	Psoriasis
Encefalomiелitis autoinmune	Rinitis alérgica
Enfermedad de Crohn	Shock séptico
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)	SIDA

A continuación se explicará con mayor detalle los efectos de la administración de inhibidores de esta familia, y por lo tanto la implicación del isoenzima en alguno de los procesos patológicos que acabamos de mencionar.

4.7.7.1. Efectos de la inhibición de la PDE4 en células inflamatorias

La citocina proinflamatoria $TNF\alpha$ es producida en grandes cantidades por monocitos, macrófagos y linfocitos T en condiciones proinflamatorias, como ocurre en la artritis reumatoide, la psoriasis o la enfermedad de Crohn. La producción de esta citocina por monocitos humanos periféricos en sangre estimulados con LPS es inhibida por rolipram (Seldon et al., 1995). Esta inhibición está acompañada por el aumento de los niveles intracelulares de AMPc y activación de la PKA, y se ve aumentada de manera sinérgica por la estimulación de la adenilato ciclasa mediada por el receptor de prostaglandina E_2 . Además se ha visto que la producción de citocinas antiinflamatorias, como IL-10, por parte de los monocitos se ve aumentada tras la administración de rolipram y también es dependiente de la PKA (Eigler et al., 1998). Estos efectos opuestos producidos por un compuesto que aumenta los niveles de AMPc y por lo tanto activa la PKA, en la inhibición de la producción de $TNF\alpha$ y en la estimulación de la producción de IL-10 se explican a nivel de transcripción, ya que estas mismas condiciones provocan la inhibición de la transactivación de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B, necesario para la transcripción de $TNF\alpha$ (Ollivier et al., 1996) (Takahashi et al., 2002); mientras que la activación de la vía PKA/CREB/C/EBP permite la activación del promotor de IL-10 (Platzer et al., 1999; Brenner et al., 2003).

Células mieloides como eosinófilos, basófilos, mastocitos y neutrófilos participan en la respuesta inmune innata con la producción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores proinflamatorios. Pero también se ha observado que los neutrófilos juegan un papel importante en el proceso patológico de enfermedades como la EPOC, el asma severo o estados avanzados de la artritis reumatoide. Los inhibidores de la PDE4 suprimen respuestas de los neutrófilos, como la producción de IL-8, leucotrieno B4 y aniones superóxido, la degranulación, el quimiotactismo y la adhesión. En otras enfermedades como la dermatitis atópica, la rinitis alérgica y el asma, son los eosinófilos los que juegan un papel patológico y se ha observado una disminución en la producción de aniones superóxido, y su adhesión e infiltración en las vías respiratorias al inyectar sistémicamente rolipram. El rolipram actúa sobre los eosinófilos circulantes, puesto que administraciones intradérmicas de rolipram no inhiben el reclutamiento de eosinófilos en el modelo pasivo de anafilaxis cutánea (O'Donnell and Zhang, 2004a; O'Donnell and Zhang, 2004b; Jeffery, 2005). Inhibidores de la PDE4 selectivos han demostrado eficacia en la dermatitis atópica (cipamfilina CP80,633) y en la psoriasis (CC-10004), es más, actualmente el inhibidor AWD12-281 (GW 842470) está sometido a evaluación clínica para el tratamiento de la dermatitis atópica (Baumer et al., 2007).

A pesar de que los linfocitos T humanos expresan predominantemente tres familias de fosfodiesterasas, la PDE3, la PDE4 y la PDE7 (Giembycz et al., 1996), la mayoría de la investigaciones se han centrado en la búsqueda de inhibidores de la PDE4, puesto que únicamente se ha observado una disminución de la producción del $TNF\alpha$ por parte de estos linfocitos al tratar con inhibidores de la PDE4 (Manning et al., 1999).

La observación de que la estimulación del TCR (*T cell receptor*) provoca un aumento de los niveles de AMPc (Ledbetter et al., 1986), junto con que aumentos del AMPc en las células T inhiben su función y proliferación (Skalhegg et al., 1992) sugiere que la producción del segundo mensajero mediada por TCR debe estar regulada finamente para que se dé la activación del linfocito T (Abrahamsen et al., 2004). La localización de estas PDE en los lugares de producción del AMPc permitirá la regulación de los niveles de este nucleótido y por lo tanto el control de la señal compartimentalizada de éste (Houslay and Adams, 2003; Conti et al., 2003). Está ampliamente aceptada la idea de que la señalización mediada por TCR se inicia en microdominios de la membrana celular ricos en esfingolípidos y colesterol, llamados *lipid rafts* (Simons and Ikonen, 1997), que forman una plataforma señalizadora de reclutamiento de proteínas (Montixi et al., 1998).

El grupo de Tasken y colaboradores ha sugerido un modelo de activación de células T en el que se necesita el reclutamiento de la PDE4 cerca del TCR para que la estimulación de la célula siga adelante. En este modelo, cuando se estimula únicamente TCR, se produce un aumento de los niveles de AMPc, que activa la PKA, que, por fosforilación, activa la Csk (*C-terminal Src kinase*), que a su vez, al fosforilar Lck, la inhibe y de esta manera se atenúa la respuesta de activación del linfocito T (Abrahamsen et al., 2004; Tasken and Aandahl, 2004). Si se da una coestimulación del TCR y del CD28, se estimula el reclutamiento del complejo β -arrestina/PDE4 hacia el microdominio lipídico donde al hidrolizar el AMPc producido por la estimulación del TCR, impide la activación de la PKA y consecuentemente la activación de la Csk, de manera que al no inhibirse Lck, éste puede fosforilar el dominio ITAM (*immunotyrosine-based activation motive*) de CD3, proceso crítico para la activación de células T (Abrahamsen et al., 2004) (Figura 1.9.). En este trabajo encontraron que después de la coestimulación mediante anticuerpos de CD3/CD28 se daba un rápido reclutamiento (que se detectaba en el primer minuto después de la coestimulación, pero no a los 10 minutos) de la PDE4A4, la PDE4B2, la PDE4D1 y la PDE4D2 hacia los *lipid rafts*. Estudios previos de inmunoprecipitación demostraron una asociación de la PDE4B, concretamente la PDE4B2, con la estimulación del CD3 ϵ de TCR (Baroja et al., 1999). Recientemente se ha visto una redistribución de la PDE4B2 en linfocitos T (*Jurkat T cells*), es decir, la distribución de la proteína PDE4B2 en condiciones de reposo se localiza en áreas pericitosólicas mientras que después de la activación del linfocito esta proteína se distribuye al inicio de la estimulación en la sinapsis inmunológica para después movilizarse hacia el lado contrario a la sinapsis (Arp et al., 2003). Está claro que el reclutamiento de la PDE4 a la zona de activación del TCR, es necesaria para la activación del linfocito, y por esto es de esperar que la administración de inhibidores de la PDE4 como el rolipram tenga propiedades antiinflamatorias, puesto que evita la regulación de los niveles de AMPc que indirectamente acabarán inhibiendo Lck (cinasa de la familia Src) y la activación de la célula no progresará.

En una revisión de Sanz y colaboradores (2005) se concluyó que el uso de inhibidores de la PDE4 (en ocasiones combinados con inhibidores de la PDE3) bloquean la

producción del $\text{TNF}\alpha$ en monocitos, macrófagos, células dendríticas, microglía, epitelio y vasculatura muscular de las vías respiratorias, o en los tumores renales. Sin embargo, en linfocitos B, a diferencia de las células T, el aumento del AMPc estimula su proliferación (Gantner et al., 1998).

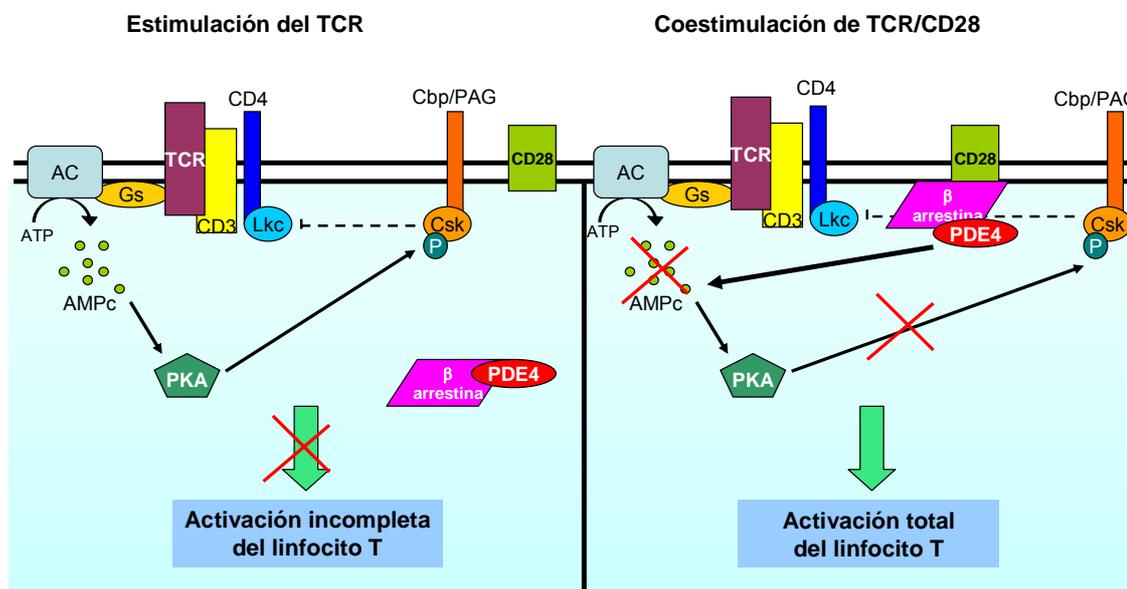


Figura. 1.9. Esquema de la activación de linfocitos T en los *lipids rafts* (Baillie y Houslay 2005; Abrahamsen 2004)

4.7.7.2. Efectos de la inhibición de la PDE4 en enfermedades respiratorias

Gran parte de la investigación con inhibidores de la PDE4 se ha centrado en su implicación en enfermedades inflamatorias crónicas del tracto respiratorio como la EPOC y el asma. La hipersecreción de mucus es una característica patológica común de estas inflamaciones crónicas del tracto respiratorio. En estas enfermedades se ha visto un aumento regulado de uno de los genes involucrados en la secreción de mucina, el gen MUC5AC. Se ha propuesto que la inhibición de la PDE4 juega un papel clave en la reducción de esta hipersecreción, ya que el tratamiento con inhibidores de esta familia, como rolipram, roflumilast y cilomilast, en cultivos celulares de células epiteliales del tracto respiratorio humano reduce la transcripción de la MUC5AC (Mata et al., 2005). Sin embargo, debido a sus efectos eméticos no han sido aprobados como terapia de estas enfermedades.

En las células epiteliales pulmonares, existe un canal de Cl^- (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) que se activa y abre por PKA y también juega un papel importante en la limpieza de mucus, y cuyas mutaciones dan lugar a fibrosis quística (Pilewski and Frizzell, 1999). Se ha observado una regulación selectiva de este canal CFTR por parte de la PDE4D (Barnes et al., 2005; Liu et al., 2005).

4.7.7.3. Efectos antitumorales y antiangiogénicos de la inhibición de la PDE4

El efecto antiproliferativo que ejercen los inhibidores de la PDE4 en linfocitos T y otras células del sistema inmune junto con la sobreexpresión de la PDE4B en el linfoma de células B ha sugerido una posible utilidad de los inhibidores de la PDE4 en el

tratamiento de leucemias linfoides. En experimentos con estos inhibidores se ha observado un bloqueo del ciclo celular y una inducción de la apoptosis en cultivos celulares de leucemia linfoblástica aguda (Ogawa et al., 2002) y en cultivos celulares de carcinoma murino (Marko et al., 1998).

Los inhibidores de esta familia también bloquean las respuestas angiogénicas de células endoteliales. Ejemplo de este efecto, se ha observado en la inhibición de la proliferación de células del endotelio umbilical humano (Favot et al., 2004) o de la producción del TNF α inducida por la E-selectina (Blease et al., 1998) y en el bloqueo de la migración inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) (Netherton and Maurice, 2005). Algunos experimentos sugieren una posible función antimetastásica, puesto que estos compuestos bloquean la migración de los fibroblastos en una superficie de laminina (Fleming et al., 2004).

4.7.7.4. Papel en el sistema nervioso central

Esta familia de PDE, tal y como se ha comentado, se expresa en neuronas y en astrocitos de una gran variedad de regiones y núcleos del SNC (Pérez-Torres et al., 2000). De hecho, se ha probado la eficacia del rolipram en varios modelos preclínicos de depresión, de déficit de memoria y de daño en médula espinal (Barad et al., 1998; Nikulina et al., 2004; O'Donnell and Zhang, 2004b).

El hecho de que los antidepresivos utilizados clínicamente aumenten la neurotransmisión mediada por noradrenalina y serotonina (Frazer, 1997), junto con la observación en cultivos celulares del reclutamiento preferente, a través de la β -arrestina, de una de las variantes de *splicing* de la PDE4 (la PDE4D5) hacia β_2 -adrenorreceptores activados por isoprenalina (Bolger et al., 2003), sugiere que la inhibición de la PDE4 puede producir efectos antidepresivos, en parte, alterando la neurotransmisión noradrenérgica (O'Donnell and Zhang, 2004b). Como algunos receptores de serotonina están acoplados a la adenilato ciclasa, sería posible que inhibidores de la PDE4 amplificasen los efectos de la transmisión serotoninérgica que estén relacionados con el AMPc. Encontramos trabajos en los que el tratamiento con fluoxetina, inhibidor de la recaptación de la serotonina, estimula la expresión de la PDE4A y la PDE4B (pero no de la PDE4D) en corteza e hipocampo de la rata (Takahashi et al., 1999; Miró et al., 2002a). Este dato en rata contrastaría con los efectos de comportamiento antidepresivo encontrados en ratones mutantes nulos de la PDE4D, y sería explicable por diferencias entre especies en las vías de señalización (O'Donnell and Zhang, 2004b).

