



Summary in Spanish



PRÓLOGO

La presente tesis se inicia en Barcelona, en el departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona, allá por Abril de 2002. Nace de una línea de investigación iniciada por el Dr. José Antonio del Río acerca de la caracterización de los factores que regulan la regeneración de la conexión entre el cortex entorhinal y el hipocampo. Después de unos primeros meses de bandeo temático, decidimos elegir la línea que presentaba mas posibilidades. Este fue el caso de dos proteínas de la mielina y de su receptor neuronal, que habían sido recientemente clonados y despertaban la atención de la comunidad científica.

La pregunta que pretende responder esta tesis es *cual es el papel de los inhibidores asociados a mielina en la regeneración de conexiones corticales*. El modelo utilizado ha sido la lesión de la conexión entorhino-hipocámpica y la estructura conceptual ha consistido en i) caracterizar la expresión temporal de la proteína, ii) analizar su regulación tras lesión, y iii) estudiar el efecto de su bloqueo en la regeneración de la conexión.

Hemos decidido cubrir en la introducción los aspectos generales que se conocen sobre la regeneración axonal en el SNC a fin de contextualizar mejor nuestro trabajo. Los artículos que representan el cuerpo de esta tesis tienen una organización interna transversal a la estructura conceptual descrita anteriormente. Esto responde al orden en que se obtuvieron los resultados en su momento y a la mayor facilidad de publicación de trabajos que cubran distintos aspectos en la caracterización funcional de una proteína. Sin embargo, y a fin de mantener una unidad temática y mejorar su entendimiento, estos trabajos serán discutidos al final de la tesis siguiendo los tres bloques temáticos (i. e. desarrollo, regulación y bloqueo).

Por ultimo, querría destacar que esta tesis, al igual que otras muchas, no es en realidad la historia de *lo que quisimos hacer*, sino la historia de *lo que nos salio bien*.

Ana Mingorance,

Barcelona, Septiembre de 2005.

Introducción

1. La regeneración axonal

1.1 La regeneración axonal: el problema.

Cada año aproximadamente mil españoles sufren una lesión de médula espinal. De ellos, más del 90% sobrevivirá a la lesión. La mayoría tiene menos de 30 años y se calcula que menos del uno por ciento tendrá una recuperación neurológica completa. El resto sufrirá graves secuelas motoras, cognitivas y sensoriales¹.

Las lesiones de médula espinal son el principal ejemplo de lesión del sistema nervioso central (SNC). Al contrario de lo que ocurre en el sistema nervioso periférico (SNP), o en el central durante el desarrollo, los axones del SNC maduro (en mamíferos adultos) son incapaces de regenerar espontáneamente tras lesión (Horner y Gage, 2000; David y Lacroix, 2003). Los avances en biología celular ocurridos durante la última década nos han permitido tener un amplio conocimiento sobre los mecanismos que controlan el desarrollo neuronal. Este conocimiento, sin embargo, es aún incompleto, y carecemos de una solución efectiva para las lesiones del SNC (revisado en Horner y Gage, 2000; David y Lacroix, 2003).

Trabajos pioneros de Tello y de Ramón y Cajal, a principios del siglo XX, demostraron que la falta de regeneración del SNC no se debe a características intrínsecas de las neuronas y señalaron por primera vez la existencia de inhibidores del crecimiento neuronal en el SNC maduro (Ramón y Cajal, 1928). David y Aguayo (1981), y posteriormente de Caroni y Schwab (1988), demostraron la naturaleza inhibitoria para el crecimiento axonal del SNC maduro y que parte de esa inhibición radica en la presencia de moléculas inhibitorias asociadas a la mielina (David y Aguayo, 1981; Caroni y Schwab, 1988). Actualmente se piensa que la falta de regeneración axonal del SNC maduro es resultado del efecto combinatorial de diferentes factores, incluyendo la activación incompleta de los programas de crecimiento axonal tras lesión y la generación de un ambiente inhibitorio para el crecimiento axonal en el SNC maduro.

Frente a este problema multifactorial, y con el objetivo de diseñar estrategias capaces se

reparar el SNC, resulta esencial caracterizar los diferentes mecanismos que regulan esta falta de regeneración. Este último aspecto, la caracterización de algunas de las moléculas inhibitorias presentes en el SNC, ha sido el eje central de esta tesis. Con este objetivo nos hemos centrado en analizar el papel llevado a cabo por los “inhibidores asociados a mielina” y su receptor común en el SNC maduro, tanto en condiciones normales como en patológicas, comparando su participación en la falta de regeneración axonal con la de otros inhibidores conocidos (como los proteoglicanos) y explorando las funciones que podrían llevar a cabo durante el desarrollo del SNC. En esta introducción pretendemos dar una idea general de los procesos que ocurren tras una lesión traumática del SNC y de los mecanismos que contribuyen a su falta de regeneración, centrándonos en el papel de los inhibidores asociados a mielina[§].

1.2 Factores implicados en la falta de regeneración axonal

Para que la regeneración axonal sea posible la neurona lesionada debe sobrevivir, el axón seccionado ha de poder formar de nuevo un cono de crecimiento, elongarse hasta alcanzar su diana original, establece sinapsis y por último ser mielinizado (aunque esto último depende del tipo de conexión). Si bien este proceso ocurre en el SNP y en central durante el desarrollo, no ocurre así en el SNC maduro. A medida que esta maduración tiene lugar, ocurre un descenso en la capacidad de regeneración neuronal, hasta el punto de perderse en estadios tempranos postnatales. A este descenso contribuyen tanto factores **exógenos** como **endógenos** (Horner y Gage, 2000).

La pérdida endógena de capacidad de regeneración axonal de las neuronas centrales durante el desarrollo ocurre en respuesta a diversos estímulos, como son la activación del programa endógeno de maduración de la neurona, el contacto con el tejido diana o la llegada de aferentes sinápticos (Goldberg y cols., 2002). Estos estímulos desencadenan en la neurona una serie de cambios que se podrían agrupar en tres bloques: un descenso en los niveles de moléculas promotoras del crecimiento axonal, el inicio de la expresión de receptores para moléculas inhibitorias y un descenso en los niveles de AMPc (Horner y Gage, 2000; Selzer, 2003).

Una vez establecidas las conexiones neuronales, el SNC pasa de ser permisivo para el crecimiento axonal a constituir **un ambiente mucho más restrictivo**. Además de este cambio, propio de la maduración del SNC, existen cambios que ocurren en el SNC solamente tras una lesión.

[§]A partir de este punto de la introducción ofrecemos un resumen en castellano de la versión inglesa que representa la versión original de esta tesis. Con el fin de evitar duplicar el material gráfico, las tablas y figuras han sido incluidas solo en la versión inglesa y solo referidas, guardando su numeración, en el resumen en castellano. Aunque refiero al lector a la versión original, he incluido al inicio de la obra un listado con la localización de las ilustraciones y tablas, para facilitar la lectura de este resumen.

a) Falta de estímulos. Se piensa que una de las principales diferencias entre el SNC y el

periférico es la permisividad de las células de Schwann al crecimiento neuronal en claro contraste con la inhibición ejercida por los oligodendrocitos (Schwab y cols., 2003). Esta permisividad radica en la expresión de moléculas de adhesión celular y neurotrofinas por parte de las células de Schwann (Rush, 1984).

b) La cicatriz glial. Una de las principales barreras para la regeneración axonal, tanto físicas como químicas, es la formación de la llamada cicatriz glial (Silver y Miller, 2004). Como resultado de una lesión, las células gliales de la zona afectada experimentan una respuesta denominada “reactiva”, que incluye hiperplasia, proliferación celular, migración y sobreexpresión de diversos genes (Fig. 1.3). Cuando la lesión no afecta a las meninges, los astrocitos son el principal tipo celular de la cicatriz glial (Fig. 1.4). Sin embargo, en lesiones más severas existe infiltración de células meníngeas al SNC, en un proceso llamado cavitación, con la formación de una cicatriz más compleja: la cicatriz meningoglial (Fig. 1.3; Silver y Miller, 2004).

Cuando la cicatriz glial madura, el estrecho contacto de los astrocitos reactivos llega a formar una **barrera física** que impide el paso de los axones (Fig. 1.4). Esta barrera, sin embargo, tarda de entre unos 7 y 10 días en formarse, tiempo durante el cual no hay regeneración axonal. Por tanto se ha postulado que la presencia de moléculas inhibitorias sería la principal limitación para la regeneración axonal (Caroni y Schwab, 1988). De manera constitutiva, y sobre todo tras una lesión, astrocitos y progenitores de oligodendrocitos expresan un conjunto de proteínas, llamados proteoglucanos condroitín-sulfato (PGCS), que son fuertemente inhibitorios para el crecimiento axonal (Morgenstern y cols., 2002). Estas proteínas son sobreexpresadas en la cicatriz glial a partir de las primeras 24 horas después de la lesión, y su sobreexpresión persiste durante meses. Además de los proteoglucanos, la expresión de Tenascinas (proteínas de matriz extracelular inhibitorias par el crecimiento axonal) y ciertas moléculas de guía axonal (como Semaforinas y Slits), hacen que la cicatriz glial sea también una **barrera química** para la regeneración axonal (Shearer y cols., 2003; Syvig y cols., 2004 y referencias en el texto).

c) Los inhibidores asociados a mielina. Gran parte de la inhibición constitutiva del SNC radica en la presencia de ciertas moléculas en asociación con la mielina (Fig. 1.1). A finales de los ochenta, trabajos llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Schwab demostraron por primera vez que la fuerte inhibición que la mielina ejerce sobre el crecimiento neuronal (ilustrado en la figura 1.5) se debe a ciertas proteínas en su composición (Caroni y Schwab, 1988b). Estos trabajos llevaron a la generación de un anticuerpo, IN-1, capaz de bloquear parte del efecto inhibitorio de la mielina (Caroni y Schwab, 1988a). Hasta le fecha se han identificado tres proteínas, Nogo-A (el epítipo de IN-1), MAG y OMgp, que son capaces de interaccionar con el mismo receptor neuronal (llamado Nogo-Receptor, o NgR) para prevenir el crecimiento axonal (Sandvig y cols., 2004). Además de NgR, que utiliza tres correceptores: Lingo-1, p75 y Troy, existen receptores adicionales para Nogo-A y MAG. Al no estar restringidos a las inmediaciones de la cicatriz glial, se cree que los inhibidores asociados a mielina (IAM) son una

de las principales barreras para la regeneración axonal antes del desarrollo de la cicatriz glial.

1.3 Estrategias para promover la regeneración axonal

Diversas estrategias han sido diseñadas para permitir el crecimiento axonal tras lesión como paso clave para la regeneración axonal, principalmente reduciendo la inhibición o incrementando la permisividad del SNC (Tabla 1.1).

1.3.1 BLOQUEO DE MOLÉCULAS INHIBITORIAS.

Existen dos aproximaciones para bloquear el efecto de las moléculas inhibitorias del crecimiento axonal: el bloqueo de esas moléculas o de sus receptores (tratamientos extrínsecos) y la manipulación de las cascadas de señalización intracelular de la neurona para reducir su sensibilidad a estos inhibidores (tratamientos intrínsecos).

a). Tratamientos extrínsecos.

Bloqueo de los inhibidores asociados a mielina. Una de las principales herramientas para el bloqueo de una proteína es el uso de anticuerpos, que al unirse a ella, impiden la posterior interacción con su receptor. Estos anticuerpos se conocen como anticuerpos bloqueantes. El más utilizado para el bloqueo de los IAM ha sido IN-1, que reconoce el dominio central de Nogo-A (Fig. 1.6; Fiedler y cols., 2002) y ha sido utilizado, con éxito, en diversos modelos de lesión tanto *in vitro* como *in vivo* (ver tabla 1.2 y para más detalles Karim y cols., 2001 y Mingorance y cols., 2004c). Otros anticuerpos bloqueantes han sido generados contra MAG y NgR, pero su función tras lesión no ha sido aún bien caracterizada. Una aproximación diferente, que también emplea anticuerpos para bloquear proteínas, es la vacunación (con mielina o antígenos purificados como Nogo-A o MAG), que ha sido utilizada con éxito para promover regeneración axonal tras lesión de medula espinal en animales de experimentación (Huang y cols., 1999; Sicotte y cols., 2003).

Otras dos estrategias, que han probado ser efectivas para el bloqueo de los IAM, son el uso de péptidos agonistas (como NEP1-40) y enzimas que degraden grupos funcionales. NEP1-40 consta de los primeros cuarenta aminoácidos (aa) de la cadena de 66 aa de Nogo-A que constituye el dominio de interacción con NgR. Estos 40 aa tienen la capacidad de unirse a NgR pero no de activarlo, por tanto actuando como un bloqueante de Nogo-A y promoviendo cierto grado de regeneración axonal tras lesión de médula espinal en ratas (Grandpre y cols., 2002; Li y Strittmatter, 2003). La unión de MAG a sus receptores (NgR, NgR2 y gangliósidos) requiere la presencia de ácido siálico (o ácido neuramínico) en la superficie de estos receptores. Cuando éstos son eliminados, por la actividad de la enzima neuraminidasa, el efecto inhibitorio de MAG se ve reducido *in vitro* (DeBellard y cols., 1996; Tang y cols., 1997; Tang y cols., 2001; Vinson y cols., 2001).

Bloqueo de los proteoglucanos condroitín sulfato. La estrategia más utilizada para bloquear la inhibición inducida por los PGCS ha sido la degradación enzimática de los grupos

condroitín sulfato, que son los que los proveen de capacidad inhibitoria, con la enzima denominada Condroitinasa ABC (ChABC). El tratamiento *in vivo* con ChABC promueve un grado de regeneración extensivo en diferentes modelos de lesión (Moon y cols., 2001; Bradbury y cols., 2002). Por último, las **Semaforinas** son otra de las principales familia de proteínas inhibitorias que restringen la regeneración axonal en el SNC maduro (Pasterkamp y Verhaagen, 2001). Entre las diversas estrategias posibles para bloquear su función se encuentran el uso de anticuerpos bloqueantes, dominantes negativos o peptoides que impiden la unión de Semaforina 3A con su receptor (revisado por Pasterkamp y Verhaagen, 2001; Montolio y cols., en preparación).

b). Tratamientos intrínsecos.

Una segunda aproximación para reducir el efecto de los diferentes inhibidores es modular el estado intrínseco de la neurona de modo que deje de ser sensible a estos inhibidores. Uno de los puntos claves es la regulación de los niveles de AMPc. Se conoce que tratamientos capaces de elevar estos los niveles de AMPc, como el aporte de neurotrofinas, análogos de AMPc, bloqueo de su degradación o estimulación de su generación, son capaces de permitir el crecimiento axonal en presencia de mielina (Song y cols., 1998; Cai y cols., 1999; Neumann y cols., 2002; Cai y cols., 2002; Gao y cols., 2004). Otros dos puntos críticos de regulación de la regeneración axonal son **RhoA** y **PKC**. RhoA es una proteína que regula la reorganización del citoesqueleto de actina y que es activada por los IAM y los PGCS, dando lugar al colapso del cono de crecimiento y un bloqueo en el crecimiento axonal (Monnier y cols., 2003; Yamashita y Tohyama, 2003). Su bloqueo mediante antagonistas, dominantes negativos o inhibiendo proteínas necesarias para la transducción de señal por debajo de RhoA, permiten la regeneración axonal *in vivo* (Kuhn y cols., 1999; Ellezam y cols., 2002; Borisoff y cols., 2003; Fournier y cols., 2003; Bertry y cols., 2005). PKC también es activada por las dos familias de inhibidores, y su bloque farmacológico o genético disminuye la capacidad de estas proteínas para activar RhoA, y por tanto de inhibir el crecimiento axonal (Sivasankaran y cols., 2004; Hasegawa y cols., 2004).

Además del bloqueo de moléculas inhibitorias, **otras estrategias utilizadas para promover la regeneración axonal** son el aporte de factores neurotróficos (Xu y cols., 1995; Bregman y cols., 1997), el trasplante de tejido permisivo (como nervio periférico, tejido embrionario o sustratos artificiales; Xu y cols., 1995; 1999), la prevención de apoptosis (Bonfanti y cols., 1996; Goldberg y cols., 2002; Sole y cols., 2002) y el reemplazamiento celular (usando tejido fetal o stem cells (Snyder y cols., 1997; Horner y Gage, 2000)

1.4 Modelos de lesión

Los dos modelos que existen de lesión traumática son transección y contusión. Una transección, o **axotomía**, implica la sección, completa o parcial, de un tracto o conexión nerviosa. Tras esta lesión, el daño va a quedar principalmente restringido a las inmediaciones de la transección. En cambio, tras una **lesión contusiva** la zona afectada es mucho mayor.

Este último es el principal tipo de lesión que tiene lugar en el SNC tras un accidente, de modo que es el más cercano a las lesiones humanas cerebrales o de médula espinal. Sin embargo la transección, al ser mucho más selectiva, permite analizar por separado los distintos parámetros que influyen en la evolución de la lesión y que regulan la regeneración axonal. Para este trabajo hemos empleado como modelo la axotomía de la vía perforante, un modelo de transección. La vía perforante es la principal entrada de información al hipocampo, y conecta el córtex entorrinal con las células granulares del giro dentado. Más adelante discutiremos las razones que nos han llevado a elegir este modelo así como sus ventajas y desventajas.

2. Moléculas que inhiben la regeneración axonal

2.1 Moléculas de guía axonal

Durante el desarrollo, los axones son guiados hasta su destino por moléculas que actúan como guía (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Algunas familias de moléculas de guía axonal que tienen efecto repulsivo durante el desarrollo continúan expresándose en el SNC maduro y tras lesión contribuyen a la incapacidad para regenerar de las neuronas maduras lesionadas. Por ejemplo las semaforinas son expresadas en el animal adulto tras lesión por fibroblastos que se infiltran al SNC procedentes de las meninges, contribuyendo a crear una barrera química en la cicatriz glial (particularmente Sema 3A y 3F; Pasterkamp y cols., 1999). Además, los oligodendrocitos maduros expresan varios miembros de las semaforinas, como Sema 5A y Sema 4D (Fig. 2.2; Moreau-Fauvarque y cols., 2003; Goldberg y cols., 2004), y Netrina (Manitt y cols., 2001; 2004), que podrían restringir la regeneración de los axones seccionados.

2.2 Proteoglucanos

Los proteoglucanos son moléculas de matriz extracelular que constan de una estructura proteica central unida a cadenas de glucosaminoglucanos (azúcares formados por repeticiones de disacáridos). Los diferentes tipos de disacáridos permiten clasificar a los proteoglucanos (PG) en cuatro clases: PG heparan sulfato, PG condroitín sulfato (PGCS), PG dermatán sulfato y PG queratán sulfato, y son responsables de la mayoría de sus propiedades funcionales (Bandtlow y Zimmerman, 2000) (Fig. 2.3). Los más relevantes para este estudio son los PGCS, al ser extremadamente inhibitorios para el crecimiento axonal y sobreexpresarse tras lesión.

Durante el desarrollo, los PGCS participan en distintos procesos del crecimiento neuronal, como la promoción o inhibición del crecimiento o la regulación de la polaridad de la neurona (Bovolenta y Fernaud-Espinosa, 2000). En el SNC maduro, astrocitos, oligodendrocitos y fibroblastos son capaces de producir PGCS (Asher y cols., 2001; Ughrin y cols., 2003). Tras una lesión son sobreexpresados en la cicatriz glial, sobretodo por células gliales, comenzando en los primeros días después de la lesión y persistiendo durante meses (Pasterkamp y cols., 1999; De Íter y cols., 2002; Properzi y cols., 2003). Sus cadenas condroitín sulfato, y por tanto su efecto inhibitorio, pueden ser eliminadas selectivamente mediante el uso de la enzima condroitinasa ABC (Fig. 2.4).