Existe un abanico de enfermedades que cursan con pérdida de memoria u otro tipo de deterioro cognitivo. Algunas de ellas afectan a individuos de cualquier edad, como son la esquizofrenia y la depresión (Cirillo and Seidman, 2003; Airaksinen et al., 2004), sin embargo otras como el Parkinson, la demencia vascular, el infarto cerebral o la enfermedad de Alzheimer están relacionadas con el envejecimiento (O'Brien, 2003; Zgaljardic et al., 2003; Fitzpatrick et al., 2004). Esta última, la enfermedad de Alzheimer, es la más estudiada y cursa con una deficiencia cognitiva severa. Existe

una alteración de varios sistemas de neurotransmisores (acetilcolina, noradrenalina, serotonina y glutamato) (Palmer, 2002), cosa que hace lógicamente más efectivo el tratamiento con varios fármacos. El más efectivo es una combinación de memantine (inhibidor de los receptores NMDA) junto con inhibidores de la acetilcolinesterasa (Tariot et al., 2004). El tratamiento más efectivo sería aquel que consiguiese corregir las deficiencias o alteraciones en los cuatro sistemas de neurotransmisión que se acaban de comentar, a través de la modulación de los sistemas de segundos mensajeros utilizados en la actividad sináptica (Rose et al., 2005). De hecho existen evidencias de la participación de la vía AMPc/PKA/MAP/CREB en la síntesis de proteínas necesarias para el proceso de memoria a largo plazo (Silva et al., 1998; Tully et al., 2003). Así pues, si el AMPc está involucrado en este proceso, la PDE4 también podría jugar un papel importante en aspectos relacionados con la cognición, especialmente con el aprendizaje y la memoria (Rose et al., 2005).

La primera evidencia de la posible implicación de una PDE de AMPc en el aprendizaje y la memoria la encontramos la mutación del gen *dunce* en las moscas de la fruta (*D. Melanogaster*), pero también existen otras moscas con otros genes relacionados con la vía de señalización del AMPc, como la PKA o la AC, que también tienen déficits de memoria, aunque no presentan una disminución de los niveles de AMPc (Davis, 1996). Estos mutantes sugieren que la clave para que se dé un proceso alterado de memoria en *Drosophila* depende más de la habilidad para regular el AMPc, que de los niveles de AMPc (Davis et al., 1995). La PDE4 es un posible candidato para la modulación de estos niveles.

En esta dirección existen trabajos en los que se ha estudiado la potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*) como proceso relacionado con la memoria y el aprendizaje, que fue descrito primero en hipocampo (Bliss and Lomo, 1973; Bliss and Gardner-Medwin, 1973). Se ha visto que el rolipram reduce el umbral para inducir LTP en cultivos de hipocampo (Otmakhov et al., 2004), restaura su duración en ratones viejos (Barad et al., 1998), revierte los efectos negativos del péptido beta amiloide (Vitolo et al., 2002) y restaura la LTP (incluso dos meses después del tratamiento) en varios ratones transgénicos modelos de Alzheimer (Gong et al., 2003; Comery et al., 2005). Existen otros experimentos en ratón con modelos de alteraciones en la memoria dependiente de hipocampo en los que el tratamiento con rolipram, antes o inmediatamente después del entrenamiento, reduce el déficit de aprendizaje producido en el modelo (Barad et al., 1998; Nagakura et al., 2002; Tully et al., 2003). Estos experimentos realizados en mono no dieron mejoras significativas (Ramos et al., 2003). Estos trabajos nos proporcionan evidencias de que los inhibidores de la PDE4 podrían inducir mejoras (incluso perdurables en el tiempo) en la función cognitiva de pacientes con Alzheimer (Rose et al., 2005).

Se ha visto una posible relación de la isoforma PDE4B1 con la esquizofrenia y alteraciones afectivas bipolares al demostrarse su unión a través de UCR2 con el producto de un gen alterado en esquizofrenia, DISC1 (*disrupted in squizofrenia 1*) (Millar et al., 2004). La interacción de esta isoforma de PDE en estado de baja actividad con DISC1, produciría un aumento del AMPc que disociaría esta unión. Esta

liberación de la PDE en un estado más activo modularía los niveles de AMPc, que se ha postulado que pueden desempeñar un papel significativo en la génesis de esta enfermedad (Millar et al., 2005).

4.8. PDE5 (específica de GMPc)

La familia de PDE5, caracterizada por presentar una elevada especificidad por el GMPc (Km 1-5 μ M) y por contener sitios de unión de alta afinidad para este nucleótido, consta de un único gen, el PDE5A, y tres variantes de *splicing*, la PDE5A1, la PDE5A2 (aisladas en pulmón bovino) y la PDE5A3 (aislada en tejido cavernoso de pene), identificadas mediante técnicas de clonaje (Loughney et al., 1998; Kotera et al., 1999a; Lin et al., 2000). Inicialmente la actividad PDE5 fue descrita y caracterizada en plaquetas (Coquil et al., 1980) y posteriormente en pulmón (Francis et al., 1980). La similitud de tamaños, la preferencia por el GMPc sobre el AMPc como sustratos y la presencia de sitios de unión a GMPc, hizo pensar que la PDE5 pudiese estar relacionada con la ya conocida PDE sensible a la luz (PDE6). Aún así, la falta de estimulación por la luz o por la proteína G y las diferencias de actividad hidrolítica sugerían que se trataba de PDE diferentes (Bender and Beavo, 2006). Finalmente, la comparación de las secuencias aminoacídicas de la PDE6 y la PDE5A, una vez se clonó, expresó y secuenció en pulmón bovino (McAllister-Lucas et al., 1993; Kotera et al., 1997; Loughney et al., 1998), mostró una similitud inferior al 60% incluyendo el dominio catalítico común a todas las PDE, y por lo tanto se caracterizó este isoenzima como miembro de una nueva familia de fosfodiesterasas (Beavo, 1995b).

Las tres isoformas descritas se diferencian en su región amino terminal. Cada una de ellas consta de un primer exón exclusivo seguido por una secuencia común de 823 aminoácidos. En el gen, el orden de los primeros exones exclusivos de cada variante, empezando en el extremo 5', es: PDE5A1, PDE5A3 y PDE5A2. La transcripción de PDE5A1 y la PDE5A3 está regulada por el mismo promotor situado antes del primer exón de la PDE5A1, mientras que la PDE5A2 tiene su propio promotor situado en el intrón que le precede. Ambos promotores pueden ser regulados por el AMPc o el GMPc a través de elementos de respuesta a nucleótidos cíclicos como Sp1, AP2 (Lin et al., 2001) o CRE (Kotera et al., 1999a).

El dominio catalítico es una región localizada en el extremo carboxilo de 234 aminoácidos (del 578-812) donde se localizan residuos de histidina imprescindibles para la unión de Zn^{2+} , unión importante para la actividad de la PDE5 (Francis and Corbin, 1994), aunque también para el resto de las PDE (Omburo et al., 1998). Más recientemente el estudio de la estructura tridimensional de este dominio mostró una topología similar a la de la PDE4, aunque con una homología del 23% de los aminoácidos, cosa que implicaba diferencias estructurales en la parte hidrofóbica de la cavidad activa de ambas PDE (Sung et al., 2003). También se observó que los inhibidores de la PDE5 sildenafil, tadalafil y vardenafil se unían de diferente manera.

En el extremo amino de la PDE5A existe una región (residuos 142-526), homóloga a la encontrada para la PDE2 y la PDE6, que une GMPc. Esta región está dividida en dos dominios de unión a GMPc (GAF-A y GAF-B), pero solamente GAF-A une con alta

afinidad el GMPc (con una selectividad 100 veces mayor por el GMPc que por el AMPc) (Zoraghi et al., 2005). La unión del GMPc a GAF-A aumenta la actividad del enzima entre 9-11 veces, mientras que el bloqueo de esta unión, o la ausencia de este dominio daría lugar a un enzima inactivo (Rybalkin et al., 2003). La unión del GMPc a GAF-A se estabiliza por la fosforilación de una serina cercana (Francis et al., 2002a) llevada a cabo por la PKG o la PKA (Corbin et al., 2000). Esta fosforilación aumenta la afinidad de GAF-A por el GMPc estabilizando así el aumento de la actividad catalítica. Se trataría de un mecanismo de retroalimentación para prolongar la activación de la PDE5 en la célula, y se ha demostrado *in vivo* (Shimizu-Albergine et al., 2003).

La PDE5A está considerada una proteína citosólica y los niveles más altos de la expresión de su ARNm en roedor se han detectado en el riñón, el páncreas, el corazón, el pulmón y el cerebro (Kotera et al., 2000), especialmente en el cerebelo, donde se ha visto una elevada expresión de la PDE5 en células de Purkinje utilizando anticuerpos (Shimizu-Albergine et al., 2003). También se ha detectado el ARNm en la musculatura vascular lisa (prominentemente expresada en tejidos vasculares del pene) y la esquelética, la placenta, el hígado y en varios tejidos gastrointestinales (Loughney et al., 1998; Stacey et al., 1998; Yanaka et al., 1998). Este enzima también se encuentra elevado en células de neuroblastoma-glioma (NG108-15) (Giordano et al., 2001).

A nivel de variantes de *splicing*, los mensajeros de la PDE5A1 y la PDE5A2 se encuentran en una gran variedad de tejidos mientras que la PDE5A3 está restringida a la musculatura vascular lisa (Kotera et al., 1998; Lin et al., 2002).

Las empresas farmacéuticas han desarrollado un gran número de inhibidores selectivos para la PDE5, cuyo mecanismo de acción es el de competir con el GMPc por el centro catalítico del enzima pero sin interaccionar con GAF-A. Como dato a destacar podemos decir que estas compañías han obtenido mayor éxito comercial con estos inhibidores que con inhibidores de cualquier otra PDE gracias a la efectividad de algunos de ellos en el tratamiento de la disfunción eréctil, entre otras patologías (Bender and Beavo, 2006). El uso de estos inhibidores también ha permitido inferir las posibles funciones realizadas por este enzima.

Se ha visto la implicación del GMPc en el control de la contracción de la musculatura lisa de los vasos, y por lo tanto, la posible participación de la PDE5 en la vasoconstricción en pulmón o en los vasos cavernosos del pene. Inhibidores de la PDE5 como sildenafil (Viagra), vardenafil (Levitra) o tadalafil (Cialis) estimulan la vasodilatación de la musculatura lisa del pene y de esta manera se estimula su erección (Rosen and Kostis, 2003; Corbin, 2004). Estos fármacos se utilizan como tratamiento de la impotencia masculina (Boolell et al., 1996; Corbin and Francis, 1999), pudiendo llegar a producir efectos cercanos a la normalidad sólo en presencia de NO o del péptido natriurético atrial (Bender and Beavo, 2006). Aún así, están contraindicados en pacientes tratados con nitrovasodilatadores, por el aumento del GMPc en toda la musculatura lisa que se produciría en estos pacientes. El Sildenafil tiene efectos secundarios tales como la disminución de la presión arterial, dolores de cabeza, alteraciones de la visión debido a que también inhibe la PDE6 de la retina,

además de producir congestión nasal o acidosis gástrica. Otros compuestos, como valdenafil, presentan menos efectos secundarios (Kim et al., 2001).

El efecto sobre la vasculatura pulmonar hace que compuestos como el *dipyridamole* estén en ensayos clínicos para el tratamiento de la hipertensión pulmonar de adultos (Lewis and Semigran, 2004; Steiner et al., 2005) y de neonatos (Hoepfer, 2005; Humpl et al., 2005). El *dipyridamole* también se utiliza como antritrombótico (Beavo, 1995a). Estos compuestos ejercen un papel inhibitorio sobre la agregación plaquetaria y la secreción de compuestos por parte de las plaquetas (Ito et al., 1996; Dunkern and Hatzelmann, 2005). Existen estudios en los que se observa un papel sobre la memoria y el aprendizaje (Prickaerts et al., 2004a; Prickaerts et al., 2004b). Por otro lado también se ha visto un papel del GMPc, y por lo tanto de la PDE5 en la función cardíaca. Recientemente el grupo de Takimoto (2005) ha demostrado los efectos antihipertróficos y antifibróticos del sildenafil sobre la hipertrofia causada por un exceso de presión en roedores. Si estos efectos se pudiesen transferir a humanos con hipertensión o fallo cardíaco, los inhibidores de la PDE5 serían una posible terapia para enfermedades cardíacas (Bender and Beavo, 2006).

4.9. PDE6 (fotoreceptor específico del GMPc)

La familia PDE6, también conocida como PDE-fotoreceptor, se caracteriza por presentar una elevada especificidad por el GMPc (K_m 0.06-1 μ M), aunque a concentraciones elevadas (no fisiológicas) es capaz de hidrolizar eficazmente el AMPc. Su eficiencia catalítica es mayor que las del resto de las PDE conocidas, pudiendo cada molécula de PDE hidrolizar más de 3000 moléculas de GMPc por segundo (Gillespie and Beavo, 1988).

La familia de PDE6 está formada por tres genes (PDE6A, PDE6B y PDE6C) que codifican para tres subunidades catalíticas (α , β , α' , respectivamente). Esta familia, a diferencia del resto de las PDE, forma heterotetrámeros formados por dos subunidades catalíticas además de dos subunidades que regulan su actividad (PDE6 γ) y su localización (PDE6 δ). Las subunidades α y β , localizadas predominantemente en los bastones de la retina, presentan mayor homología entre sus secuencias de aminoácidos que con la subunidad α' , situada en los conos (Conti and Jin, 1999). Estas subunidades catalíticas contienen dos dominios GAF (GAF-A y GAF-B) en el extremo amino-terminal, que unen GMPc además de intervenir probablemente en la dimerización, como ha podido observarse por microscopía crioelectrónica (Tcheudji et al., 2001; Kajimura et al., 2002). En su región carboxilo encontramos el dominio catalítico de la PDE.

La subunidad γ se asocia a la subunidad catalítica inhibiendo su actividad en ausencia de estimulación por luz (Beavo, 1995b). Las subunidades γ de conos y bastones son productos génicos diferentes y, probablemente, presentan diferente afinidad por sus dominios catalíticos respectivos. Mediante estudios de *cross-linking* y *binding* se ha visto que esta subunidad une, o por lo menos está muy cerca de GAF-A y del dominio catalítico, sugiriendo que ambas interacciones son importantes para la función de la PDE6.