2.3 Los inhibidores asociados a mielina

a) MAG. MAG es una de las proteínas mayoritarias del SNC y miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Contiene cinco dominios inmunoglobulina y una cadena intracelular que difiere en sus dos isoformas: S-MAG y L-MAG (Tropak y cols., 1988). Además, MAG es una sialoadhesina, por lo que interacciona con ácidos siálicos en la superficie de sus receptores (Kelm y cols., 1994). Durante el desarrollo, MAG participa en el proceso de mielinización (Fig. 2.6; Schachner y Bartsch, 2000). Además se sabe que regula el contacto entre el axón y las ramificaciones de los oligodendrocitos (Martini y Schachner, 1986; Bartsch, 1996). MAG, además, inhibe el crecimiento de neuronas postnatales tanto *in vitro* como *in vivo* (McKerracher y cols., 1994; Mukhopadhyay y cols., 1994). Esta inhibición es en parte dependiente de ácido siálico y por tanto sensible a tratamiento con la enzima neuraminidasa, que degrada estos grupos (DeBellard y cols., 1996; Tang y cols., 1997b; Vinson y cols., 2000; Wong y cols., 2003). Los putativos receptores de MAG son los gangliósidos GD1a y GT1b, y las proteínas NgR (o NgR1) y NgR2 (Vinson y cols., 2001; Wang y cols., 2002; Venkatesh y cols., 2005) que parecen necesitar de p75 como correceptor (Domeniconi y cols., 2002; Liu y cols., 2002; Yamashita y cols., 2002).

Una característica importante de MAG es que existe en forma secretable, denominada dMAG, al contrario que Nogo-A y OMgp (Sato y cols., 1984; Tang y cols., 2001). Su regulación tras lesión parece depender del modelo, mientras que desciende al seccionar el nervio ciático en ratas (SNP; Tacke y Martini, 1990) es sobreexpresada tras lesión cortical (SNC; el presente trabajo). Esta diferente regulación puede contribuir a la falta de regeneración del SNC frente al periférico. Es más, diversos estudios han demostrado que el bloqueo de MAG es capaz de promover regeneración axonal, probando su participación directa en la inhibición del crecimiento axonal (Tang y cols., 2001; Sicotte y cols., 2003; Wong y cols., 2004).

b) Nogo-A. Como ya hemos comentado, a finales de los ochenta se demostró que gran parte de la actividad inhibitoria de la mielina se debía a dos componentes proteicos que fueron denominados NI-250 y NI-35 (Fig. 2.7; Caroni y Schwab 1988a, b). En anticuerpo IN-1, generado contra NI-250, bloquea parcialmente el efecto inhibitorio de la mielina y permite cierto grado de regeneración tras lesión en varios modelos (Bandtlow y Schwab, 2000). Su epítipo es la proteína Nogo-A codificada por el gen *nogo*, también llamado RTN4 (Reticulón 4), que da lugar a tres isoformas mediante el uso de dos promotores y *splicing* alternativo (Spillmann y cols., 1998; Chen y cols., 2000; GrandPre y cols., 2000; Prinjha y cols., 2000). Las tres proteínas comparten el extremo amino terminal, donde se localiza una secuencia de localización reticular y dos dominios transmembrana (Fig. 2.8; Oertle y cols., 2003b). Estos dos dominios están separados por un fragmento de 66 aa conocido como el loop-66. Además, Nogo-A, la isoforma mayor, posee un dominio exclusivo denominado NiG en el cual, junto con el loop-66, se localiza su actividad inhibitoria (Oertle y cols., 2003e).

Aunque fuera descrito como proteína de oligodendrocitos, Nogo-A es una proteína expresada de manera muy generalizada por neuronas, incluso durante el desarrollo del SNC (revisado por

Hunt y cols., 2003). Además de encontrarse localizado en el retículo endoplasmático (RE), Nogo-A alcanza la superficie celular en oligodendrocitos como neuronas y fibroblastos, donde expone al exterior sus dos dominios inhibitorios (Fig. 2.10 A; Oertle y cols., 2003e; Dodd y cols., 2005). La función del Nogo-A neuronal se desconoce. Se han propuesto, sin embargo, varias funciones para el *pool* intracelular de Nogo-A, como la regulación de la apoptosis (Oertle, y cols., 2003a; Watary y Yutsudo., 2002), la regulación del tráfico vesicular, y la formación de canales como otros miembros de la familia reticulón (Oertle y cols., 2003; Steiner y cols., 2004; Dodd y cols., 2005). Además, desde su localización en la mielina, Nogo-A contribuye a regular la distribución de canales de potasio en el axón mediante la interacción con la proteína neuronal Caspr (Nie y cols., 2003). Sin duda su función mejor caracterizada es la de inhibidor de la regeneración axonal *in vivo*. Este papel ha quedado ampliamente demostrado por diversos experimentos de bloqueo, incluyendo el anticuerpo IN-1, la vacunación con péptidos de Nogo-A, el péptido antagonista NEP1-40 y el uso del ectodominio de NgR (Bregman y cols., 1995; Merkel y cols., 2001; Raineteau y cols., 2001; Hauben y cols., 2001; Fournier y cols., 2001; GrandPre y cols., 2002; Li y Strittmatter, 2003; Li y cols., 2004). De hecho, la expresión forzada de Nogo-A por células de Schwann limita la regeneración del nervio ciático, indicando que Nogo-A es un potente inhibidor de la regeneración axonal (Pot y cols., 2002).

c) OMgp. OMgp es el más desconocido de los IAM (Mikol y Stefanson, 1988). Consta de 401 aa que se estructuran básicamente en repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés leucin rich repeats) y un dominio C-terminal de unión a GPI. (Mikol y cols., 1990). Los dominios LRR caracterizan una familia de proteínas implicada generalmente en procesos de adhesión (Tabla 2.2). Se piensa que su expresión en oligodendrocitos responde a una función relacionada con la mielina y posiblemente regule también la proliferación y diferenciación de oligodendrocitos (Vouch y Andrés, 2004). Además, OMgp es expresado por neuronas (Habib y cols., 1998), pero su función neuronal se desconoce. OMgp interacciona con NgR e induce inhibición del crecimiento neurítico *in vitro* (Wang y cols., 2002). Aunque aún no se han llevado a cabo estudios que ratifiquen este papel *in vivo*, se supone que podría participar en la inhibición de la regeneración axonal tras lesión vía NgR, y por tanto se le clasifica como el tercer inhibidor asociado a mielina.

3. Receptores y transducción de señal

El efecto final, inhibitorio o no, de una proteína por la regeneración axonal, viene determinado por los receptores que utilicen y la señalización intracelular que estos induzcan. En este capítulo nos centraremos en los receptores neuronales de Nogo-A, MAG y OMgp (cuando éstos desempeñan su función desde la mielina) y en las principales cascadas de señalización implicadas.

3.1 Proteínas de membrana que interaccionan con los IAM

a) La familia NgR. La búsqueda de un receptor para el dominio loop-66 de Nogo-A llevó al clonaje de Nogo Receptor (NgR; Fournier y cols., 2001). Esta proteína de 473 aminoácidos (aa) pertenece a la familia caracterizada por la presencia de LRR (tabla 2.2). NgR contiene ocho LRR, encargados de la unión a Nogo-A, MAG y OMgp, y un dominio C-terminal de unión a GPI (Fournier y cols., 2002; Domeniconi y cols., 2002; Wang y cols., 2002b). Su expresión es exclusivamente neuronal, aunque no está presente en todas las poblaciones neuronales, y se localiza preferentemente en axones y terminales sinápticos en neuronas postnatales (Josephson y cols., 2002; Wang X y cols., 2002). El hecho de que algunas áreas, como el estriado, no expresen NgR, y que otras, como la médula espinal, disminuyan enormemente su expresión en el adulto, hizo pensar en la existencia de otros receptores para los inhibidores asociados a mielina (Josephson y cols., 2002; Wang X y cols., 2002). Dos homólogos de NgR (NgR2 y NgR3) han sido clonados y aunque ninguno tiene afinidad por Nogo-A u OMgp, NgR2 puede actuar como receptor de MAG (Barton y cols., 2003; Pignot y cols., 2003; Klinger y cols., 2003; Venkatesh y cols., 2005). La interacción de MAG con NgR y NgR2 es dependiente de ácido siálico y parece requerir la presencia de p75 (Venkatesh y cols., 2005; Zheng y cols., 2005). La posible contribución de NgR2 y 3 a la regeneración axonal aún se desconoce.

Tanto los gangliósidos como los diferentes NgR, los únicos receptores neuronales identificados para los IAM, carecen de dominio intracelular y requieren por tanto la participación de correceptores para inducir señalización. Actualmente se conocen tres correceptores para NgR: p75, Troy y Lingo.

b) p75 y Troy. p75 y Troy pertenecen a la superfamilia de los “tumor necrosis factor receptors” y participan, de modo alternativo, en el complejo receptor de los IAM. p75 es también el receptor de baja afinidad de neurotrofinas, ya sea actuando como correceptor de Trk, o en solitario (Chao, 2003). Cuando actúa como coreceptor para NgR, p75 es el coreceptor que inicia la cascada de señalización (Fig. 3.3; Wang y cols., 2002b; Wong y cols., 2002; Yamashita y cols., 2002). Además, la unión de MAG a gangliósidos es capaz de activar a p75, y las neuronas deficientes en él no son inhibidas por mielina, de modo que desempeña un papel central en la regeneración axonal (Yamashita y cols., 2002; Zheng y cols., 2005). Sin embargo, muchas poblaciones neuronales cesan de expresar p75 en el animal adulto, y se ha propuesto que utilizan Troy, una proteína cercana a p75 y de la misma familia, para suplir a este último (Park y cols., 2005; Shao y cols., 2005).

c) Lingo-1/LERN1. El tercer elemento del complejo receptor de IAM es Lingo. En ausencia de Lingo, la sola presencia de NgR y p75 es insuficiente para inducir señalización, y requieren de la presencia de Lingo, aunque su mecanismo de acción sea desconocido (Mi y cols., 2004). Al igual que NgR y OMgp, Lingo pertenece a la familia de proteínas con grupos LRR (Carim-Todd y cols., 2004; Mi y cols., 2004). Además de participar en el complejo trimérico con NgR y p75 o Troy, es posible que Lingo desempeñe papeles alternativos, principalmente durante el desarrollo neuronal, al estar ampliamente expresado por las neuronas en desarrollo y ser homólogo de Slit (Carim-Todd y cols., 2004; Mi y cols., 2004), que juega un papel central en guía axonal y migración celular (e. g. Wong y cols., 2002).

d) Otros receptores posibles. Aunque es muy probable la existencia de más inhibidores asociados a mielina y de receptores para estos, existen algunos receptores para los IAM además de los mencionados anteriormente. Los gangliósidos GD1a y GT1b son capaces de actuar como receptores de MAG (Fig. 3.1), y su bloqueo reduce la capacidad inhibitoria de MAG (Vinson y cols., 2001; Vyas y cols., 2001; 2002). Nogo-A, por su parte, posee un segundo dominio inhibitorio que no necesita de NgR ni p75 aunque su receptor se desconoce (Fig. 3.1; Oertle y cols., 2003c; Schweigreiter y cols., 2004).

3.2 Vías intracelulares implicadas en la regeneración axonal

La regulación de la regeneración axonal, al igual que la guía axonal, requiere de la modulación local del citoesqueleto. Los mecanismos moleculares que conectan los receptores de membrana con el citoesqueleto son aún parcialmente conocidos, aunque parece haber una serie de moléculas y vías esenciales. A continuación resumimos brevemente las principales vías de señalización que regulan el crecimiento axonal y su inhibición.

a) Rho GTPases. Una familia de proteínas central en la regulación de los filamentos de actina es la de las Rho GTPasas (Luo y cols., 1997). Tres de sus miembros, Cdc42, Rac1 y RhoA, están regulados por receptores neuronales, como los de los IAM (entre otros). Mientras que los inhibidores del crecimiento axonal actúan mediante la activación de RhoA (y generalmente la inhibición concomitante de Rac1, de efecto antagónico), las moléculas atractivas, como Netrina, activan Rac1 y Cdc42 (Fig. 3.8; Jalink y cols., 1994; Giniger, 2002; Niederost y cols., 2002; He y Koprivika, 2004; Schweigreiter y cols., 2004). La activación de RhoA por los IAM tiene lugar vía p75 y supuestamente por Troy en aquellas células que carecen de expresión de p75 (Yamashita y Tohyama, 2003).

La señalización inducida por los receptores de moléculas inhibitorias o atractivas es integrada en el cono de crecimiento, determinando el sentido del efecto final (colapso, expansión, giro a favor o en contra de la fuente...). Esta señalización parece tener una serie de puntos de regulación: el nivel intracelular de calcio, los niveles de nucleótidos cíclicos y el balance entre PKC e IP3.

b) Calcio intracelular (Ca^{2+}). El calcio es uno de los mensajeros secundarios que transduce la información extracelular en cambios en motilidad celular (Zheng, 2000). Gradientes extracelulares de Netrina o dMAG generan gradientes intracelulares de calcio que determinan la polaridad del giro del cono de crecimiento (Song y cols., 1997; 1998). La dirección de giro, a favor o en contra de ese gradiente, viene determinada por las concentraciones basales de calcio, menores, para la repulsión inducida por MAG, y más elevadas en el caso de la atracción por Netrina (Fig. 3.9; Henley y cols., 2004). Este efecto es debido a la existencia de dos proteínas, activadas preferentemente por los distintos niveles de calcio, que tienen efecto antagónico en la dirección de giro del cono de crecimiento: la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (**CaMKII**) y la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina **Calcineurina** (CaN). Mientras que CaMKII induce el giro del cono de crecimiento a favor del gradiente extracelular (y se activa en presencia de niveles más elevados de calcio), la Calcineurina responde a niveles mucho más bajos de calcio determinando el giro en el sentido contrario al gradiente, como ocurre con MAG (Wen y cols., 2004). El cambio de atractiva a repulsiva que experimenta MAG en función de la edad de la neurona responde a una caída durante el desarrollo en los niveles de calcio junto con una regulación similar de AMPc (Neumann y cols., 2002; Qiu y cols., 2002).

c) Los nucleótidos cíclicos. Como el calcio, los nucleótidos cíclicos son segundos mensajeros que regulan la atracción o repulsión del cono de crecimiento por factores extracelulares. Los niveles elevados de AMPc parecen estar particularmente ligados con la capacidad de regeneración axonal, y tratamientos capaces de elevarlos, como el *priming* con neurotrofinas y la lesión condicional en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal promueven regeneración axonal en el adulto (Fig. 1.7; revisado por Spencer y Filbin, 2004). El AMPc regula la sensibilidad a los IAM desde varios puntos. Por un lado la transcripción de determinadas proteínas inducidas por CREB (en respuesta al AMPc) podría interferir con la cascada de señalización utilizada por los IAM (Spencer y Filbin, 2004). Además, el AMPc es capaz de regular los niveles de calcio y el balance entre AMPc y GMPc (pero no la concentración total de los dos nucleótidos) parece determinar la dirección de giro del cono de crecimiento ante una fuente de Netrina y presumiblemente de MAG (Nishiyama y cols., 2003).

d) El balance entre PKC e IP3. PKC parece ser una proteína clave en la señalización inducida tanto por los IAM como por los PGCS (Hasegawa y cols., 2004; Sivasankaran y cols., 2004). De hecho, su bloque farmacológico permite un alto grado de regeneración axonal *in vivo* (Sivasankaran y cols., 2004). Inhibidores de proteínas G_i y G_o permiten la regeneración de la vía perforante *in vitro* (Prang y cols., 2001). Estas proteínas a su vez regulan la actividad de la fosfolipasa C (PLC) que activa PKC y produce el segundo mensajero IP3 (Fig. 3.11). Mientras que la activación de IP3 sobre PKC permite crecimiento axonal, el dominio de PKC induce colapso e inhibición del crecimiento axonal (Hasegawa y cols., 2004; Sivasankaten y cols., 2004). No está claro como se regula el balance entre PKC e IP3 ni como éstos regulan el crecimiento axonal, aunque se cree que lo hacen mediante la regulación de las Rho GTPasas (Hasegawa y cols., 2004).

4. El Hipocampo y la Regeneración Axonal

A lo largo de esta tesis nos hemos centrado en el hipocampo como modelo para analizar el desarrollo y regeneración de una conexión cortical: la vía perforante. Una característica importante es que sus conexiones se forman de un modo altamente estereotipado y siguiendo un patrón laminar que permite determinar claramente el grado de especificidad de la vía, tanto durante el desarrollo como después de manipularla (como por ejemplo, tras una lesión).

4.1 Anatomía básica del hipocampo.

El área a la cual nos referimos generalmente como hipocampo, es en realidad la formación hipocámpica, que comprende varias subdivisiones: el cortex entorrinal, el complejo subicular y el hipocampo, cada uno de los cuales se encuentra a su vez subdividido en áreas (Fig. 4.1).

El cortex entorrinal es el punto de entrada de información procedente de la corteza al hipocampo a través de la vía perforante, que tiene su origen en las neuronas de capa II y III (fig. 4.1A). Una vez en el hipocampo, la vía perforante inerva preferentemente el estrato lacunoso-moleculare y la capa molecular del giro dentado (Ramón y Cajal, 1901; Amaral y Witter, 1995). El Subículo se encuentra en la zona de transición entre el cortex entorrinal y el hipocampo y se subdivide en tres regiones, parasubículo, presubículo y subículo (Fig. 4.1B-C; Amaral and Witter, 1995). El hipocampo propio, formado por las áreas CA3, CA2 y CA1, presenta una organización laminar conservada en sus diferentes regiones (fig. 4.1). En contacto con el ventrículo se encuentra el estrato alveus, seguido del oriens, piramidal (con los somas de las neuronas piramidales), radiatum, y finalmente, el estrato lacunoso-moleculare (SLM). Además, en el área CA3 existe un último estrato formado por las fibras musgosas (axones de las células granulares del giro dentado) que bordea el estrato piramidal y termina en la interfase con el CA2, denominado estrato lúcido (flechas en fig. 4.2). El giro dentado también se encuentra subdividido. La capa más externa es la capa molecular que a su vez que subdivide en molecular externa, medial e interna (Fig. 4.2). Las neuronas principales del giro dentado, las granulares, se organizan en una segunda capa denominada capa granular, y emiten sus axones hacia la zona interior del giro, o hilus, donde se encuentran numerosas interneuronas (Fig. 4.2).

4.2 Conexiones extrínsecas e intrínsecas del hipocampo.

a) Conexiones intrínsecas. Como hemos mencionado previamente, las neuronas entorrinales de las capas II y III originan una conexión, denominada conexión entorrino-hipocámpica o vía perforante, que perfora el subículo y establece sinapsis con las células principales de su tejido diana: las granulares del giro y las piramidales de las áreas CA3-CA1. Mientras que los axones

procedentes del cortex entorrinal lateral terminan en la capa más externa del giro, los del entorrinal medial lo hacen en la capa intermedia (Fig 4.3; Amaral y Witter, 1995).