La subunidad δ puede unir fuertemente el extremo carboxilo de la unidad catalítica, siendo necesaria una modificación lipídica para ello (Cook et al., 2000). Parece ser que la unión de esta subunidad a la unidad catalítica se asocia con la localización de la PDE en la fracción soluble del extracto de retina, como indica el hecho de encontrar la mayoría de la PDE6C de conos y el 50% aproximadamente de la PDE6A/B de bastones unidas a esta subunidad y en la fracción citosólica. Su papel fisiológico no está claro. Algunos autores proponen que esta subunidad interviene en la síntesis y el transporte de la PDE hacia los discos o la membrana plasmática (Norton et al., 2005), mientras que otros le atribuyen una función reguladora de la intensidad del estímulo lumínico necesaria para que se dé activación de la PDE, al postular que la PDE6 soluble (y por lo tanto unida a la subunidad δ) es menos sensible a la activación por transducina (Cook et al., 2001). Esta subunidad también se ha encontrado en otros tipos celulares y tejidos ya que puede unir otras proteínas, y por esto algunos autores sugieren que no debería considerarse una subunidad de la PDE6 (Bender and Beavo, 2006).

La activación de la PDE6 se inicia con la captación de un fotón de luz por el fotorpigmento (rodopsina) de conos o bastones que provoca la activación de una proteína G (llamada transducina) que interacciona con el holoenzima de la PDE6, capturando la subunidad inhibidora γ activándose así la PDE, que hidroliza rápidamente el GMP y provoca el cierre de los canales catiónicos dependientes de GMPc cercanos. Esta inactivación tiene como resultado la hiperpolarización de la neurona que inicia la fotorespuesta (señal nerviosa).

En vertebrados, la PDE6 se localiza principalmente en la retina, concretamente en conos y bastones, a excepción de las aves, que también la expresan en la glándula pineal. Debido a esta localización prácticamente exclusiva en la retina, la encontramos implicada en diferentes procesos patológicos de la visión tales como la retinitis pigmentosa, la degeneración de la retina o la distrofia de conos y bastones. La mayoría de estas patologías se deben a mutaciones en alguno de los genes de la PDE6 (McLaughlin et al., 1993a; Gal et al., 1994; Muradov et al., 2003). Cualquier mutación que aumente crónicamente los niveles del GMPc en la célula fotorreceptora puede provocar su muerte (Farber and Tsang, 2003).

La PDE6 es conocida principalmente por su papel en la fotorecepción, pero últimamente también se ha propuesto su posible implicación en la vía de señalización Wnt/Frizzled que está acoplada a una disminución del GMPc en células embrionarias de ratón (Wang et al., 2004), dato que concuerda con trabajos en los que se ha detectado el ARNm de las subunidades α o β en tejidos diferentes a la retina (Bender and Beavo, 2006).

A nivel farmacológico esta PDE ha tenido poco interés. Pero es importante destacar que la PDE6, al presentar propiedades cinéticas y catalíticas muy similares a la PDE5, es altamente sensible a inhibidores selectivos de esta última (Manganiello et al., 1995a; Beavo, 1995b). Se ha observado que el E4021, utilizado como vasodilatador de las arterias coronarias por su inhibición de la PDE5 (Saeki et al., 1995), tiene una

mayor selectividad por la PDE6 (D'Amours et al., 1999). También es inhibido por sildenafil, y se ha sugerido que esta inhibición de la PDE6 pueda ser el origen de los efectos secundarios sobre la visión provocados por la administración de este fármaco (Bender and Beavo, 2006). Previamente se había descrito una posible implicación de este inhibidor en el tratamiento de la retinitis pigmentosa (Behn and Potter, 2001). No obstante, existen pocos estudios que hayan demostrado la implicación terapéutica de los inhibidores de la PDE5 y/o la PDE6 en el tratamiento de trastornos visuales.

4.10. PDE7 (específica de AMPc e insensible a rolipram)

La familia PDE7, al igual que la PDE4 y la PDE8, presenta una elevada especificidad por el AMPc como sustrato, especialmente a bajas concentraciones de éste. Los dos isoenzimas que forman la familia PDE7, la PDE7A y la PDE7B, tienen una K_m hasta 10 veces mayor a la encontrada para la PDE4 (0.2 μ M para PDE7A y 0.13 μ M para PDE7B), sugiriendo que la PDE7, al ser más específica por el AMPc que la PDE4, participaría con su actividad fosfodiesterasa a bajas concentraciones del AMPc (Soderling and Beavo, 2000). Otro rasgo característico de esta familia es su resistencia a la inhibición por rolipram y otros inhibidores específicos de la PDE4 (Ichimura and Kase, 1993; Francis et al., 2002b)

En humanos existen tres isoformas para la PDE7A (PDE7A1, PDE7A2 y PDE7A3) que se diferencian tanto en el extremo amino como en el carboxilo (Han et al., 1997; Glavas et al., 2001). Este isoenzima se aisló de una línea celular de glioblastoma humano (Michaeli et al., 1993). La PDE7B fue clonado a partir del núcleo caudado humano basándose en la homología de secuencia con la PDE7A (Sasaki et al., 2000), y también consta de tres variantes de *splicing* (PDE7B1, PDE7B2 y PDE7B3), diferenciadas en su extremo amino (Sasaki et al., 2002).

Los dos isoenzimas de la PDE7 tienen una homología superior al 70% cuando se compara su secuencia de aminoácidos, pasando a ser menor del 50% al comparar esta familia con cualquier otra PDE incluyendo el dominio catalítico, que se encuentra muy conservado entre las distintas familias de fosfodiesterasas (Gardner et al., 2000). En la región amino no se conoce, hasta la fecha, ningún dominio regulador, a excepción de una secuencia consenso (RRGAIS) susceptible de fosforilación por la PKA (Conti and Jin, 1999; Glavas et al., 2001; Sasaki et al., 2002). Se han encontrado dos sitios de fosforilación por la PKA en la PDE7B1 y la PDE7B3, y solamente un sitio en la secuencia de la PDE7B2 sugiriendo una regulación diferencial (Sasaki et al., 2002). Parece ser que existe una regulación diferencial según la isoforma, de esta manera el promotor de la PDE7B1 se activa en neuronas estriatales tras la activación de la PKA por el AMPc (Sasaki et al., 2004), mientras que el de la PDE7A1 contiene secuencias CRE que contribuyen a su activación (Torras-Llort and Azorin, 2003).

La distribución de los isoenzimas de la PDE7 se estudió primeramente por análisis *Northern*, encontrando una elevada expresión del ARNm de la PDE7A en la musculatura esquelética, el corazón, el riñón y el pulmón humanos (Michaeli et al., 1993; Han et al., 1997) además de en líneas celulares del sistema inmunitario, como linfocitos T (Li et al., 1999) donde parece ser que se asocia con la proteína MTG (del

grupo de AKAPs) en el aparato de Golgi (Asirvatham et al., 2004). Mediante hibridación *in situ* se ha estudiado más detalladamente la expresión de la PDE7A en humanos tanto en el SNC como en órganos periféricos, especialmente en el sistema inmune (timo, bazo, nódulos linfáticos, y leucocitos sanguíneos). Así pues, se ha observado que este isoenzima se expresa de manera diferencial, especialmente en las últimas etapas del desarrollo embrionario del cerebro (Hoffmann et al., 1998a). Estudios con esta técnica realizados en nuestro laboratorio revelaron una amplia distribución de la PDE7A en el cerebro de la rata, encontrando la expresión de su ARNm tanto en neuronas como en poblaciones no neuronales (Miró et al., 2001), y en el cerebro humano, estando presente tanto en la sustancia blanca como en la gris (Pérez-Torres et al., 2003). En la rata, las regiones cerebrales con hibridación elevada fueron bulbo olfativo, hipocampo, cerebelo, glándula pineal, habénula media, área postrema y plexos coroideos. En cambio en humanos encontraron alta expresión del ARNm en la corteza cerebral, en la formación hipocampal, en el cerebelo, en los núcleos caudado y putamen y en tractos de fibras. En cuanto a órganos periféricos de rata estos niveles eran elevados en los testículos, el hígado, el bazo, las glándulas adrenales y la médula renal. El estudio de las variantes de *splicing* de la PDE7A revela una expresión en humano y ratón del mensajero de la PDE7A1 principalmente en cerebro y linfocitos T, de la PDE7A2 en diferentes tejidos como musculatura, corazón, y riñones y de la PDE7A3 en linfocitos T activados (Bloom and Beavo, 1996; Han et al., 1997; Miró et al., 2001; Lugnier, 2006). Mediante análisis *Western*, encontraron que la proteína de PDE7A2 se encontraba exclusivamente en células cardíacas, mientras que PDE7A1 estaba ampliamente distribuida en células inmunitarias, excepto en neutrófilos (Smith et al., 2003). De este trabajo se dedujo la posible implicación de la PDE7A en procesos inflamatorios. La distribución intracelular de ambas también difiere, siendo la PDE7A1 principalmente un enzima citosólico mientras que la PDE7A2 está mayoritariamente asociado a la membrana (Han et al., 1997). La PDE7A3 se expresa constitutivamente en una línea celular humana de linfocitos T (Hut78) y se ha encontrado una aumento de su expresión en linfocitos T activados (Glavas et al., 2001).

El ARNm de la PDE7B ha sido detectado en páncreas, cerebro, corazón, musculatura esquelética e hígado de ratón (Hetman et al., 2000b), mientras que en humano se ha detectado también en ovarios, glándula pituitaria, timo e intestino (Gardner et al., 2000). En nuestro laboratorio se ha estudiado la localización del ARNm de la PDE7B en cerebro humano (Pérez-Torres et al., 2003) encontrándose una señal de hibridación elevada en el área hipocampal, en cerebelo y subiculum pero no en la corteza temporal. La distribución tisular del ARNm de sus variantes de *splicing*, al igual que las de la PDE7A, es específica de tejido, encontrando una amplia expresión de la PDE7B1 en tejidos como corazón, cerebro, pulmón, hígado y músculo (Gardner et al., 2000; Hetman et al., 2000b), mientras que la expresión de la PDE7B2 y la PDE7B3 está restringida a testículos y corazón, respectivamente (Sasaki et al., 2002).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la expresión de los dos isoenzimas de la PDE7 en diferentes regiones de cerebro de humanos con la enfermedad de Alzheimer,

encontrándose una disminución de los niveles del ARNm de la PDE7A en el giro dentado del hipocampo respecto a cerebros controles. En cuanto a la expresión de la PDE7B no se detectaron cambios significativos en ninguna de las regiones estudiadas (Pérez-Torres et al., 2003).

A pesar del esfuerzo en el desarrollo de inhibidores específicos de la PDE7 (Castro et al., 2005; Lugnier, 2006) por parte de las empresas farmacéuticas, y de la generación de ratones deficientes para este enzima (Yang et al., 2003), todavía no está claro el papel de esta familia en la activación de linfocitos T. Estudios iniciales sugirieron una posible implicación de la PDE7A en la activación de células T debido su inducción tras la activación del TCR y al efecto antiproliferativo e inhibidor de la producción de IL-2 de oligonucleótidos complementarios a la PDE7 (Li et al., 1999). Además, el uso de inhibidores duales de PDE4/PDE7 también muestra una influencia sobre la activación de linfocitos T (Nakata et al., 2002). Sin embargo, experimentos con inhibidores específicos de la PDE7, como por ejemplo BRL 50481, que muestra un mínimo efecto sobre la proliferación de linfocitos CD8⁺, únicamente si se co-administra con inhibidores de la PDE4 (Smith et al., 2004), junto con estudios en ratones deficientes en el gen de la PDE7 que no muestran alteraciones en la activación de linfocitos T (Yang et al., 2003), dificultan el entendimiento del posible papel de este enzima en la activación de estas células. A pesar de este resultado se han desarrollado inhibidores de utilidad terapéutica en el tratamiento de patologías mediadas por trastornos de linfocitos T y/o B (Martínez et al., 2000; Barnes et al., 2001; Castro et al., 2001). Entre estos inhibidores encontramos derivados de *benzothiadizines*, de guaninas o de spirotríclicos, además de *iminothiadizoles*, *benzene sulfonamide* o *3,4-dihydroisoquinolines* (Castro et al., 2005). Por otro lado, los nuevos inhibidores selectivos para esta familia, además de su ratón mutante nulo, permitirán estudiar su papel en otras células inmunes y otros tejidos como el cerebro o la musculatura esquelética donde también se expresa (Bender and Beavo, 2006). Por ejemplo, se ha visto que estos ratones *KO* tienen disminuida la secreción de glucosa estimulada por insulina en la musculatura esquelética. Fijándonos en el patrón de hibridación de la PDE7A en el cerebro, se podría inferir una posible implicación en procesos tan diversos como la memoria, la depresión y la émesis (Miró et al., 2001).

4.11. PDE8 (específica de AMPc e insensible a IBMX)

Esta familia fue la primera identificada *in silico*, es decir, con la ayuda del análisis de secuencias EST (*Expressed Sequence TAG*) por bioinformática (Hayashi et al., 1998). Consta de dos genes que codifican para la PDE8A y la PDE8B (Hayashi et al., 1998; Soderling et al., 1998a; Fisher et al., 1998a), que son específicos para el AMPc y tienen mayor afinidad por este nucleótido que el resto de las PDE (K_m 0.06-0.15 μ M) que es hasta 40 veces mayor que la afinidad de la PDE4, pero con una velocidad de hidrólisis (V_{max}) 10 veces menor que la de la PDE4 (Fisher et al., 1998a; Gamanuma et al., 2003). Mediante *splicing* alternativo y la existencia de distintos codones de inicio encontramos hasta cinco isoformas para la PDE8A, sin embargo para la PDE8B, de las posibles variantes de *splicing* inferidas de los datos del ARNm y del ADNc, hasta la fecha, únicamente se ha aislado en humano una forma truncada en 5' de su ADNc

(Hayashi et al., 1998) y todavía no se ha verificado si estas variantes son capaces de producir proteínas (Bender and Beavo, 2006).

Si comparamos la secuencia de aminoácidos de ambas isoenzimas entre diferentes especies (roedor y humano) encontramos una similitud del 85%, y del 87% al comparar el dominio catalítico de la PDE8A y la PDE8B (Hayashi et al., 1998). En la región amino existen unos dominios característicos y exclusivos de esta familia de PDE: el dominio PAS (proteínas *Per*, *ARNT* y *Sim*) y el dominio REC (*receiver domain*), si bien se ha visto que algunas de las variantes de *splicing* presentan estos dominios incompletos o bien han perdido alguno o ambos dominios (Soderling et al., 1998a; Hayashi et al., 2002). La PDE8A1 contiene PAS y REC, la PDE8A2 únicamente presenta el dominio REC y la PDE8A3, la PDE8A4 y la PDE8A5 no contienen ninguno de los dos dominios (Wang et al., 2001). No se conoce claramente la función fisiológica de estos dominios pero parece ser que estos dominios se encuentran también en proteínas de procariontes donde el dominio PAS realiza una función de sensor medioambiental para la señalización (Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 2004) y el dominio REC regula procesos de transducción de señales mediante la fosforilación por parte de cinasas (Galperin et al., 2001). El hecho de contener estas secuencias PAS y REC exclusivas para la PDE8 entre todas las PDE, y por comparación con otras proteínas que también las presentan, sugiere que esta familia puede tener un papel de sensor medioambiental para la regulación del AMPc dentro de la célula (Bender and Beavo, 2006).