Otras conexiones intrínsecas del hipocampo son las conexiones asociacionales, que unen áreas homólogas dentro del mismo hemisferio, y las comisurales, que conectan con las del hipocampo contralateral. Los puntos por los cuales los axones cruzan de un hemisferio al otro se conocen como comisuras. En el hipocampo las piramidales del CA3 conectan con las del CA1 en una conexión denominada colaterales de Schaffer, que junto con la vía perforante y las fibras musgosas (que unen el giro dentado con el CA3) forman el denominado circuito trisináptico. Otras conexiones intrínsecas, como las que establecen las interneuronas del hilus, existen pero no serán descritas.

b) Conexiones extrínsecas. Una de las principales eferencias del hipocampo es la conexión que establece con el septum. Esta conexión es recíproca y el hipocampo recibe aferencias septales a través de la fimbria que establecen sinapsis con interneuronas de las áreas CA1, CA3 y giro dentado. Esta última es especialmente relevante después de axotomía de la vía perforante, ya que se ramifica e inerva profusamente la capa molecular del giro una vez ha quedado denervada.

4.3 El desarrollo del hipocampo

El desarrollo del hipocampo es un proceso altamente ordenado. En origen, las neuronas se originan próximas al ventrículo, en la denominada zona ventricular, alrededor de los estadios embrionarios E10-E14. Las primeras neuronas postmitóticas darán lugar a la preplaca por migración radial que a E14 está formada principalmente por células GABAérgicas y positivas para calretinina, situadas en la capa más superficial del hipocampo (células de Cajal-Retzius) (Soriano y cols., 1994; del Río y cols., 1995). A partir de E15 la preplaca se divide y da lugar a la subplaca y a la zona marginal, mientras que en paralelo se comienza a formar el giro dentado como un pliegue en el extremo del hipocampo. A E15 los precursores de las células granulares se generan en la zona subventricular, desde donde migran hasta formar la capa granular, alrededor de E15-E16. En esta capa las neuronas más jóvenes se posicionarán en estratos más profundos que las primeras en generarse formando un gradiente de fuera hacia dentro, y a partir de E16 las subdivisiones de capa molecular, capa granular e hilus son distinguibles. Las neuronas del hipocampo propio, en cambio, presentan un gradiente opuesto, de modo que las nuevas generadas ocupan las posiciones más superficiales. Además existe un gradiente de maduración de CA3 a CA1 que dura hasta E17. A partir de P0 los estratos descritos previamente ya están formados.

A E16 los axones procedentes del cortex entorrinal han llegado a la zona marginal del área CA1 (futuro SLM) y en días siguientes a la del área CA3. El giro dentado será inervado en estadios perinatales, cuando las dendritas de las neuronas granulares son aún inmaduras, al igual que las de las piramidales en el momento de la llegada de la vía perforante (Supèr and Soriano, 1994). Por ese motivo los axones entorrinales establecen sinapsis temporales con la

población de células de Cajal-Retzius, y son reemplazadas por sinapsis con las células granulares o piramidales a partir de P5 (Supèr y cols., 1998).

4.4 La vía perforante como modelo de lesión

Para analizar el papel de los inhibidores asociados a mielina en la regeneración axonal nos hemos centrado en la vía perforante por su alta especificidad, la extensiva caracterización que sobre su lesión se ha hecho, y la facilidad de reproducirla y manipularla *in vitro*. El modelo de lesión elegido ha sido la axotomía de la vía perforante (Figs. 4.5 y 4.6). Esta lesión tiene la ventaja de seccionar el cortex entorrinal limpiamente, usando una cuchilla retráctil de un milímetro y medio para seccionar la vía perforante (Jensen y cols., 1997), mientras que otros modelos de lesión, como la electrolítica, dañan por completo el cortex entorrinal, permitiendo el estudio del hipocampo deaferentado pero no en el cortex entorrinal lesionado (Fig. 4.6).

a) Reacción glial tras la axotomía de la vía perforante. En respuesta a una lesión, los astrocitos proliferan, se vuelven hipertróficos y unen sus prolongaciones formando la cicatriz glial (Silver y Miller, 2004). La microglia, por su parte, cambia de un estado altamente ramificado a uno denominado ameboide (Turner y cols., 1998). Este cambio en la microglía tiene lugar pocas horas después de la axotomía de la vía perforante *in vivo*, y recupera su morfología y distribución normal pasada una semana (Jensen y cols., 1994; Hailer y cols., 1999). Los astrocitos reaccionan un poco más tarde (unos dos días postlesión -2 dpl-) y permanecen detectables durante meses (Gall y cols., 1979; Steward y cols., 1990; Fagan and Gage., 1994; Jensen y cols., 1994). Los progenitores de oligodendrocitos también proliferan en respuesta a una lesión y tras diferenciarse contribuyen a remielinizar las nuevas conexiones formadas (Jensen y cols., 2000b; Drojdahl y cols., 2002, 2003; Fontana y cols., 2005).

Aproximadamente el 30% de las neuronas entorrinales muere como resultado de la axotomía, dando lugar a un descenso en el número de sinapsis en el estrato molecular del giro dentado (Matthews y cols., 1976a,b; Peterson y cols., 1994). Unos días después de la lesión tiene lugar un proceso llamado *sprouting* reactivo, por el cual los axones de poblaciones neuronales que no han sido afectadas se ramifican y establecen sinápsis con las zonas que han quedado deaferentadas. Estas poblaciones son principalmente las del entorrinal contralateral, las fibras colinérgicas procedentes del septum y las asociacionales/comisurales (Matthews y cols., 1976b; Steward and Vinsant, 1983; Steward and Cotman., 1974, 1976; Steward, 1976; Zimmer y cols., 1986; Deller y cols., 1995, 1996a, b; Frostcher y cols., 1997; Del Turco y cols., 2003),

b) Regulación de los inhibidores de la regeneración tras lesión. Tras la axotomía de la vía perforante, los astrocitos reactivos sobreexpresan una serie de proteoglicanos particularmente inhibitorios para el crecimiento axonal como Neurocan y Brevican. Esta sobreexpresión tiene lugar alrededor de la lesión y en la zona deaferentada del hipocampo (SLM y dos tercios

exteriores de la capa molecular del giro; Deller y cols., 1997 Haas y cols., 1999; Thon y cols., 2000). Poco se sabía cuando comenzamos este trabajo de los IAM en el hipocampo y no había ningún dato acerca de su regulación tras axotomía de la vía perforante.

4.5. Cultivos organotípicos como modelo *in vitro*

Un cultivo organotípico permite mantener la complejidad del tejido original pero facilitando su manipulación, particularmente a la hora de realizar una lesión y administrar un tratamiento. Para la realización de esta tesis hemos utilizado el cultivo sobre membrana o en interfase (Stoppini y cols., 1991). El tejido (hipocampo y cortex entorrinal) debe ser obtenido de animales en estadio perinatal y es cultivado en secciones de 300µm sobre una membrana semipermeable durante varias semanas (Fig 4.7). Cuando el cultivo contiene tanto el hipocampo como el cortex entorrinal, la vía perforante se forma y madura siguiendo el mismo patrón que presentaría *in vivo*, manteniendo su morfología y sinaptogénesis y perdiendo, como *in vivo*, su capacidad de regeneración durante la segunda semana (postnatal) en cultivo (Gahwiler y cols., 1984; Woodhamns y cols., 1993; Berger y Frostcher, 1994). Este paralelismo nos ha permitido establecer un ensayo mediante el cual analizar la contribución de los diferentes inhibidores a la falta de regeneración de la conexión (Fig 4.7). Este ensayo consiste en seccionar la vía perforante en el día 15 *in vitro* y permitir un tiempo de supervivencia al cultivo durante el cual es tratado con diversos agentes (enzimas, anticuerpos o péptidos), en ausencia de los cuales la vía no regenera espontáneamente. Pasado este tiempo (generalmente 7-8 días) la regeneración de la conexión se examina mediante el uso de un trazador anterógrado, como la biocitina, inyectado en el cortex entorrinal.

Este mismo modelo, el cocultivo organotípico de cortex entorrinal e hipocampo, ha sido ya utilizado como modelo de lesión, y sobre él se han testado diferentes estrategias destinadas a promover la regeneración de la vía perforante, entre ellas un amplio espectro de neurotrofinas, factores de crecimiento, neuroprotección mediante el uso del ratón sobreexpresante de Bcl-2, y transpante de células de Cajal-Retzius (Tabla 4.1, Woodhams y Atkinson, 1996; Prang y cols., 2001; Del Río y cols., 2002; Solé y cols., 2004). Ninguna estrategia, sin embargo, había sido utilizada dirigida al bloqueo de los inhibidores asociados a mielina hasta este trabajo.

Resultados y Discusión

1. El papel de los inhibidores asociados a mielina en la regeneración axonal

El presente trabajo muestra que tanto Nogo-A como MAG llevan a cabo un papel importante contribuyendo a impedir la regeneración axonal tras lesión, como se demuestra por la

regulación de su expresión tras lesión *in vivo* y por su bloqueo, que promueve la regeneración de la vía perforante *in vitro*.

1.1. El patrón de desarrollo de NgR y MAG correlaciona con la pérdida de capacidad de regeneración de la vía perforante.

Se ha propuesto que la mielinización de un axón ocurre en paralelo a su maduración. De echo en el primer lugar donde se observa expresión de MAG es en el cuerpo calloso, formado por los axones de las neuronas de proyección, que son de las primeras en madurar (Fig. 1.1). Posteriormente la expresión de MAG incrementa hasta alcanzar un máximo alrededor de los estadios P15 y P21, cuando la sinaptogénesis es máxima. En la sustancia gris la expresión de MAG es algo posterior, comenzando a ser detectada en el hipocampo a partir de P10 (Fig. 1.1). Esta expresión temporal concuerda con el progreso de la mielinización (Meier y cols., 2004). Al contrario que MAG, Nogo-A se expresa también durante los estadios en los que existe regeneración axonal, y tiene un máximo de expresión alrededor de P0 (Fig. 1.1). Sin embargo, durante estos estadios la expresión de Nogo-A está restringida a neuronas y células de glía radial, y su expresión por oligodendrocitos no comienza hasta que estos no mielinizan. Esta expresión de Nogo-A por oligodendrocitos mielinizantes correlaciona, como ocurre con MAG, con la pérdida de capacidad de regeneración del SNC. Sin embargo, la sola presencia de los ligandos no implica que ejerzan inhibición en un determinado momento, si no se expresa su correspondiente receptor. De acuerdo con la bajada en la capacidad de regeneración de los axons entorrinales, la expresión de NgR en el cortex entorrinal comienza a partir de P5, lo que haría a estas neuronas sensibles a los inhibidores asociados a mielina.