Los isoenzimas de la PDE8 parecen ser citosólicos, aunque se han detectado formas recombinantes tanto en la fracción citosólica como en la particulada (Gamanuma et al., 2003). Por análisis *Northern* se apreció una expresión elevada del ARNm de la PDE8A en testículo, bazo, intestino delgado, ovario, colon y riñón, tanto en humano como en roedor, (Soderling et al., 1998a; Fisher et al., 1998a; Wang et al., 2001). Estudios realizados por hibridación *in situ* mostraron una falta de expresión de la PDE8A en cerebro de humano, a diferencia de la PDE8B, que se encuentra en ganglios basales, en algunas regiones de la formación hipocámpal, en corteza temporal y frontal y en cerebelo (Pérez-Torres et al., 2003). La expresión de la PDE8B en órganos se ha localizado en glándula tiroides (Hayashi et al., 1998) y en testículo (Bender and Beavo, 2006). La proteína de la variante de *splicing* PDE8A1 se ha detectado también en linfocitos T primarios y en líneas humanas de células T (Glavas et al., 2001). Las variantes de la PDE8B también muestran una expresión diferencial de manera que la PDE8B1 se encuentra únicamente en cerebro mientras que la PDE8B3 está en cerebro y glándula tiroides.

Debido a la expresión de la PDE8A encontrada en el epitelio seminífero de testículo de roedores en etapas tardías del desarrollo, se ha sugerido una posible implicación de este isoenzima en la embriogénesis (Soderling et al., 1998a). Además de un posible papel en la activación de linfocitos T al encontrarse un aumento regulado de la PDE8A1 tras la estimulación de estas células (Glavas et al., 2001). En cuanto a la PDE8B, debido a la presencia en tiroides, se le ha atribuido un posible papel en la transducción de la señal en esta glándula (Hayashi et al., 1998).

Uno de los trabajos de nuestro grupo demostró un aumento significativo de la expresión del ARNm de la PDE8B en giro dentado de cerebros con la enfermedad Alzheimer en estados avanzados, sugiriendo su implicación en la señalización mediada por el AMPc en esta región (Pérez-Torres et al., 2003).

Mediante la generación de un ratón mutante nulo para la PDE8A, se ha podido estudiar el papel de este isoenzima en la regulación de la producción de la testosterona en células Leydig (Vasta et al., 2006).

No se han descrito inhibidores selectivos de la PDE8, y de hecho, inhibidores no selectivos que actúan sobre la mayoría de las PDE, como IBMX, no actúan sobre esta familia. Únicamente se ha visto una inhibición por *dipyridamole* ($IC_{50} \cong 5\mu M$), inhibidor selectivo de la PDE5 y la PDE6, que, como ya se ha comentado, son familias específicas de GMPc, lo que sugiere que sus centros catalíticos deben ser muy similares y no debe estar relacionado con la especificidad de sustrato presentada por cada familia enzimática (Soderling et al., 1998a; Francis et al., 2002a). No obstante, aún no se conoce ninguna posibilidad terapéutica de esta molécula como inhibidor de PDE8.

4.12. PDE9 (muy alta afinidad por el GMPc, insensible a IBMX)

La familia PDE9 es específica del GMPc y es la que presenta mayor afinidad por este nucleótido (K_m 0.07- 0.17 μM) de todas las PDE (Soderling et al., 1998b; Fisher et al., 1998b). Está formada por un solo gen localizado en el cromosoma 21 (21q22.3) que si bien codifica para una sola isoforma (PDE9A) (Guipponi et al., 1998), parece tener un procesamiento extremadamente complejo ya que se han publicado más de 20 variantes de *splicing* (Guipponi et al., 1998; Rentero et al., 2003), diferenciadas en su extremo amino a pesar de utilizar el mismo sitio de inicio de transcripción. Esta familia presenta una baja homología en la secuencia de aminoácidos de su dominio catalítico al compararla con el resto de las PDE, lo que podría explicar la insensibilidad a los inhibidores generales de las PDE como IBMX (Soderling et al., 1998b; Fisher et al., 1998b), además de presentar una homología menor al 28% si se comparan los dominios reguladores (Fisher et al., 1998b).

La familia PDE9, a diferencia de otras familias específicas del GMPc como la PDE5 o la PDE6, no presenta en su región reguladora dominios GAF, sugiriendo una degradación del GMPc regulada por la unión de éste al centro catalítico del enzima (Fisher et al., 1998b). Sin embargo, es posible que exista alguna secuencia reguladora aún no conocida (Bender and Beavo, 2006) y que se dé una regulación postranscripcional, ya que en la secuencia 5'-UTR se ha encontrado una región rica en GC capaz de autodoblarse y generar una estructura capaz de inhibir la traducción (Fisher et al., 1998b).

Estudios realizados para ver la localización intracelular de esta familia han determinado que mientras que la PDE9A5 es un enzima citosólico, la PDE9A1 está en el núcleo, gracias a un dominio pat7 de localización nuclear presente en la PDE9A1 y no en la PDE9A5 (Wang et al., 2003).

Estudios de análisis por *Northern* con sondas específicas para la PDE9A, ha revelado una expresión generalizada en todos los tejidos estudiados excepto en sangre. Así pues la encontramos con altos niveles en el cerebro, el corazón, la placenta, el intestino delgado, el riñón fetal y adulto, el bazo, la próstata y el colon. También se expresa en el hígado, el músculo esquelético, el timo, el testículo y el ovario con niveles de expresión más bajos (Guipponi et al., 1998; Fisher et al., 1998b; Rentero et al., 2003; Wang et al., 2003). En ratón se ha encontrado una expresión muy elevada en el riñón y niveles moderados en el hígado, el pulmón y el cerebro (Soderling et al., 1998b).

La expresión de esta familia en diferentes regiones del cerebro de roedor se ha estudiado por hibridación *in situ*, localizándose en el bulbo olfatorio, giro dentado, células de Purkinje del cerebelo, tubérculo olfatorio, corteza cerebral, amígdala, núcleos septales y determinados núcleos del tronco cerebral y del tálamo. Además se ha observado una expresión predominantemente en células neuronales, y en algún astrocito (Andreeva et al., 2001; van Staveren et al., 2002; van Staveren et al., 2003).

No se han publicado estudios que revelen un función específica para la PDE9, pero su elevada afinidad por el GMPc como sustrato, y su localización en regiones del cerebro de rata que también expresan la guanilato ciclasa soluble y la sintasa del óxido nítrico neuronal sugiere una implicación de este enzima en la vía de señalización del NO/GMPc (Andreeva et al., 2001). De hecho la presencia de la PDE9A en el prosencéfalo, bulbo olfatorio, cerebelo e hipocampo (regiones conocidas por estar asociadas con la regulación del comportamiento, el olfato, el control motor y el aprendizaje) reafirma los estudios que señalan la vía del NO/GMPc como pieza importante en estos procesos del SNC. Por otro lado, la presencia de la PDE9A en el riñón junto con la de los receptores del péptido natriurético atrial reguladores de la diuresis vía guanilato ciclasa particulada, sugiere también la posible participación de este isoenzima en el mantenimiento de los niveles basales de GMPc en la diuresis (Soderling et al., 1998b). Se ha sugerido también una posible implicación de la PDE9A en determinadas enfermedades hereditarias, trastornos bipolares o en el síndrome de Down debido a la localización cromosómica cercana a genes implicados en estas patologías (Guipponi et al., 1998).

Recientemente se ha descrito un potente inhibidor selectivo de la PDE9A (IC_{50} 55nM) que es capaz de entrar en la célula, BAY 73-6691 (Wunder et al., 2005). Este inhibidor está bajo investigación clínica como posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer. Esta isoforma también es inhibible por zaprinast (IC_{50} 35 μ M; inhibidor de la PDE5 y la PDE6), pero no por IBMX. El tratamiento con zaprinast potencia la depresión de larga duración (que es un tipo de plasticidad sináptica que se da en el cerebelo y el hipocampo) sugiriendo, tal y como ya hemos comentado, la posible implicación de la PDE9A en los mecanismos moleculares de la formación de la memoria (Andreeva et al., 2001). De hecho recientemente, otros inhibidores de la PDE9 han demostrado una mejora en la LTP (*long term potentiation*) y la cognición en varios modelos animales (Hendrix, 2005). También se ha visto que la PDE9 es inhibible por el compuesto SCH 51866 (IC_{50} 1.6 μ M; inhibidor de la PDE1 y la PDE5),

que es conocido por su efecto antiagregante plaquetario y por la regulación de la presión arterial en ratas, por lo que se ha sugerido que la PDE9 pueda estar actuando en estos dos efectos (Soderling et al., 1998b; Francis et al., 2002a).

4.13. PDE10 (alta afinidad por AMPc, dual)

Esta familia fue clonada al mismo tiempo por tres grupos diferentes (Soderling et al., 1999; Loughney et al., 1999; Fujishige et al., 1999a). La familia PDE10 se caracteriza por la capacidad de hidrolizar ambos nucleótidos cíclicos, con mayor afinidad por el AMPc (K_m 0.05 μ M) que por el GMPc (K_m 3 μ M) y sin embargo con una V_{max} de hidrólisis para el GMPc más rápida (entre 2 y 5 veces) que para el AMPc, que se inhibe en presencia del AMPc. Todo esto, ha hecho considerar que el papel fisiológico realizado por el AMPc es el de inhibir la hidrólisis del GMPc por parte de esta PDE10, dando lugar a describir esta familia como específica de GMPc, sensible a inhibición por AMPc (Fujishige et al., 1999a; Francis et al., 2002b).

Existe un único gen en esta familia, PDE10A, identificado en ratón (Soderling et al., 1999) y en humano (Loughney et al., 1999; Fujishige et al., 1999a) del que se conocen entre 4 y 6 variantes en ratón (Fujishige et al., 1999a; Bender and Beavo, 2006) y 10 en humano (Fujishige et al., 2000).

El dominio catalítico de la PDE10A, situado en el extremo carboxilo, comparte una homología de secuencia menor al 50% con el resto de fosfodiesterasas descritas, mientras que el dominio regulador, cercano al extremo amino, contiene dominios GAF, homólogos a los encontrados en la PDE2, la PDE5 y la PDE6. Estos dominios GAF de PDE10A únicamente contienen tres de los cinco residuos necesarios para constituir un lugar de unión a GMPc, cosa que indica que estos dominios en esta familia no intervienen en la unión de GMPc (Soderling et al., 1999; Soderling and Beavo, 2000). De hecho, recientemente estudios *in vitro*, han demostrado que el AMPc puede unirse a estos dominios GAF de la PDE10A (Gross-Langenhoff et al., 2006). Falta resolver la cuestión de si esta unión del AMPc tiene un efecto alostérico sobre la PDE10A *in vivo* (Kuppenbender et al., 2000). Por otro lado, este isoenzima contiene una serie de residuos sensibles a ser fosforilados por la PKC, sugiriendo que esta PKC pudiese regular la actividad de la PDE10A (Fujishige et al., 1999a). Por ejemplo, la fosforilación de la PDE10A2 por la PKC, provoca su translocación hacia la fracción citosólica, desde su localización habitual en la fracción particulada, concretamente en el aparato de Golgi (Kotera et al., 1999b).

Estudios de análisis por *Northern* detectaron niveles elevados del ARNm de la PDE10A en el testículo y el cerebro de ratón (Soderling et al., 1999), y posteriormente se confirmó esta localización por hibridación *in situ* (Fujishige et al., 1999b). En humano se localizó su ARNm en la glándula tiroides, el testículo y el cerebro, especialmente en los núcleos caudado y putamen (Fujishige et al., 1999a; Seeger et al., 2003; Coskran et al., 2006; Xie et al., 2006). Esta localización en el caudado sugiere un papel de la PDE10A en la modulación de las vías estriatonigral y estriatopalidal (Seeger et al., 2003), proponiendo a la PDE10A como posible diana terapéutica para el tratamiento de alteraciones psiquiátricas frontoestriatales (Rodefer

et al., 2005). Por otro lado, la presencia del ARNm de la PDE10A en estos núcleos ricos en receptores dopaminérgicos e implicados en la enfermedad de Parkinson; junto con la localización de la PDE10A en el cromosoma humano 6q26 relacionado con el Parkinson juvenil, sugiere también una posible participación de esta PDE en la patogénesis de esta enfermedad neurodegenerativa (Fujishige et al., 1999a). Los ratones *KO* para el gen de la PDE10A presentan una disminución de la actividad exploratoria y un retraso en la adquisición de comportamientos adversivos. Sin embargo no presentan cambios en una serie de comportamientos relacionados con depresión, ansiedad y nocicepción. El comportamiento de estos ratones parece ser debido a que la eliminación de la PDE10A provoca un aumento de la activación de las neuronas *medium spiny* del estriado (lugar donde se encuentran altos niveles de expresión de la PDE10A), y que por lo tanto, la función fisiológica del enzima sería de freno en estas neuronas. La fuerte influencia de la PDE10A sobre estas neuronas estriatales junto con el conocimiento de que la disfunción estriatal está implicada en enfermedades del SNC como el Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia y el trastorno compulsivo-obsesivo, sugiere que su inhibición pueda tener efectos terapéuticos para dichas enfermedades (Siuciak et al., 2006).

No existen todavía inhibidores altamente selectivos para esta familia, únicamente encontramos un inhibidor semiselectivo, la papaverina, que provoca una reversión del déficit de atención causado por el PCP (Rodefer et al., 2005), modelo animal utilizado para el estudio del déficit cognitivo que se da en la esquizofrenia. Otros estudios han mostrado un aumento del ARNm de la PDE10A en el hipocampo después de darse LTP (O'Connor et al., 2004), o bien una disminución de este ARNm y de su proteína previa al inicio de los síntomas en el modelo animal de Huntington (Hebb et al., 2004; Hu et al., 2004). Otros inhibidores como IBMX, zaprinast o *dipyridamole* también inhiben la PDE10A, cosa que puede ayudar en el diseño de inhibidores específicos para esta PDE que probablemente esté implicada en varias alteraciones neurológicas (Fujishige et al., 1999a; Rodefer et al., 2005).