1.2. La actividad neuronal regula la expresión de Nogo-A y NgR.

Durante el desarrollo, numerosas poblaciones neuronales, como las granulares del giro y las piramidales de CA3-CA1 maduran siguiendo un gradiente (Fig. 1.2). En el presente trabajo demostramos que la expresión de NgR en estas poblaciones neuronales sigue su gradiente de maduración, aumentando su expresión a medida que la neurona madura (Fig. 1.2.1'a 3'). Esto sugiere que la actividad sináptica podría regular su expresión, como mecanismo de estabilización de las sinapsis formadas. A favor de esta hipótesis, hemos observado que la expresión de Nogo-A y NgR se regula tras la administración de ácido kaínico, que se utiliza como modelo de epilepsia al incrementar la actividad neuronal (Ben-Ari, 1985). En ambos casos, la expresión es regulada de forma negativa, de modo que 24 horas después de la inyección las células granulares del giro prácticamente dejan de expresar tanto Nogo-A como NgR. Esta bajada, y su posterior recuperación parcial a 72 horas, va en paralelo con la reorganización sináptica que experimentan las neuronas granulares en respuesta a la lesión (the mossy fibers; Tauck and Nadler, 1985; Cronin and Dudek, 1988) y apunta a la posible implicación de Nogo-A y/o NgR en esta reorganización. Como la expresión de Lingo y p75 es contraria, es posible que asuman una función distinta a la de NgR (Tabla 1.1; Roux y cols., 1999; Trifunovski y cols., 2004).

Combinando nuestros resultados con los encontrados en la bibliografía se extrae que Nogo-A sufre una regulación bifásica tras inyección de ácido kaínico, en la que a la bajada inicial le sigue un aumento de expresión que se puede observar en pacientes con epilepsia, en los cuales la sobreexcitación neuronal es crónica (Meier y cols., 2003; Bandtlow y cols., 2004). NgR, por su parte, parece experimentar una regulación opuesta a la de BDNF, tanto en modelos de sobreexcitación, como el utilizado en este trabajo, como en modelos de aprendizaje, indicando que el descenso en los niveles de expresión de NgR podría ser beneficioso para permitir plasticidad neuronal (Wetmore y cols., 1994; Josephson y cols., 2003). En experimentos con cultivos primarios de neuronas hipocámpicas hemos podido constatar que BDNF puede directamente regular los niveles de expresión de NgR, así como también los de Nogo-A (que además son susceptibles a tratamientos con altas dosis de glutamato).

Una forma en la cual Nogo-A y NgR podrían regular la plasticidad sináptica es interaccionando en la propia sinapsis. En este sentido, se ha descrito la presencia de ambas proteínas en sinapsis, (Fig. 1.5; Wang X. y cols., 2002; Liu y cols., 2003) actuando a modo de proteínas de adhesión (revisado por Sheifelle, 2003; Washbourne y cols., 2004). Otra opción es que Nogo-A tenga una localización reticular en la sinapsis y participe en la regulación de la liberación de calcio desde el retículo (Oertle y cols., 2003c; Dodd y cols., 2005). Observaciones nuestras de cultivos primarios, en los cuales la presencia de Nogo-A en el sustrato induce la formación de varicosidades en el axón (enriquecidas en NgR), parecen apoyar la hipótesis de que Nogo-A y NgR interaccionarían físicamente en la sinapsis. Otra posibilidad es que este aumento de varicosidades se deba simplemente a una consecuencia de la maduración neuronal, al crecer sobre un sustrato inhibitorio.

1.3. La expresión de Nogo-A, MAG y NgR está regulada por la axotomía de la vía perforante *in vivo*.

En la presente tesis, la descripción de la regulación de MAG en el cortex entorrinal tras lesión de la vía perforante nos ha permitido describir una reacción reactiva por parte de los oligodendrocitos maduros. Si bien otros tipos de glía experimentan tras lesión un proceso claramente reactivo, caracterizado por hiperplasia, migración, proliferación y sobreexpresión de ciertas proteínas (Ridet y cols., 1997; Acarin y cols., 2001), la reacción que describimos para los oligodendrocitos maduros solo reúne algunas de estas características. Esto se debe en parte a la propia naturaleza del oligodendrocito mielinizante: es una célula postmitótica, por tanto no puede proliferar, y se encuentra rodeando los axones a los cuales mieliniza, lo que restringe su posible migración. Sin embargo la expresión de MAG nos muestra claramente una población de oligodendrocitos maduros que de modo transitorio incrementa su volumen y sobreexpresa proteínas, no solo MAG sino también, al menos, MBP (una proteína estructural de la mielina; Bartholdi y Schwab, 1998; Jensen y cols., 2000).

Es interesante el hecho de que los oligodendrocitos maduros parecen tener dos posibles reacciones a una lesión. En algunos modelos ocurre una muerte extensiva de oligodendrocitos, a lo que acompaña un descenso en la expresión de determinados genes relacionados con la mielina (Morin-Richaud y cols., 1998; Wrathall y cols., 1998; Zai y Wrathall, 2005). En otros, por el contrario, los oligodendrocitos sobreviven, y en esta situación reaccionan a la lesión sobreexpresando estos genes (Frei y cols., 2000; Jensen y cols., 2000; Meier y cols., 2003; Li y Blakemore, 2004). Esta segunda reacción podría estar ligada con la supervivencia neuronal, ya que la muerte de oligodendrocitos secunda la degeneración neuronal (Abe y cols., 1999) y por otro lado la mielina parece tener efecto trófico en las neuronas, y la respuesta reactiva de los oligodendrocitos podría ayudar a la supervivencia neuronal (Windebank y cols., 1985; Sanchez y cols., 1996).

La posible regulación de Nogo-A en oligodendrocitos tras axotomía de la vía perforante no es tan clara, si bien observamos una acumulación de Nogo-A en el soma de las neuronas seccionadas por inmunohistoquímica (Fig. 1.8), y un ligero aumento en su expresión en las células granulares del giro por hibridación in situ. Cuando seccionamos la fimbria (tracto que contiene un gran número de aferencias y eferencias hipocampales, Cassel y cols. 1997) podemos advertir una sobreexpresión de Nogo-A en oligodendrocitos maduros, pero también en los axones seccionados y en fibroblastos procedentes de las meninges (Fig. 1.9). Esta acumulación en los terminales axónicos seccionados es típica de proteínas que son transportadas anterógradamente. De hecho el transporte anterógrado se ve incrementado tras lesión, en un esfuerzo de la célula por proveer suficiente aporte de membrana y otros orgánulos al terminal seccionado (Su y cols., 1997).

Un hecho interesante es la reexpresión de Nogo-A por astrocitos, después de que cesaran de expresarlo al pasar de glía radial a astrocito (Culican y cols., 1990). Esto ocurre también con otras proteínas, como la Vimentina y la Nestina (Clarke y cols., 1994), y en todo caso parece que tras lesión, los astrocitos al volverse reactivos recuperan la expresión de diversos genes propios de la glía radial. Esta expresión de Nogo-A por astrocitos reactivos ocurre no solo en el giro dentado deaferentado sino también alrededor de las neuronas degenerantes en la médula espinal de pacientes enfermos de esclerosis lateral amiotrófica (Luc Dupuis comunicación personal).

Nuestros datos muestran una subida en los niveles de expresión de NgR en las células granulares deaferentadas seguido por un descenso mucho mayor que sitúa sus niveles de expresión muy por debajo de los del hipocampo no lesionado dos semanas después de la lesión. Esto mismo ha sido reportado por Meier y colaboradores (2003) que propusieron que el descenso de NgR podría permitir el *sprouting* de las neuronas granulares al coincidir temporalmente. Este descenso de la expresión de NgR ha sido también observado en enfermedades crónicas y podría representar un intento de la neurona herida por liberarse del fuerte ambiente inhibitorio.

1.4 El bloqueo de Nogo-A y MAG promueve la regeneración de la vía perforante *in vitro*.

Los estudios de bloqueo son los que más claramente han demostrado la participación de Nogo-A y MAG en la falta de regeneración axonal, principalmente el anticuerpo IN-1 y el péptido NEP1-40 para Nogo-A y la enzima neuraminidasa para MAG (Tang y cols., 1997, Vinson y cols., 2001; GrandPre y cols., 2002; Schwab y cols., 2003; Venkatesh y cols., 2005). Nosotros hemos testado estas herramientas en cultivos organotípicos para ver la contribución de Nogo-A y MAG a la regeneración de la vía perforante (Tabla 1.3).

Pasados 15 días *in vitro*, la vía perforante pierde su capacidad de regeneración tras lesión. Cuando el cultivo es tratado con neuraminidasa después de la axotomía, el número de axones capaces de entrar en el hipocampo se ve muy aumentado. Una de las principales dianas de la neuraminidasa es MAG, ya que la eliminación selectiva de ácidos siálicos, o neuramínicos, presentes en diversas moléculas impide la actividad inhibitoria de MAG (Venkatesh y cols., 2005). IN-1, sin embargo, dirigido al dominio NiG de Nogo-A, no consigue promover un incremento claro en la regeneración axonal, si bien permite una longitud axonal mayor de aquellos pocos axones que consiguen entrar en el hipocampo. El bloqueo del segundo dominio inhibitorio de Nogo, loop-66, con el péptido NEP1-40 promueve la regeneración axonal en la misma medida que la neuraminidasa, y apoya la contribución de Nogo-A y NgR a la falta de regeneración de esta vía.