4.14. PDE11 (dual equitativo, insensible a rolipram)

Los miembros de esta familia presentan dualidad de sustrato, es decir, son capaces hidrolizar selectivamente tanto el AMPc como el GMPc, sin ninguna preferencia por uno u otro nucleótido. Tanto la K_m como la V_{max} son muy similares para ambos nucleótidos, encontrándose en el rango de 1.0-6.0 μ M para el AMPc o de 0.5 a 4.0 μ M para el GMPc, dependiendo del tejido y de la variante de *splicing* estudiada (Fawcett et al., 2000; Yuasa et al., 2000; Hetman et al., 2000a; Yuasa et al., 2001b).

Hasta la fecha, se ha identificado un único gen, PDE11A, que fue aislado en tejido humano de la musculatura esquelética y la próstata (Fawcett et al., 2000). De éste se han encontrado cuatro variantes de *splicing* (PDE11A1-A4) que difieren en su dominio amino debido al uso de sitios de inhibición diferentes (Yuasa et al., 2000; Hetman et al., 2000a). Mediante mutagénesis (Yuasa et al., 2001b) se encontró que la V_{max} generalmente aumentaba con la longitud de las variantes de *splicing* humanas, aún así la V_{max} de la variante más activa, la PDE11A4, es menor que la de muchas otras PDE. Posteriormente se aisló en el testículo de rata y se describieron cuatro variantes de

splicing altamente homólogas con la secuencia humana de la PDE11A (90-95%) (Yuasa et al., 2001b).

El dominio catalítico de esta familia está situado en la región carboxilo y el regulador en la región amino. Este dominio regulador puede contener hasta dos dominios GAF (característico también de PDE2, PDE5, PDE6 y PDE10), dependiendo de la isoforma a causa de los diferentes lugares de inicio transcripcional (Hetman et al., 2000a). De esta manera encontramos, PDE11A1 que únicamente contiene el dominio GAF más cercano al extremo carboxilo; la PDE11A2 y la PDE11A3 que contiene los dos dominios GAF, pero uno de ellos truncado; y la PDE11A4 que es la única variante que presenta los dos dominios GAF completos (Fawcett et al., 2000; Yuasa et al., 2000). La consecuencia funcional de estos truncamientos no se conoce, pero parecen afectar la actividad catalítica.

Se encontró una elevada expresión del ARNm de la PDE11A mediante análisis por *Northern* en próstata, musculatura esquelética, riñón, hígado, glándulas salivares, pituitaria y testículo humanos (Fawcett et al., 2000). En cuanto a las variantes, se ha encontrado una expresión importante de la PDE11A1 de humanos en musculatura esquelética y próstata (Fawcett et al., 2000; Yuasa et al., 2001a), de la PDE11A3 específicamente en testículo y de la PDE11A4 en próstata (Yuasa et al., 2000). En roedores se detectó una elevada expresión de la PDE11A2 en cerebro, pulmón, musculatura esquelética, próstata, testículo y bazo; de la PDE11A3 únicamente en testículo; y de la PDE11A4 en corazón, cerebro, riñón e hígado (Yuasa et al., 2001b). El estudio de la localización de la proteína ha mostrado cierta controversia debido a la existencia de anticuerpos poco específicos. Algunos autores localizan la proteína de la PDE11A1 en próstata y musculatura esquelética (Fawcett et al., 2000), y mediante el uso de un anticuerpo que detecta todas las variantes de *splicing* de la PDE11A la localizan en células epiteliales, endoteliales y musculatura lisa de muchos tejidos, especialmente en próstata, testículo, riñón, glándula adrenal, colon y piel (D'Andrea et al., 2005), sin embargo en un trabajo reciente no se localizó la proteína de la PDE11A en testículo, ni la de la isoforma PDE11A1 en ningún otro tejido (Loughney et al., 2005).

Poco se sabe sobre las posibles funciones de la PDE11A, en parte debido a la falta de inhibidores selectivos para esta PDE. Sin embargo, la generación del ratón *KO* para la PDE11A, ha sugerido una posible implicación en la espermatogénesis ya que, si bien estos ratones son fértiles, se ha observado una disminución en la concentración y la viabilidad de sus espermatozoides (Wayman et al., 2005).

No se han descrito inhibidores selectivos de la PDE11A, pero se ha visto una afinidad relativamente alta de tadalafil por esta PDE ($IC_{50} \cong 73$ nM) (Weeks et al., 2005). Como ya hemos comentado, tadalafil, junto con sildenafil y vardenafil, son los tres inhibidores de la PDE5 más utilizados en el tratamiento de la disfunción eréctil. Este hecho, ha llevado a especular a algunos científicos en que tadalafil pudiese tener menos efectos secundarios que los otros dos compuestos, gracias al efecto inhibitor sobre la PDE11. Esta idea necesita confirmación ya que los tres compuestos tiene perfiles de seguridad muy similares (Bender and Beavo, 2006).

Otros inhibidores no selectivos que también actúan sobre la PDE11A son IBMX ($IC_{50} \cong 50 \mu\text{M}$), zaprinast ($IC_{50} \cong 12 \mu\text{M}$) y *dipyridamole* ($IC_{50} \cong 0.4 \mu\text{M}$). En cambio esta PDE es insensible a rolipram (Fawcett et al., 2000; Francis et al., 2002a).

5. NEUROINFLAMACIÓN

El sistema inmune es el sistema de defensa desarrollado en vertebrados para la protección del organismo. Podemos encontrar una inmunidad innata no específica compuesta por barreras anatómicas (piel y mucosas); barreras fisiológicas (temperatura, pH, factores solubles como lisozima, citocinas y complemento); mecanismos de endocitosis de macromoléculas, de fagocitosis de material particulado y de respuesta inflamatoria. Por otro lado también disfruta de una inmunidad adquirida que a diferencia de la innata es específica, diversa, tiene memoria y capacidad de diferenciar los antígenos propios de los extraños. Es importante la intercomunicación y el trabajo entre los dos sistemas para eliminar eficazmente el invasor extraño.

La inflamación es una de las respuestas del sistema inmune a una variedad de estímulos como infecciones o daño tisular. De manera general una respuesta inflamatoria de comienzo rápido y duración corta se denomina inflamación aguda. En ocasiones se puede dar una activación persistente e inadecuada de la respuesta inmune dando lugar a una inflamación crónica que puede resultar en un estado patológico por el daño tisular provocado. Esta situación inadecuada es especialmente conflictiva si se da en el sistema nervioso central. La inflamación está considerada como un aspecto patofisiológico importante no sólo en enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la esclerosis múltiple (EM), si no también en la infección y el infarto cerebrales o en el traumatismo encefálico.

Los cuatro signos característicos de una respuesta inflamatoria innata son el rubor, la hinchazón, el calor y el dolor y son la evidencia de que el sistema de defensa del organismo ha movilizó neutrófilos y monocitos hacia el sitio de infección (Perry et al., 1995). Estos signos van acompañados de cambios en la expresión de moléculas como citocinas o moléculas de adhesión en el sitio de inflamación, la activación de células endoteliales, la migración de células inflamatorias y la extravasación de proteínas plasmáticas, la activación tisular y la proliferación de células inmunes y locales resultando un influjo de linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y mastocitos hacia el sitio de inflamación para la eliminación del antígeno y la reparación del tejido dañado. Como ya hemos comentado la duración e intensidad de esta respuesta debe ser cuidadosamente regulada para controlar el daño tisular y para facilitar los mecanismos reparadores. Cuando el patógeno perdura en el tiempo se acaba desarrollando una respuesta inflamatoria crónica dando lugar a un daño tisular importante.

En el SNC encontramos respuestas inflamatorias agudas, por ejemplo, durante una meningitis, sin embargo durante alteraciones neurodegenerativas o autoinmunes es más habitual encontrar cambios inflamatorios crónicos.

Es bien conocido que la respuesta inmune del SNC es diferente a la que se da en las meninges, los órganos circumventriculares y los órganos periféricos. Incluso encontramos diferencias entre la respuesta que se da en el parénquima cerebral y la que se desencadena en el parénquima de la médula espinal frente a un mismo estímulo o daño (Schnell et al., 1999a; Schnell et al., 1999b). Esta idea apareció inicialmente al encontrarse una mayor supervivencia de los trasplantes cerebrales respecto a otro tipo de trasplantes (Cserr and Knopf, 1992) así como el patrón de crecimiento inusual de virus o el crecimiento agresivo de tumores en el SNC (Lampson, 1987). Por otro lado la composición celular y las características biológicas del SNC, al compararlas con las de los órganos periféricos, pueden explicar la diferencia en la respuesta y las peculiaridades de la neuroinflamación y su tratamiento.

Para que se genere una respuesta inmune se necesitan tanto macrófagos como linfocitos. Mientras que los macrófagos están ya en el cerebro, en condiciones normales los linfocitos no están presentes en un estado maduro, sino que encontramos linfoblastos que pueden permanecer un par de días en el cerebro, y posteriormente ser activados y comenzar, junto con los macrófagos, una respuesta inmune (Thomas, 1999).

Desde hace tiempo se ha considerado que el cerebro y los ojos (cuya retina es una prolongación más del sistema nervioso) son órganos con privilegio inmunológico. Parece ser que el SNC goza de este privilegio inmune ya que una respuesta inmune en esta zona puede ser especialmente crítica. Existen varios factores que contribuyen a argumentar que la respuesta inmune en el cerebro es especialmente crítica. Por ejemplo, el elevado metabolismo oxidativo del cerebro generando radicales de oxígeno y nitrógeno, además de los bajos niveles de mecanismos antioxidativos, la limitada proliferación de las pocas células precursoras junto con las elevadas tasas metabólicas de los oligodendrocitos y las neuronas dan lugar a una elevada susceptibilidad del cerebro al daño. Por otro lado, bajo situaciones patológicas o con el envejecimiento normal del SNC, se da una reducción de la expresión de factores tróficos, una disfunción o sobrecarga del sistema ubiquitina-proteosoma que provoca la acumulación de agregados de proteínas, junto con el aumento del glutamato extracelular y de señales proapoptóticas, pueden desencadenar un daño tisular que provoque una activación de la microglía y los astrocitos.

Existe un constante debate sobre si la inflamación es causa o consecuencia del daño tisular en el SNC. Parece ser que esta afirmación depende de la patología. Existe una tendencia a pensar que en la esclerosis múltiple las alteraciones proinflamatorias son las primeras en aparecer (Sospedra and Martin, 2005), mientras que en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson las primeras alteraciones que se observan son cambios degenerativos y la agregación de depósitos (Selkoe, 2004).

A pesar de lo crítica que puede ser la respuesta inmune en el SNC, cabe destacar que también es necesaria para reparar los tejidos. Por este motivo es importante el conocimiento de la comunicación entre el sistema inmune y el SNC además de saber qué factores son beneficiosos y cómo manipularlos para su intervención terapéutica.

A continuación se comentarán los factores importantes de la neuroinflamación como son el privilegio inmunológico, y las células y moléculas que intervienen en los procesos reparadores y en los dañinos.

5.1. PRIVILEGIO INMUNE DEL SNC

Mucho se ha hablado sobre la situación inmunológica especial que se da en el SNC y de los diferentes factores que influyen en esta característica.

La comunicación entre el SNC y el sistema inmune está restringida a nivel eferente por el escaso drenaje linfático, y a nivel aferente por la barrera hematoencefálica (BHE) (Cserr and Knopf, 1992). Esta escasa comunicación explicaría la observación de la ausencia de linfocitos, granulocitos y células dendríticas en el SNC de mamíferos sanos.

Parte de esta restricción se debe a la BHE que, mediante un control estricto sobre el paso de células, macromoléculas e, incluso, pequeños iones (Rubin and Staddon, 1999), realiza la función fisiológica del mantenimiento de la homeostasis iónica (necesario para la señalización e integración neuronal) y la protección del SNC frente a variaciones de composición del plasma o a la presencia de xenobióticos (capaces de alterar las funciones neuronales) (Abbott and Romero, 1996). Esta barrera está formada por un endotelio no fenestrado, con uniones fuertes (*tight junctions*) envuelto por células perivasculares (pericitos) que comparten la lámina basal con los endotelios y contactan con los astrocitos y la microglía perivasculares. A pesar de que esta barrera se encuentra distribuida a lo largo de todo el SNC, existen regiones donde esta unión no es tan fuerte, a través de las cuales puede darse la entrada de células T activadas y de patógenos. Estas áreas altamente vascularizadas se conocen como órganos circumventriculares, entre los que encontramos el órgano subfornical, el órgano vasculoso de la lámina terminal, la glándula pineal, el órgano subcomisural, la eminencia media, el área postrema y los plexos coroideos. Estos últimos están formados por un epitelio con grandes vasos sanguíneos fenestrados y no contienen somas neuronales, mientras que el resto son estructuras formadas por neuronas especializadas en neurosecreción y/o quimiosensibilidad y por un endotelio agujereado y que se encuentran separados del parénquima cerebral por una barrera externa de glía y del líquido cefalorraquídeo por un epéndimo.

Otro factor que influye en el privilegio inmune del SNC es la falta de expresión del complejo de histocompatibilidad mayor (*major histocompatibility complex*, MHC) en la superficie de las neuronas, glía, oligodendrocitos, microglía o en ninguna otra célula del parénquima en condiciones normales. Al no existir estas moléculas en la superficie celular, estas células no son capaces de presentar el antígeno de manera reconocible para los linfocitos y por lo tanto no interactuarán con las células T inmunocompetentes que por alguna razón se encuentren en el parénquima cerebral (Lampson, 1987). Sin embargo estas moléculas pueden regularse a la alza en condiciones diferentes como se da en la cercanía de tumores neurales, después de infecciones víricas en las placas de enfermos con EM, tratando con IFN γ estos pacientes (Steinman, 1993) o después de la inyección intracerebral de esta citocina. Además en el SNC se producen

citocinas antiinflamatorias (por ejemplo TGF β) y neurotrofinas que mantienen el SNC inmunosuprimido (Neumann, 2000).