1.5 No hay sinergismo entre los PGCS y Nogo-66 tras lesión.

Además de los inhibidores asociados a mielina, los proteoglucanos han recibido mucha atención como inhibidores de la regeneración axonal. El hecho de que la mayoría de los proteoglucanos pierdan su efectividad al ser tratados con la enzima condroitinasa la ha convertido en una de las herramientas más utilizadas con fines terapéuticos y frecuente mente utilizada en terapias combinatoriales (Moon y cols., 2001; Bradbury y cols., 2002; Zuo y cols., 2002; Chau y cols., 2004; Fouad y cols., 2005). El tratamiento de cultivos axotomizados con esta enzima promueve el mejor rango de regeneración que hemos obtenido, en cuanto a cantidad de axones (10 veces más que en cultivos no tratados, en los cuales solo un promedio de 3-4 axones regenera), y también en cuanto a especificidad (inervación del SLM, y ML del giro). En principio, esta mayor efectividad de la condroitinasa parece sugerir que existe una contribución mayor, por parte de los proteoglucanos, a la falta de regeneración axonal en relación con aquella de Nogo-A/NgR. A pesar de esto, si los dos grupos de proteínas contribuyen a la prevención de la regeneración axonal una combinación de los dos bloqueos podría tener efecto acumulativo y permitir un grado de regeneración aún mayor que la condroitinasa de modo aislado. Para nuestra sorpresa este supuesto no se cumple, y el número de axones que regenera cuando ambas terapias se combinan no es superior al de la condroitinasa sola (tabla 1.3). Es más, la especificidad que aporta la condroitinasa se ve reducida en el tratamiento combinado por efecto de NEP1-40, así como la longitud de estos axones.

Una posible explicación sería que solo parte de la falta de regeneración está debida a la presencia de inhibidores, de modo que para promover regeneración más allá de la debida a los inhibidores (para la cual el bloqueo simple con condroitinasa sería suficiente) deberemos considerar otros aspectos, como proveer a los axones de un sustrato más permisivo o eliminar barreras físicas como la cicatriz glial. Otra opción es que en particular proteoglicanos y mielina parecen utilizar las mismas vías de señalización intracelular. En este sentido recientemente se ha demostrado que al menos algunos de los puntos clave de su señalización son compartidos, como PKC y RhoA (Monnier y cols., 2003; Fournier y cols., 2003; Schweigreiter y cols., 2004; Hasegawa y cols., 2004; Sivasankaran y cols., 2004). En este caso, la condroitinasa podría ser suficiente para reducir la activación de estas proteínas hasta un umbral a partir del cual las vías de señalización que quedan por debajo dejarían de estar activadas, y la adición de NEP1-40 no mostraría un efecto perceptible al haberse superado ella ese umbral (no nos pasa desapercibido que esta segunda opción no es independiente de la primera y podría fácilmente ser un caso particular de ésta).

2. Nogo-A y desarrollo neuronal

2.1. Nogo-A es expresado por neuronas durante el desarrollo

No existen aún en la bibliografía estudios acerca de la función neuronal de Nogo-A durante el desarrollo. Nosotros hemos visto que durante el desarrollo del SNC Nogo-A está además expresado por las células de glía radial, y que en neuronas en cultivo se localiza tanto en el retículo como en la membrana plasmática (Fig. 2.1).

2.2. El contacto con Nogo-A induce fasciculación *in vitro*

La presencia de Nogo-A en la membrana plasmática sugiere la existencia de un receptor para Nogo-A durante el desarrollo. De hecho, aún en ausencia de NgR las neuronas embrionarias son sensibles a la presencia de Nogo-A, a la cual responde con un incremento de fasciculación (Fig. 2.2). Esto puede responder a un descenso en la permisividad del sustrato, debido a la presencia de Nogo-A, lo que favorecería la adhesión de los axones entre sí (frente a adhesión al sustrato). Sin embargo, el patrón de expresión de Nogo-A durante el desarrollo parece sugerir lo contrario, ya que Nogo-A se encuentra preferentemente localizado en tractos axonales, lo que indica un papel neutral o adhesivo pero nunca antiadhesivo, sobretodo teniendo en cuenta su presencia en la membrana plasmática. La explicación más probable es que el efecto de Nogo-A en la neurona dependa del contexto en el cual éste se presente. Por un lado, los principales tractos axonales presentan niveles de Nogo-A particularmente elevados, y sus axones permanecen unidos. Por otro lado, la glía radial también expresa Nogo-A, y en este caso no hemos podido detectar que ninguna neurona exprese Nogo-A mientras migra sobre la glía radial, aunque comienzan a expresarlos tan pronto como se separan de la glía. Una forma de diferenciar el Nogo-A neuronal del glial, para la neurona, sería que éste

apreciera acompañado de diferentes proteínas. Por tanto el Nogo-A recombinante expresado por células en cultivo, y que se utiliza para los ensayos *in vitro*, podría simular el Nogo-A glial, induciendo la desadhesión de los axones que fascicularían entre ellos, mientras que la coexpresión de Nogo-A con otras proteínas neuronales en los tractos, como TAG-1 y DCC, podría inducir el efecto contrario y contribuir al mantenimiento del tracto.

2.3. IN-1 induce crecimiento axonal

Otro posible indicio de la función de Nogo-A en desarrollo se deriva del efecto que ejerce IN-1 en neuronas en desarrollo. La adición de IN-1 a neuronas en cultivo induce un claro incremento en la longitud de sus axones, independientemente del sustrato sobre el que crezcan y sobretodo de la presencia de Nogo-A en él, lo que indica que es un efecto de la unión de IN-1 a la neurona (Fig. 2.3). Si IN-1 promueve crecimiento por unión al Nogo-A neuronal, es posible que éste necesite dimerizar para inducir crecimiento axonal y la unión del anticuerpo promueve la formación de dímeros, como se ha observado para otras proteínas (Dickson y cols., 2002; Suda y cols., 1997). Sin embargo en nuestros experimentos *in vitro* no observamos esta dimerización, aunque si podemos detectar la interacción de Nogo-A con Nogo-B, por lo que parece que Nogo-A no formaría dímeros, al menos en líneas celulares, que no necesariamente expresan el ligando capaz de inducir esta dimerización.

3. La contribución de la mielina a la falta de regeneración

Cuando comparamos la aparición de los inhibidores del crecimiento axonal durante la evolución, vemos que la mayoría de ellos ya están presentes en vertebrados inferiores, y sin embargo el SNC de éstos tiene un alto grado de regeneración tras lesión (Battisti y cols., 1992; Becker y cols., 1995; Lehman y cols., 2004; Vourch y Andres., 2004; Diekmann y cols., 2005), por lo que su presencia no parece estar directamente ligada con la falta de regeneración axonal del SNC de mamíferos. Mas plausible sería que la regulación de la expresión de estas proteínas tras lesión sea lo que determine el grado final de regeneración axonal. En esto sentido se sabe que los oligodendrocitos de salamandra dejan de expresar MAG transitoriamente tras lesión, y que en anfibios, como en el SNP, los restos de mielina son rápidamente eliminados de la lesión por células fagocitarias (Wilson y cols., 1992; Sivron and Schwartz, 1995; Becker y cols., 1999). Parece pues que es la compleja reacción que tiene lugar tras lesión la que determina el éxito de la regeneración axonal, y no tanto la presencia aislada de los inhibidores.

Esta reacción parece ligada a la propia complejidad del SNC. Si lo largo de la evolución se ha favorecido la restricción de la regeneración axonal es posible que ésta aporte, directa o indirectamente, algún beneficio mayor. Posiblemente la reactividad de los astrocitos, que previene una cavitación excesiva, sea responsable directa de la supervivencia del animal tras la lesión (Faulker y cols., 2004), y cualquier mutación en contra de esta reactividad haya sido seleccionada negativamente a lo largo de la evolución. La mielina, por su parte, parece

contribuir a regular la plasticidad del SNC adulto, y un descenso en su restrictividad comprometería la alta especificidad del SNC, siendo por tanto también seleccionado negativamente. No resulta tan simple explicar por qué entonces no se regula la expresión de estos inhibidores asociados a mielina de modo que después de una lesión permitan un incremento de plasticidad durante una ventana temporal restringida, pero es posible que entre sus funciones haya algunas ventajosas en caso de lesión, como es la capacidad de la mielina de promover supervivencia neuronal, a la cual MAG podría contribuir directamente (Windebank y cols., 1985; Sanchez y cols., 1996).

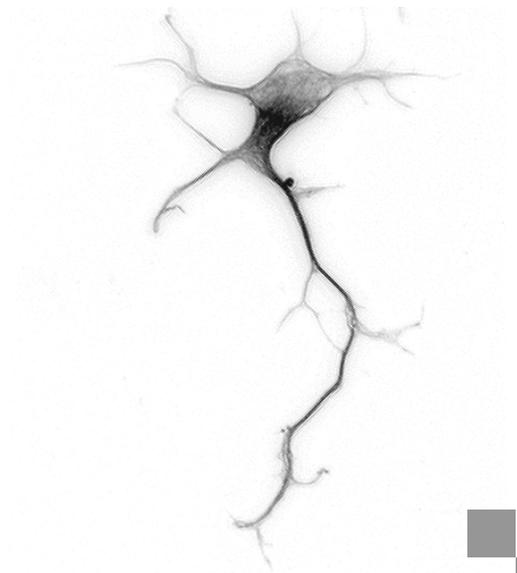
4. Convergencia intracelular y reciclaje de proteínas

A medida que se ha ido sabiendo más sobre los mecanismos moleculares que subyacen al crecimiento axonal y a su inhibición, se han ido encontrando pruebas de que existe una serie de vías y moléculas en las cuales converge toda la señalización que regula estas funciones. Para regular la movilidad axonal resulta necesario regular las GTPasas Rho (que controlan la dinámica del citoesqueleto), y esto es lo que hacen las moléculas de guía axonal y los inhibidores de regeneración. Además, antes de llegar al citoesqueleto, las vías de señalización que inducen en la neurona también convergen en una serie de puntos críticos, como es la regulación de los niveles de nucleótidos cíclicos y calcio intracelular, y la activación de PKC. La importancia de esta convergencia queda de manifiesto en nuestros resultados con el tratamiento combinado con condroitinasa y NEP1-40, ya que el bloqueo de diferentes inhibidores posiblemente será menos efectivo que el bloqueo de un inhibidor en combinación con un tratamiento distinto (dirigido al sustrato o a la supervivencia neuronal, por ejemplo), ya que los distintos inhibidores son en realidad diferentes formas de activar la misma vía.