A pesar de todos estos factores que contribuyen a la situación de privilegio inmunológico del SNC, éste no es absoluto, y por lo tanto podemos encontrar en cerebro tanto respuestas inmunes como autoinmunes.

Quisiera volver a comentar, que si bien se ha hablado de lo perjudicial o dañina que puede llegar a ser una respuesta inflamatoria para el SNC, es importante saber que en ocasiones es beneficiosa o neuroprotectora. Existen muchos trabajos en los que se demuestra una acción inmunosupresora de la citocina proinflamatoria TNF α (Scherbel et al., 1999), de la estimulación de la producción de factores neurotróficos por la IL-1 β (Lindholm et al., 1987), del papel protector de macrófagos o linfocitos T o bien de la producción de factores neurotróficos por parte de células inflamatorias que constituyen un mecanismo de protección neuronal (Correale and Villa, 2004). Esta dualidad funcional, dañina o beneficiosa según el contexto, de un mismo componente sugiere la necesidad de entender en profundidad las reacciones inflamatorias, el papel de cada componente y el balance necesario para diseñar terapias eficaces para enfermedades neuroinflamatorias.

5.2. COMPONENTES CELULARES DE LA NEUROINFLAMACIÓN

5.2.1. Células presentadoras de antígeno

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*) más potentes y se encargan de capturar y procesar el antígeno y, después de migrar hacia varios órganos linfáticos, lo presentan en un contexto adecuado para que pueda ser reconocido por los linfocitos T y se inicie una respuesta inmune. Las APC expresan altos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad II (MCH-II en la rata, HLA *human leukocyte antigen* en el humano), que es la molécula que presenta el antígeno y la que permite que los linfocitos T reconozcan el antígeno y se activen.

En el SNC las APC pueden originarse de células sanguíneas infiltradas, de los plexos coroideos, de las meninges (Pashenkov et al., 2002) o de la microglía (Santambrogio et al., 2001). También se ha visto que las células endoteliales, la microglía/macrófago perivascular o la astrogía son APC en potencia, es decir bajo determinadas situaciones son capaces de expresar MCH y de presentar antígenos.

5.2.2. Microglía

En todos los tejidos del cuerpo existen macrófagos residentes que son la primera línea de defensa contra el daño tisular o la infección. En el parénquima del SNC estos macrófagos se denominan microglía y son sus principales células inmunes.

Autores diferentes proponen distintos orígenes para estas células. Mediante el uso de marcadores de microglía se llegó a la conclusión de la existencia de dos poblaciones diferentes: la microglía primitiva fetal (lectina de tomate +), que aparece en estadios iniciales del desarrollo originada de células mesenquimales en el saco embrionario (Kaur et al., 2001) y parece entrar a través de la pía en estados iniciales del desarrollo,

y los macrófagos derivados de monocitos (lectina de tomate +/CD68 +), originada en la médula ósea y cuya aparición en el sistema nervioso central coincide con la vascularización en estados posteriores (Andjelkovic et al., 1998). Por otro lado otros autores sugieren un origen mesodérmico (Hickey et al., 1992; Ling and Wong, 1993) a diferencia de otros que le atribuyen un origen neuroectodérmico como al resto de células gliales y del parénquima nervioso (Fedoroff et al., 1997).

Estas células tienen características comunes con macrófagos sistémicos como la expresión de receptores de respuesta inmune innata o la capacidad de fagocitar patógenos, células o desechos celulares (Nakajima and Kohsaka, 1993).

La microglía, bajo condiciones normales se encuentra en estado quiescente (Perry and Gordon, 1991). A pesar de este estado de reposo, son células con una rápida capacidad de respuesta frente a cambios en el microambiente del SNC (Kreutzberg, 1996), incluso en condiciones en las que no se da una degeneración neuronal como en modelos de depresión (Gehrmann et al., 1993) o en modelos de epilepsia (Shaw et al., 1990).

La activación de la microglía se manifiesta por cambios morfológicos, aumento de la proliferación y una diferenciación funcional que engloba el aumento regulado de moléculas del complejo MHC, la secreción de citocinas y quimiocinas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), hasta llegar a un estado final de activación en el que la microglía se vuelve fagocítica. Así pues, la microglía puede encontrarse en el SNC en tres estados: en reposo, activada (cambio de morfología producido cuando el daño tisular es leve y por lo tanto es un estado reversible) o fagocítica (transformación irreversible debida a la muerte celular en la región a partir de la cual la microglía empieza a fagocitar y degradar el material que proviene de estas células muertas) (Streit and Kincaid-Colton, 1995).

Basándonos en criterios histológicos la microglía puede dividirse en dos grupos principales: la microglía del parénquima (localizada próxima a las neuronas en la sustancia gris y entre los haces de fibras en la sustancia blanca, con una baja tasa de recambio y una elevada capacidad de proliferación (Thomas, 1992)) y la microglía perivascular o células perivasculares (tipo especializado de microglía que se localiza de manera estratégica en la BHE manteniendo un contacto estrecho con la vasculatura cerebral, con una función principal de limpieza del espacio perivascular (Kida et al., 1993), una alta tasa de recambio (Hickey et al., 1992) y no se divide (Jordan and Thomas, 1988)). Parece ser que las células perivasculares, que algunos autores consideran la última línea de defensa de la BHE (Broadwell and Salzman, 1981; Mato et al., 1996), tienen una mayor eficiencia como APC en comparación con la microglía parenquimal (Carson et al., 1998; Carson, 2002) ya que, posiblemente por su localización anatómica, tienen mejor acceso a los linfocitos T circulantes (Angelov et al., 1998), a pesar de que ambos grupos expresan altos niveles de MHC-II bajo condiciones no patológicas (Ulvestad et al., 1994). Sin embargo, bajo condiciones inflamatorias, parece ser que es la parenquimal la que aumenta la expresión de MHC-II indicando su participación en la presentación de antígeno. Existen experimentos que sugieren que las áreas perivasculares son lugares de acumulación y de interacción

especial entre células inmunes imprescindible para que se desencadene una respuesta inmune.

En principio la activación microglial es un mecanismo de defensa para eliminar patógenos y material de desecho y para promover la reparación del tejido, pero a la vez esta activación, mediante la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β), especies reactivas de oxígeno y NO, junto con la invasión estructural que se produce con la activación pueden contribuir al proceso degenerativo. Se ha visto que la microglía reactiva puede causar la muerte neuronal por la producción de NO, que inhibe la respiración neuronal provocando una liberación de glutamato y la consiguiente excitotoxicidad (Bal-Price and Brown, 2001).

Además la participación de la microglía está clara en enfermedades neurodegenerativas (como Alzheimer o Parkinson, donde se ve una activación de la microglía en los lugares de degeneración neuronal que caracterizan estas enfermedades); en enfermedades autoinmunes (como la encefalomiелitis autoinmune experimental, EAE, o la esclerosis múltiple que, aunque se caracterizan por ser mediadas por células T, también se ha visto infiltración de macrófagos y un papel importante de las células perivasculares que median la presentación de antígeno a los linfocitos autoreactivos); en enfermedades infecciosas (como la demencia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida en la que hay una activación de macrófagos y microglía que producen TNF α , asociada a la disfunción neuronal de esta demencia) o alteraciones isquémicas (como ocurre en la isquemia focal cerebral, en la que se da una activación temprana de la microglía en el borde de la zona de infarto).

5.2.3. Astroglía

Los astrocitos son las células encargadas del mantenimiento de la homeostasis en el SNC en condiciones de salud. Debido al gran número de receptores que expresan, pueden actuar de centinelas ya que son capaces de responder a diferentes compuestos neuroactivos como neurotransmisores, neuropéptidos, factores de crecimiento, citocinas y toxinas.

En condiciones patológicas, cuando se da una alteración de la homeostasis del cerebro o cuando hay un daño del tejido, los astrocitos son capaces de detectarla y se activan para proteger al resto de células de dicha alteración. Los astrocitos activados son capaces de metabolizar el glicógeno almacenado para proveer de glucosa o lactato a las neuronas vecinas; aumentar los transportadores de glutamato para prevenir la excitotoxicidad que su acumulación provoca en el SNC; aumentar las proteínas antioxidantes citosólicas para la eliminación de xenobióticos y radicales libres; promover la revascularización y la remielinización; restaurar la BHE; y estimular la supervivencia neuronal y la sinaptogénesis mediante la producción de factores neurotróficos (Liberto et al., 2004).

En función del daño o de la patología de que se trate, los astrocitos van a responder de diferente manera y podemos encontrar astrocitos reactivos o activados.

Cuando el daño tisular es importante encontramos astrocitos reactivos, cuyos rasgos característicos son la hipertrofia, la proliferación, la extensión de las prolongaciones (*processes*), el aumento su actividad metabólica y de la síntesis de factores de crecimientos y tróficos, y el incremento importante de la producción de filamentos intermedios como la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), la vimentina y la nestina. Esta batería de respuestas del astrocito se denomina gliosis anisomórfica, y tiene como resultado la formación de una cicatriz astrogial (Norton et al., 1992; Norenberg, 1994) donde, debido a la producción de citocinas proinflamatorias, a los metabolitos de ácido araquidónico, de NO o de ROS no se da una regeneración del tejido o reparación del daño (Neumann et al., 2002). Cabe destacar que a pesar de la producción de estos compuestos tóxicos para el tejido por parte de los astrocitos, la microglía los sintetiza en mayores cantidades siendo la causante más importante de este daño (Liberto et al., 2004). Este es el caso de traumatismos encefálicos, EAE o esclerosis múltiple (Rohl et al., 2007).

En ocasiones en las que el daño del tejido no es tan importante y es pasajero encontramos astrocitos activados que dan lugar a una gliosis isomórfica. En este caso los cambios que encontramos en los astrocitos son un aumento de tamaño de la célula seguida de una hipertrofia nuclear y de un aumento de la producción de enzimas citosólicos, antioxidantes, proteínas estructurales y orgánulos, además de la síntesis de factores de crecimiento y factores tróficos solubles que ayudarán a la supervivencia de las neuronas y células gliales junto con la reparación tisular. En este caso los astrocitos contribuyen a recuperar la homeostasis. Es el caso de una infección neuroinflamatoria, de la enfermedad de Alzheimer o de la enfermedad de Parkinson.

Los astrocitos no expresan constitutivamente MCH-II en condiciones normales, pero en estudios realizados *in vitro*, se ha visto una inducción de esta expresión tras la estimulación con citocinas proinflamatorias, considerándose así APC en potencia (Fierz et al., 1985; Shrikant and Benveniste, 1996). Los astrocitos, al no ser APC profesionales, pueden fallar en la presentación del antígeno y por lo tanto en la activación completa de las células T, favoreciendo así su apoptosis. Este hecho, junto con la posibilidad de expresar mediadores antiinflamatorios (TGF β , PGE $_2$, IL-10) sugiere que los astrocitos pueden estar implicados en la regulación y limitación de la respuesta inflamatoria frente a un daño en el SNC (Khoury et al., 1992).

5.2.4. Células endoteliales

Las células endoteliales que forman parte de la BHE están unidas por uniones fuertes (*tight junctions*) y juegan un papel importante en el mantenimiento del microambiente del SNC (Perry et al., 1997). A pesar de su localización anatómica y de la posibilidad de expresar MCH-II y moléculas coestimuladoras bajo determinadas circunstancias (Cannella et al., 1991) tienen baja capacidad de ser APC (Risau et al., 1990).

Además, en condiciones normales, el endotelio cerebral expresa bajos niveles de moléculas de adhesión (VCAM *vascular cell adhesion molecule*, ICAM-1 *intercellular adhesion molecule 1*, PCAM-1 *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*, JAM-1 *junctional adhesion molecule-1*). Bajo condiciones inflamatorias, como en la esclerosis

múltiple o la EAE, se da un aumento de la expresión de estas moléculas en estas células y en las perivasculares que permite la unión de linfocitos activados circulantes y su posterior entrada en el SNC (Dietrich, 2002). La unión de los linfocitos a ICAM-1 induce cambios en el citoesqueleto endotelial, en la transcripción y en las uniones interendoteliales, que modificaran la disposición de los endotelios para la diapedesis de los leucocitos (Turowski et al., 2005). Existen trabajos *in vivo* e *in vitro* en los que interfiriendo sobre la señalización de ICAM-1 se reduce eficientemente la migración de los leucocitos en modelos de inflamación del SNC (Male et al., 1994; Greenwood et al., 1995; Kobayashi et al., 1995; Morrissey et al., 1996; Pryce et al., 1997; Wong et al., 1999). Además, el uso de anticuerpos que reconocen la molécula de adhesión JAM-1 interfieren en la migración de leucocitos a través de las células endoteliales (Martin-Padura et al., 1998; Del Maschio et al., 1999).

Estas células juegan un papel importante en la transmigración leucocitaria, en parte, gracias a la ICAM-1 y por lo tanto el uso de fármacos que influyan sobre esta molécula o en algún paso de su vía de señalización tendrán un efecto importante sobre el reclutamiento de leucocitos hacia el SNC (Turowski et al., 2005).

5.2.5. Neuronas

Las neuronas, a pesar de jugar un papel esencial en la supervivencia del organismo, tienen una limitada capacidad de dividirse. Esto hace que, como hemos comentado en el apartado del privilegio inmunológico, en circunstancias fisiológicas no expresen moléculas MHC y así se evite el daño mediado por células inmunes, incluso aunque la neurona sea infectada por un virus neurotrófico, como sería el virus herpes simplex. Únicamente en el caso de que la actividad funcional de la neurona se vea comprometida ésta podría empezar a expresar MHC-I y así ser eliminada por las células T (Neumann et al., 1995; Neumann et al., 1997).

Entre las neuronas y las células inmunes existe una comunicación importante a través de la secreción de neurotransmisores, neuropéptidos, citocinas y quimiocinas tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. Esta comunicación se ha estudiado utilizando modelos experimentales de inducción de fiebre, la activación de eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPAA, *hypothalamus pituitary adrenal axis*) o en modelos de comportamiento. A pesar de que estas respuestas se regulan en diferentes áreas del SNC, todas ellas necesitan recopilar información del estado periférico para ordenar una respuesta coordinada. La IL-6 es la citocina a la que se le ha atribuido esta función comunicadora del estado periférico hacia el SNC y parece actuar a nivel central induciendo la expresión de prostaglandina E2 (PGE2) en la vasculatura cerebral, que alterando la actividad neuronal de HPAA controlará la temperatura corporal y la respuesta comportamental (Hopkins, 2007).

5.2.6. Células inflamatorias procedentes de sangre

En condiciones fisiológicas encontramos muy pocas células inmunes en el SNC si se compara con las que se encuentran en tejidos periféricos (Hickey, 1999) y es debido, en parte, al privilegio inmune característico del SNC. Sin embargo en condiciones inflamatorias se da un reclutamiento de leucocitos con el objetivo de atacar a los

patógenos y reparar el daño. Entre las células reclutadas se encuentran neutrófilos, linfocitos, monocitos y/o mastocitos que deben abandonar el torrente sanguíneo a través de la pared del vaso. Para ello es necesario que las uniones fuertes se abran y se cierren permitiendo a las células inmunes pasar hacia el parénquima cerebral además de una adhesión firme de las células a la pared del vaso, es decir a la membrana de la célula endotelial. Esta fijación se da gracias a la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1 y ICAM-1) o selectinas (L-, P-, E-selectina) en la superficie del endotelio, y a la de integrinas en la membrana del leucocito (LFA-1, Mac-1 y VLA-4) (Osborn, 1990; Springer, 1994). El hecho de que estas moléculas sean necesarias para la diapédesis de las células inflamatorias hacia el parénquima cerebral, junto con que enfermedades como la esclerosis múltiple, la EAE, el Alzheimer o el Parkinson tengan un componente neuroinflamatorio en su patología que está caracterizado por la extravasación de leucocitos en el SNC, hace pensar la posibilidad de que actuando farmacológicamente sobre estas moléculas se puede conseguir una acción antiinflamatoria (Turowski et al., 2005). Se han realizado experimentos con el modelo animal de esclerosis múltiple en los que tras administrar anticuerpos contra la ICAM-1 se produce una reducción de la infiltración linfocitaria (Archelos et al., 1993; Morrissey et al., 1996).

Existen tres vías de entrada de leucocitos periféricos hacia el SNC: (1) hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de los plexos coroideos o de los vasos de las meninges en el espacio subaracnoideo; (2) hacia el parénquima perivascular de cerebro a través de BHE; y (3) de sangre hacia parénquima perivascular de médula espinal a través de BHE (Ransohoff et al., 2003). La primera vía de entrada es la utilizada por los leucocitos en condiciones fisiológicas para la vigilancia inmune del SNC, mientras que las otras dos vías son las que predominan en condiciones en que el SNC está alterado.

Las diferentes células que hemos comentado participan en diferentes estados de neuroinflamación o de daño autoinmune en el SCN (Sospedra and Martin, 2005).

5.3. COMPONENTES HUMORALES DE LA NEUROINFLAMACIÓN

Las células gliales del SNC son una fuente importante de citocinas, quimiocinas y neurotrofinas. Su producción es especialmente notable bajo circunstancias de inflamación en el SNC, como por ejemplo en la esclerosis múltiple o la EAE.

5.3.1. Citocinas

Las citocinas son moléculas esenciales para la comunicación bidireccional entre la glía y las neuronas en condiciones de neuroinflamación, neurodegeneración y neuroprotección. Mientras los astrocitos y la microglía son productores importantes de varios tipos de citocinas (proinflamatorias, reguladoras, antiviricas, factores de crecimiento y quimiocinas) algunas de las cuales actúan sobre las neuronas, éstas, las neuronas, también son fuente de quimiocinas (como fractalkine o SLC-1) que influyen sobre la función de la microglía o los astrocitos (Harrison et al., 1998; Biber et al., 2001).

El SNC en condiciones fisiológicas presenta niveles muy bajos, prácticamente indetectables, de citocinas, que aumentan considerablemente en estados patofisiológicos en los que se da neuroinflamación.

Encontramos una gran variedad de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que actúan a diferentes niveles de la respuesta inflamatoria.

Históricamente se ha considerado que las citocinas mediadoras de inflamación ejercen una función negativa, pero actualmente se les atribuye un papel dual en el SNC, es decir la misma molécula puede ejercer efectos nocivos y/o beneficiosos (Lenzinger et al., 2001; Kerschensteiner et al., 2003). El balance entre estos efectos determinará el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Una de las citocinas iniciadoras, IL-1 puede inducir la producción de mediadores inflamatorios como $TNF\alpha$ o IL-6 en astrocitos (Basu et al., 2004), y a su vez, a bajas concentraciones, puede inducir la producción del factor de crecimiento neuronal NGF (*nerve growth factor*) por parte de astrocitos y así aumentar la supervivencia neuronal *in vitro* (Friedman et al., 1990). Otro ejemplo lo encontramos en ratones transgénicos en los que el IFN- α , producido crónicamente por los astrocitos, genera una encefalopatía inflamatoria y a la vez confiere una resistencia a la infección vírica del SNC (Akwa et al., 1998).

Existen numerosos trabajos con ratones transgénicos para el gen de alguna de las citoquinas en los que se observa que la expresión inducida de estos genes en el SNC provoca, en la mayoría de los casos, alteraciones neuroinflamatorias (Campbell, 2005). Este es el caso de la inducción, en astrocitos, de la producción de IL-3 ya que favorece la acumulación de macrófagos/microglía altamente activados en la sustancia blanca dando lugar a una enfermedad desmielinizante (Chiang et al., 1996), o bien la de la producción de IL-6 que activa la expresión de muchos genes de respuesta de fase aguda como el complemento C3 o la metalotioneína (Campbell and Powell, 1996).

El modelo de EAE también se ha utilizado ampliamente para el estudio la respuesta inflamatoria y de la expresión de sus genes (Martinez et al., 1999a).

5.3.2. Quimiocinas (citocinas quimiotácticas)

Las quimiocinas y sus receptores (de la familia GPCR) juegan un papel principal en la migración direccionada de leucocitos tanto en condiciones fisiológicas (durante la embriogénesis, incluyendo el desarrollo del SNC, y durante la vigilancia inmune del organismo) como patológicas (particularmente durante la neuroinflamación).

Se conocen diferentes subfamilias de quimiocinas [CC (CCL2), CXC (CXCL12, CXCL10, CXCL8, CXCL1), CX₃C (CX₃CL1) y C)] algunas de las cuales se encuentran reguladas de diferente manera en los diferentes patrones de esclerosis múltiple (Ubogu et al., 2006).

Existen diferentes tipos celulares que se encargan de producirlas: linfocitos T, monocitos, células endoteliales, microglía, astrocitos y neuronas. Una vez secretadas, su actividad está controlada por proteólisis mediada por metaloproteasas (MMP) de la matriz extracelular.

Estas moléculas se han implicado en la patogénesis de enfermedades como la demencia asociada a al virus HIV, el Alzheimer, la esclerosis múltiple, el infarto y el trauma cerebral (Mennicken et al., 1999; Bajetto et al., 2001; Bajetto et al., 2002; Ransohoff, 2002). También se han estudiado en el modelo animal de EAE, encontrando una correlación temporal y espacial de la expresión de la CCL2 con la distribución de los infiltrados inflamatorios (Karpus and Ransohoff, 1998) y con la actividad clínica de la enfermedad (Glabiniski et al., 1998).

Así pues también se han propuesto como posible diana terapéutica para el tratamiento de procesos neuroinflamatorios. Se han estudiado varios de los receptores de quimiocinas en modelos animales utilizando pequeñas moléculas antagonistas que bloquean la señalización intracelular y por lo tanto el reclutamiento. El compuesto TAK779, antagonista de los receptores CCR5 y CXCR3, tiene un uso potencial para tratar esclerosis múltiple, aunque limitado por su bajo poder de absorción oral y su rápida eliminación (Muller et al., 2004).

5.3.3. Formación de radicales y daño oxidativo

Tal y como se ha comentado anteriormente, el NO (y otras especies reactivas de nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS)) está involucrado en la neuromodulación, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica, pero también en procesos patológicos como la neurodegeneración y la neuroinflamación. La neuroinflamación puede ser causa o consecuencia del estrés oxidativo crónico. La microglía estimulada por citocinas genera grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y de RNS, a las que, tal y como se ha comentado ya, tanto las neuronas como los oligodendrocitos son especialmente vulnerables debido a la gran superficie de membrana que tienen estas células y a sus altas necesidades energéticas. Hay una gran cantidad de estudios sobre el NO y su metabolito tóxico, el peroxinitrito, y se ha visto que puede inhibir componentes de la cadena respiratoria provocando una deficiencia energética e incluso la muerte celular. Además los oxidantes pueden estimular la transcripción de genes proinflamatorios en glía, desencadenando una reacción inflamatoria.

5.3.4. Vías del ácido araquidónico

Los fosfolípidos de membrana dan lugar al ácido araquidónico (AA) por acción de la de fosfolipasa A (PLA2) y posteriormente es transformado por la ciclooxigenasa 2 inducible (COX2) para dar lugar a las prostaglandinas (Murakami and Kudo, 2004). Estas últimas se cree que son las mediadoras de las acciones centrales inducidas por la administración del LPS en periferia como la generación de fiebre o la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPAA) (Steiner et al., 2006). De hecho el incremento de la producción de prostaglandinas se ha visto correlacionado con neuropatologías inflamatorias (Katsuki and Okuda, 1995; Yermakova and O'Banion, 2000; Bazan et al., 2002). La producción de prostaglandinas está controlada por la actividad fosfolipasa (PLA2) y por la ciclooxigenasa (COX).

La PLA2 está implicada en la liberación de neurotransmisor, la LTP, el crecimiento y la diferenciación, y la reparación de la membrana en condiciones normales, mientras

que en condiciones patológicas los altos niveles de metabolitos lipídicos generados por la PLA2 están relacionados con la neuroinflamación, el estrés oxidativo y el daño neuronal.

La PLA2 puede ser activada por la IL-1 y el TNF α y de esta manera liberar ácido araquidónico (AA) (Farooqui and Horrocks, 2004). La liberación de AA, docosahexaenoic acid y la formación de prostaglandinas está principalmente controlada por los astrocitos. El AA puede estar involucrado en el daño tisular irreversible por su acción neurotóxica o puede tener efectos beneficiosos debido a tu acción neurotrófica (Katsuki and Okuda, 1995; Consilvio et al., 2004).

6. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que, al afectar primeramente a áreas del hipocampo y cortezas asociativas, se manifiesta con un deterioro progresivo de funciones cognitivas, pérdida de memoria y finalmente demencia. Es una enfermedad cuya incidencia aumenta con la edad, y teniendo en cuenta que la esperanza de vida de la población cada vez es mayor, se dirige gran parte de la investigación al estudio en esta enfermedad. Por este motivo existen múltiples teorías que incluyen tanto factores genéticos como epigenéticos (el ambiente y metabolismo).

A nivel neuropatológico esta demencia se caracteriza por la acumulación progresiva de material insoluble que puede ser en forma de depósitos extracelulares de la proteína β -amiloidea, conocida como placa β -amiloide, y/o cambios neurofibrilares de proteína Tau en el interior de las células, conocidos como "tangles" u ovillos fibrilares (Selkoe, 1991; Braak and Braak, 1997; Braak et al., 1998). Además se ha descrito una pérdida neuronal y una inflamación secundaria (McGeer and McGeer, 2001; Weiner and Frenkel, 2006). Alrededor de las placas seniles se ha observado una intensa reacción glial compuesta por astrocitos reactivos y microglia activada (Lue et al., 1996). Estas células representan la contrapartida cerebral de los monocitos y macrófagos del sistema inmunológico que contribuyen a la respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria e inmune es amplificada y mantenida por citocinas proinflamatorias. Se sabe que tanto los astrocitos como la microglia en cultivo son capaces de producir y liberar numerosas citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, tanto la microglia como los astrocitos producen interleucinas tales como la IL-1a, IL-1b, IL-3, IL-6, el factor de necrosis tumoral TNF α , y el factor estimulante de colonias CSF (McGeer and McGeer, 1995)

En la EA se ha podido mostrar que los niveles de algunas de estas citocinas, por ejemplo TNF α o IL-1b, están elevados con respecto a los niveles observados en controles y se ha especulado sobre la posibilidad que este aumento podría estar asociado con la presencia de placas seniles. Aparte de las citocinas, también se han encontrado otros componentes de la respuesta inflamatoria, tales como las proteínas del complemento y sus activadores. McGeer y McGeer (1995) revisaron todos estos resultados. Un examen de todas estas observaciones ha conducido a lo que se

denomina la “hipótesis inflamatoria de la enfermedad de Alzheimer” (McGeer et al., 1990; Rogers et al., 1996). Tradicionalmente se ha considerado que la reacción inflamatoria era secundaria a la neurodegeneración y que su papel era sencillamente la eliminación de los detritus celulares resultantes de la patología preexistente. La hipótesis inflamatoria de la EA postula, sin embargo, que las moléculas y los mecanismos inflamatorios son característicos de la enfermedad y que en la EA dichos mecanismos están elevados de una forma significativa y sugiere, en segundo lugar, que la inflamación es un componente necesario y primario de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto asume que la inflamación puede ser una causa suficiente para la neurodegeneración, es decir que la inflamación no es puramente un epifenómeno de la lesión (Palmer, 2002).

La hipótesis inflamatoria sugiere que tratamientos con antiinflamatorios deberían de resultar en un efecto positivo, retardando o enlenteciendo el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Los llamados antiinflamatorios no esteroideos (inglés: NSAID; español: AINE) son una de las terapias más ampliamente utilizadas en todo el mundo en el tratamiento del dolor, la osteoartritis y la artritis reumatoide, entre otras. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por inhibición de las ciclooxigenasas (COX) 1 y 2. El interés en el uso de AINE en la prevención de la EA data de 1990, que fue cuando McGeer reportó una curiosa coincidencia. Su equipo descubrió que los pacientes de artritis, que toman regularmente AINE para controlar el dolor, presentaban un riesgo inesperadamente bajo de tener la EA. Desde entonces este beneficio aparente se ha visto en otros estudios epidemiológicos (Lassmann et al., 2001; Palmer, 2002). El efecto beneficioso de los AINE sobre la EA proviene de resultados en los que además de su efecto sobre la reducción de la formación del péptido A β 42, estos compuestos limitan la producción de placa en ratones que sobreexpresan genes mutantes que causan la EA y que activan la microglía (The 8th International Conference on Alzheimer’s Disease and related disorders, Stockholm, 2002). En la actualidad hay varios ensayos clínicos en marcha con mayor número de pacientes y con duración más prolongada (5-7 años) y mayor rigurosidad. Otra terapia también utilizada ampliamente para el tratamiento de reacciones inflamatorias es el uso de corticosteroides. En un estudio (Aisen et al., 1996) con Prednisona con 150 pacientes, se ha hallado de nuevo un efecto positivo, confirmando de nuevo que otro antiinflamatorio tiene efectos positivos en la EA.

En resumen, tanto los datos sobre la presencia de células de la reacción glial alrededor de las placas seniles, la demostración de que estas células gliales liberan moléculas tales como las citocinas proinflamatorias que pueden contribuir al daño celular, como el efecto de antiinflamatorios no esteroideos y corticoides observado de una manera retrospectiva o prospectiva en humanos, sugieren que los mecanismos inflamatorios están claramente implicados en el desarrollo de la EA y que moléculas antiinflamatorias podrían ser un tratamiento para prevenir o enlentecer el desarrollo de la EA. De hecho, esta hipótesis autotóxica a través de mecanismos de daño neuronal a consecuencia de daños inflamatorios, no se limita a la enfermedad de Alzheimer y es posible que sea también un mecanismo que interviene en otras lesiones

neurodegenerativas, por ejemplo en la esclerosis lateral amiotrófica e incluso en la esclerosis múltiple.

7. MODELOS ANIMALES

7.1. INFLAMACIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO

El lipopolisacárido (LPS), uno de los componentes de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, se encuentra entre los agentes inductores de inflamación más potentes (Andersson et al., 1992), y por ello se ha utilizado extensamente para el desarrollo de diferentes modelos de inflamación.

El LPS es un antígeno PAMP que media su acción uniéndose al CD14 y a receptores TLR (*toll-like receptors*, de la familia de los GPCRs), concretamente a los TLR4 y, en ausencia de TLR4 o con altas concentraciones de algunas especies de LPS, también a TLR2 (Elson et al., 2007). La unión de los PAMPs a los TLR induce la reprogramación de células inmunes, como por ejemplo la maduración de las células dendríticas para producir moléculas coestimuladoras y aumentar así su capacidad presentadora de antígeno, o activa procesos inflamatorios, mediante la inducción de genes antimicrobianos y de citocinas inflamatorias (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002) (como NF- κ B, IFN- β), además de procesos de coagulación o muerte celular.

La respuesta inflamatoria se ha estudiado en periferia y en el SNC administrando el LPS por distintas vías de administración (i.p., i.v., intracerebral, intraventricular, etc) y con diferentes concentraciones (subséptica inferior a 500 μ g LPS / Kg o séptica superior a 500 μ g LPS / Kg).

Se han descrito modelos de choque séptico (Fearn et al., 1995; Howard and Olson, 2000; Turrin et al., 2001; Coimbra et al., 2005a), de daño hepático (Sakaguchi et al., 1999; Coimbra et al., 2005b), para el estudio de la inducción de fiebre (Steiner et al., 2006), de neuroinflamación crónica por administración diaria de LPS en el cuarto ventrículo de ratas (Rosi et al., 2005), o como inflamación aguda inyectando LPS intracerebralmente (Andersson et al., 1992; Montero-Menei et al., 1994; Montero-Menei et al., 1996; Stern et al., 2000), o bien realizando una inyección intraperitoneal o intravenosa de LPS para el estudio de la comunicación entre el sistema inmune periférico activado con el SNC y sus respuestas inmunes (Breder et al., 1994; Quan et al., 1997; Lacroix and Rivest, 1998; Quan et al., 1998; Nadeau and Rivest, 1999; Quan et al., 1999).

Tras la administración istémica del LPS (i.p. o i.v.) se ha observado la inducción de la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria o con la actividad celular especialmente en células de capilares, leptomeninges, plexos coroideos y otros órganos circunventriculares (OVTL, ME, AP, SFO). Entre los genes estudiados se ha visto una regulación aumentada de COX2 (pero no de COX1) (Elmqvist et al., 1997; Lacroix and Rivest, 1998; Quan et al., 1998; Schiltz and Sawchenko, 2002), de PGE (Yamagata et al., 2001), de TNF α (Breder et al., 1994; Nadeau and Rivest, 1999), de CD14 (Lacroix et al., 1998), VCAM-1 e ICAM-1, IL-1 β (Endo et al., 1998; Engelhardt et

al., 2001; Marques et al., 2007) o de I κ B α (Quan et al., 1997; Quan et al., 1999). También se ha observado que la administración de LPS provoca cambios en la expresión de estos genes, incluyendo c-fos, en núcleos como el paraventricular del hipotálamo, en cortezas insular y prelímbica, en la médula ventrolateral, en el núcleo del tracto solitario, en cerebelo, en hipocampo, en el núcleo parabraquial o en la amígdala central (Breder et al., 1994; Elmquist et al., 1996; Saper, 1998; Zhang et al., 2000b; Turrin et al., 2001; Zhang et al., 2003; Akasaka et al., 2006). Se ha sugerido la participación de los órganos circumventriculares en la comunicación entre el sistema inmune y el SNC basándose en la alteración de las respuestas inmunes frente a lesiones de estos órganos, y en la expresión constitutiva de receptores de citocinas que sufre un aumento regulado en condiciones de inflamación sistémica (Roth et al., 2004). Los plexos coroideos parecen mediar la señalización entre ambos sistemas por lo que se considera un órgano inmunosensor del cerebro (Marques et al., 2007). En alguno de estos trabajos también vieron cambios en la expresión génica en órganos periféricos como bazo, hígado y glándula adrenal.

7.2. ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

En el año 1933 Rivers y colaboradores publicaron por primera vez un modelo animal en mono en el que, tras varias inyecciones intramusculares de extracto cerebral de conejo, se producía una encefalomiелitis aguda diseminada, que actualmente se conoce como encefalomiелitis autoinmune experimental. Este modelo intentaba entender la causa que provocaba reacciones neurológicas de los pacientes a ciertas infecciones víricas o vacunas. En este primer modelo se observaba una parálisis aguda con cambios inflamatorios en el SNC.

No existe un único modelo de EAE, sino que, durante estos más de 70 años, se ha desarrollado una colección de modelos con características diferenciales entre ellos. Todas estas versiones han supuesto un gran avance en el estudio de los acontecimientos moleculares que cursan en la esclerosis múltiple.

Las diferencias entre los modelos de EAE pueden encontrarse en el curso clínico, que puede ser agudo, crónico (en el que se van acumulando los déficits neurológicos), o con episodios de recaídas y recidivas, incluso algunos modelos presentan neuritis óptica al inicio; o bien diferencias en las alteraciones neuropatológicas como los procesos de desmielinización-remielinización, una alteración axonal leve o grave, el reclutamiento de muchos o pocos macrófagos, etc.

Varios factores de la inducción de la EAE influyen en esta diversidad de modelos. La especie utilizada es un factor importante. La mayor parte del trabajo se realiza en rata o ratón, aunque también se trabaja con cobayas, conejos y primates no humanos como macacos (*macaques*), títis (*marmosets*) y monos (*rhesus monkey*). Dentro de una misma especie también existen diferencias entre cepas. Por ejemplo, existen cepas murinas susceptibles, como SJL/J o PL/J, y otras resistentes (Dal Canto et al., 1995). La variedad de compuestos utilizados para la inducción, los antígenos encefalitogénicos como la MBP (*myeline binding protein*, péptidos Ac1, 35-47, S9-101), MOG (*myeline oligodendrocyte glicoproteine*, péptido 35-55) o la PLP

(*proteolipoprotein*, péptidos 43-64, 103-116, 139-152) o los adyuvantes antigénicos como *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) o *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) también contribuyen en estas diferencias. A pesar de que algunos modelos presentan mayor similitud con la esclerosis múltiple que otros, todos han aportado información sobre el desarrollo de la respuesta autoinmune (Bigazzi, 1995).

Existen varias maneras de sensibilizar el animal. En la sensibilización activa del animal se puede utilizar un homogenado de la médula de otro individuo (Lyman et al., 1989; Martínez et al., 1999a; Berrendero et al., 2001), MBP, MOG o PLP purificados (Fritz and McFarlin, 1989), o péptidos sintéticos específicos correspondientes a la fracción encefalitogénica de estas proteínas (Fritz and McFarlin, 1989; Tuohy et al., 1989; Morini et al., 2004; Kihara et al., 2005). La sensibilización pasiva se basa en la transferencia de células T CD4⁺ (típicamente Th1) específicas para un antígeno del SNC que desarrollan una EAE adaptativa (Fallis et al., 1989; Gordon et al., 1995; Sommer et al., 1997).

Una vez producida la sensibilización del animal, dependiendo de todas las variables comentadas, los signos clínicos de la EAE se evidenciarán a diferentes tiempos, como ocurre con el modelo inducido activamente en ratas Lewis cuyo inicio de los signos clínicos tiene lugar a los 10-11 días después de la inmunización, a diferencia del modelo de EAE adaptativa/pasiva cuyo inicio se observa a los 4 o 5 días (Martínez et al., 1999a).

En el modelo de EAE se han estudiado las variaciones en la expresión de genes o proteínas involucrados en la respuesta inmune, como las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) (Matsuda et al., 1995; Martínez et al., 1999a; Schulz and Engelhardt, 2005), de diferentes citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Martínez et al., 1999a; Ibrahim et al., 2001), o de las moléculas involucradas en los mecanismos de entrada, reclutamiento y activación de células del sistema inmune en el parénquima cerebral (Gordon et al., 1995; Polfiet et al., 2002; Schulz and Engelhardt, 2005). En este mismo modelo se han probado algunos fármacos con los que se consigue retardar el inicio o disminuir la severidad de la EAE tales como los inhibidores de PDE4: Rolipram (Genain et al., 1995; Sommer et al., 1995; Sommer et al., 1997; Martínez et al., 1999a), Mesopram (Dinter et al., 2000) o L-826,141 (Moore et al., 2006); el isoproterenol (agonista β -adrenérgico) (Chelmickaschorr et al., 1989), NGF (*nerve growth factor*) (Villoslada et al., 2000), el inmunosupresor FTY720 (Fujino et al., 2003), el ácido α -lipoico (antioxidante biológico), (Morini et al., 2004), y el compuesto proteico glatiramer acetate (Jee et al., 2006); inhibidores de moléculas que participan en la patogénesis de la EAE como la fosfolipasa A2 (PLA2) (Kalyvas and David, 2004) o moléculas que ejercen una acción negativa sobre el curso de este modelo como el propranolol (Chelmickaschorr et al., 1989).

La EAE también se ha producido en ratones mutantes nulos de algunos de los genes que forman parte del sistema inmune y que sirven para estudiar su participación en el desarrollo de la enfermedad. Ejemplo de ello son los *knockouts* de neurofisiña (Terayama et al., 2005), o de PAFR (receptor del factor activador de plaquetas)

(Kihara et al., 2005) que al desarrollar una EAE más suave y retardada sugiere la implicación de estas dos proteínas en la patogénesis de la enfermedad.

Existen otros modelos de esclerosis múltiple en los que se utilizan virus para desarrollar la patología (virus de Teiler, virus Selmiki Forest) o bien se construyen ratones transgénicos humanizados (portadores de complejo HLA clase II y TCR humanos) que desarrollan la enfermedad espontáneamente (Altmann and Boyton, 2004).

La gran variedad de modelos creados en ratón y rata para el estudio de enfermedades con base inmune, entre ellas la EM, es de gran valor para el conocimiento de la patogénesis y para el desarrollo de principios terapéuticos. Aún así, se debe tener en cuenta que las diferencias inmunológicas entre los roedores y los humanos no permiten trasladar directamente estos hallazgos hacia la EM ya que en muchas ocasiones los fármacos propuestos como tratamiento no presentan la misma efectividad entre EAE en roedores y EM en humanos (Tabla 1.7.). Por este motivo es necesaria una validación previa utilizando pruebas de eficacia y seguridad en modelos creados en primates no humanos ('t Hart et al., 2004).

Tabla 1.7. Eficacia de fármacos inmunomoduladores en la EM y la EAE (Hart et al 2004)

Intervención terapéutica	EAE roedores	Esclerosis múltiple (efecto en signos clínicos)
Inmunosupresión		
Corticoesteroides	Efectivo	Sí
Mitixantrone	Efectivo	Sí en RRMS y SPMS (progresiva secundaria)
Roquinimex	Efectivo	Suspendido: efectos secundario
Sulfasalazide	Empeora signos, excepto en cobaya que los mejora	No efectivo
Cladribine	No artículos	Sí (peor resultados conflictivos)
Moléculas de Adhesión		
Anti-VLA-4	Sí	Si en RRMS
Especificidad antigénica		
Tolerancia oral	Efectivo segun el modelo	No efecto con MBP
Ligandos de péptidos alterados (APL)	Efectivo	Suspendido con APL de MBP
Copaxone	Efectivo	Efectivo en algunos pacientes
Citocinas		
TNF α	Efectivo	Empeora/no efecto
IL-10	Efectivo segun modelos	No efectivo
IL-4	Terapia génica, efectos secundarios	Eficacia insuficiente
TGF β	Efectivo segun isoforma	No efectivo
IGF-1	Efectivo segun modelo	No efectivo (mirando MRI)
Otros		
Péptidos TcR	Efectivo segun modelos	No efectivo
Cannabis	Efectivo	Reduce dolor
Interferones β	Eficacia segun modelo	Efectivo en algunos pacientes
Estriol	Efectivo	Reduce lesiones (MRI)

La mayoría de los tratamientos conocidos hasta ahora con la EAE se consideran pretratamientos, ya que se administran en el momento de la inducción de la EAE o

incluso antes, y por lo tanto probablemente tengan un valor limitado en la esclerosis múltiple. Este tipo de estrategia puede ser más relevante para la profilaxis de esta enfermedad, que para su tratamiento, o bien para el control de las recaídas mejor que para la prevención de un ataque inicial. De esta manera cuando se encuentra un compuesto capaz de suprimir o de retrasar el inicio de la EAE, se debería evaluar su capacidad de prevenir recaídas o reducir el déficit neurológico acumulado en un modelo de EAE crónico (Grigoriadis et al., 2005).

No tenemos que olvidar que estos modelos no dejan de ser eso, modelos, pero son de gran utilidad para avanzar en el conocimiento de la esclerosis múltiple además actualmente ha permitido el desarrollo de tres terapias aprobadas para esta enfermedad: glatiramer acetate, mitoxantrone y natalizumab (Steinman and Zamvil, 2006).