Es curioso que muchas de las proteínas que inicialmente se caracterizaron como moléculas de guía axonal hayan resultado jugar un papel muy importante en el SNC maduro controlando la regeneración axonal. Tal es el caso de la Semaforina 4S, la Netrina 1 y la Efrina B3. Es muy posible que las vías de señalización que utilicen para prevenir la regeneración axonal sean las mismas que emplean durante el desarrollo en el mecanismo que quimiorrepulsión. Del mismo modo, es probable que proteínas como Nogo-A u OMgp, que han sido primeramente caracterizados en el contexto de la regeneración axonal, participen en la regulación de la atracción, repulsión y ramificación axonal durante el desarrollo.

CONCLUSIONES

1. Nogo-A es expresado por las neuronas del hipocampo durante el desarrollo y por neuronas principales, interneuronas y oligodendrocitos mielinizantes en el SNC maduro. La expresión de NgR es únicamente neuronal y comienza en estadios postnatales. El contacto con Nogo-A *in vitro* induce fasciculación en explantes embrionarios, pero no inhibe el crecimiento axonal.
2. La expresión de MAG por oligodendrocitos maduros sigue el proceso de mielinización y correlaciona con la pérdida gradual de capacidad de regeneración de la vía perforante.
3. La expresión de Nogo-A y NgR en neuronas está regulada por actividad neuronal. El ácido kaínico, el glutamato (para Nogo-A) y el BDNF disminuyen los niveles de expresión de Nogo-A y NgR. La expresión de NgR también es selectivamente reducida durante procesos de remodelación sináptica. Esto indica que Nogo-A y NgR podrían regular la estabilización y la plasticidad sináptica.
4. Nogo-A y MAG se sobreexpresan de manera transitoria por astrocitos reactivos y oligodendrocitos mielinizantes respectivamente en respuesta a la axotomía de la vía perforante. NgR experimenta una regulación bifásica y la reducción tardía de su expresión coincide con procesos de *sprouting* reactivo de las células granulares. Estos datos apoyan la participación de MAG, Nogo-A y NgR en la prevención de la regeneración axonal.
5. El bloqueo de MAG y de los dominios inhibitorios de Nogo-A promueve regeneración axonal.
6. Los proteoglucanos condrotín-sulfato se sobreexpresan tras axotomía de la vía perforante y su bloqueo permite la regeneración de esta vía.
7. El bloqueo combinado de los inhibidores asociados a mielina y los proteoglucanos condroitín-sulfato no presenta un efecto sinérgico sobre la regeneración de la vía perforante.



Annex

Nogo-A Functions during the development of the CNS and in the adult

Ana Mingorance, Eduardo Soriano and José A. del Río.

Revista de Neurología (2004) 39: 440-6

Funciones de Nogo-A durante el desarrollo del sistema nervioso central y en el animal adulto

A. Mingorance, E. Soriano-García, J.A. del Río

NOGO-A FUNCTIONS DURING THE DEVELOPMENT OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND IN THE ADULT

Summary. Objective. The myelin-associated inhibitors play a very important role in preventing the regeneration of the adult central nervous system. Among these inhibitors it is Nogo-A, a recently cloned protein expressed by oligodendrocytes. However, after its discovery as a myelin-associated protein, there has been described new functions for Nogo-A far from its role in the oligodendrocytes myelin. Development. After an introduction to the molecular changes that occur after a central nervous system (CNS) injury we focus in the figure of Nogo-A and its family of proteins. Finally, we make a revision of the different functions that have been described to date for Nogo-A, from the development of the CNS to the inhibition of axonal regeneration in the adult, highlighting the therapeutic potential of the selective blockade of Nogo-A. Conclusions. Although Nogo-A was discovered in the context of axonal growth inhibition, in which it is indeed playing a determining role, Nogo-A has turned out to be also a neuronal protein involved in diverse processes that go from axonal fasciculation to apoptosis. As we deepened in our knowledge about the molecular mechanisms that organize the complex functioning of the CNS, it is clearer that the proteins implicated in fasciculation and axonal guidance during development also play equally important roles in mechanisms like the axonal inhibition or the regulation of the synaptic plasticity in the adult CNS. [REV NEUROL 2004; 39: 440-6]

Key words. Fasciculation. Inhibition. Myelin. NgR. Nogo-A. Regeneration.

INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo se conoce que en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, los axones tienen una capacidad de regeneración muy limitada tras lesión. Una lesión anisotrópica en el SNC adulto lleva generalmente a la aparición de la llamada cicatriz meníngea (Fig. 1) [1]. La cicatriz meníngea es una estructura formada principalmente por astrocitos y células de las meninges que se infiltran en la zona de lesión, y constituye una barrera física y bioquímica para crecimiento axonal [1]. En los últimos años se han descrito un número elevado de moléculas inhibitorias para la regeneración axonal. Dentro de este grupo se encuentra la familia de los proteoglicanos condroitín sulfato (CSPG), que se sobreexpresan por los astrocitos y los progenitores de oligodendrocitos que se desplazan a la cicatriz glial, donde también se sobreexpresan otras proteínas inhibitorias, como las semaforinas –secretadas por las células de las meninges que se infiltran en la zona lesionada– (Fig. 1c). Un segundo grupo de proteínas inhibitorias se asocia constitutivamente a la mielina (Figs. 1b y 1c). Hasta la fecha se han identificado tres de estas proteínas: Nogo-A [2-4], la glucoproteína asociada a mielina (MAG) [5,6], y la recientemente descubierta glucoproteína de mielina oligodendroglial (OMgp) [7]. En esta revisión pretendemos dar una visión general del conocimiento actual sobre las funciones de Nogo-A como inhibidor asociado a mielina, así como sus funciones neuronales durante el desarrollo y en el adulto.

NOGO-A

Hace dos décadas, el grupo del profesor Martin Schwab identificó dos proteínas en la mielina, NI-250 y NI-35, como potentes inhibidores del crecimiento axonal [8]. Un anticuerpo monoclonal obtenido contra NI-250 (el anticuerpo IN-1) resultó ser capaz de revertir el efecto inhibitorio de la mielina y permitir a neuronas simpáticas y sensoriales crecer sobre ella [9]. Con estos prometedores resultados *in vitro*, el IN-1 se empleó en diferentes modelos de lesión *in vivo* con bastante éxito [10-12]. Sin embargo, la identidad del antígeno reconocido por IN-1 no se determinó hasta diez años después, cuando tres grupos independientemente lo identificaron como Nogo-A [2-4].

Nogo-A es el transcrito de mayor tamaño del gen *nogo* (RTN4), que da lugar a tres isoformas denominadas Nogo-A, -B y -C (Fig. 2a) [3]. Los tres miembros de Nogo pertenecen a una familia de proteínas descrita recientemente, pero muy extendida en la escala filogenética: la familia reticulón (RTN1-4) [13,14]. Esta familia posee una región C-terminal muy conservada –el dominio de homología reticulón (RHD)– que contiene dos dominios transmembrana y retiene a sus miembros en el retículo endoplasmático (Fig. 2b) [13]. Nogo-A (NI-250) y Nogo-B comparten una región N-terminal que en Nogo-A se continúa por una región central (NiG) ausente en Nogo-B y -C. Además, Nogo-C posee un corto dominio N-terminal de 11 aminoácidos y las tres isoformas de Nogo presentan el RHD en el C-terminal (Fig. 2a) [2,3].

Nogo-A, -B y -C se expresan en el SNC. Celularmente, Nogo-A se expresa en oligodendrocitos y sorprendentemente también en la mayoría de las neuronas (Fig. 2c), donde registra sus niveles más altos durante desarrollo [15-18]. Por otro lado, aunque los astrocitos no presentan Nogo-A durante el desarrollo y en el SNC adulto en condiciones normales, sí que son capaces de expresarlo, transitoriamente, después de una lesión mecánica [18].

Nogo-A, al contrario que Nogo-B y -C, se localiza, además de en el retículo, en la membrana plasmática [2,3]. Su topología indica que el dominio C-terminal permanece intracelular, seguido por los dos segmentos transmembrana que exponen extracelularmente un dominio de 66 aminoácidos –conocido como el *loop-66* presente en las tres isoformas de Nogo–. El segundo

Recibido: 05.07.04. Aceptado tras revisión externa sin modificaciones: 12.08.04.

Neurobiología del Desarrollo y la Regeneración. Departamento de Biología Celular. Universitat de Barcelona. Parc Científic de Barcelona-IRBB. Barcelona, España.

Correspondencia: Dr. J.A. del Río. Neurobiología del Desarrollo y la Regeneración. Departamento de Biología Celular. Universitat de Barcelona. Parc Científic de Barcelona-IRBB. Josep Samitier, 1-5. E-08028 Barcelona. Fax: +34 934 037 116. E-mail: jario@pcb.ub.es

Financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyectos, EET2002-05149 y BFI2003-03459, JADR; y Proyecto, SAF2001-03290; ES) y la Fundació la Caixa (JADR). A. Mingorance es becaria predoctoral del Ministerio de Educación y Cultura.

© 2004, REVISTA DE NEUROLOGÍA

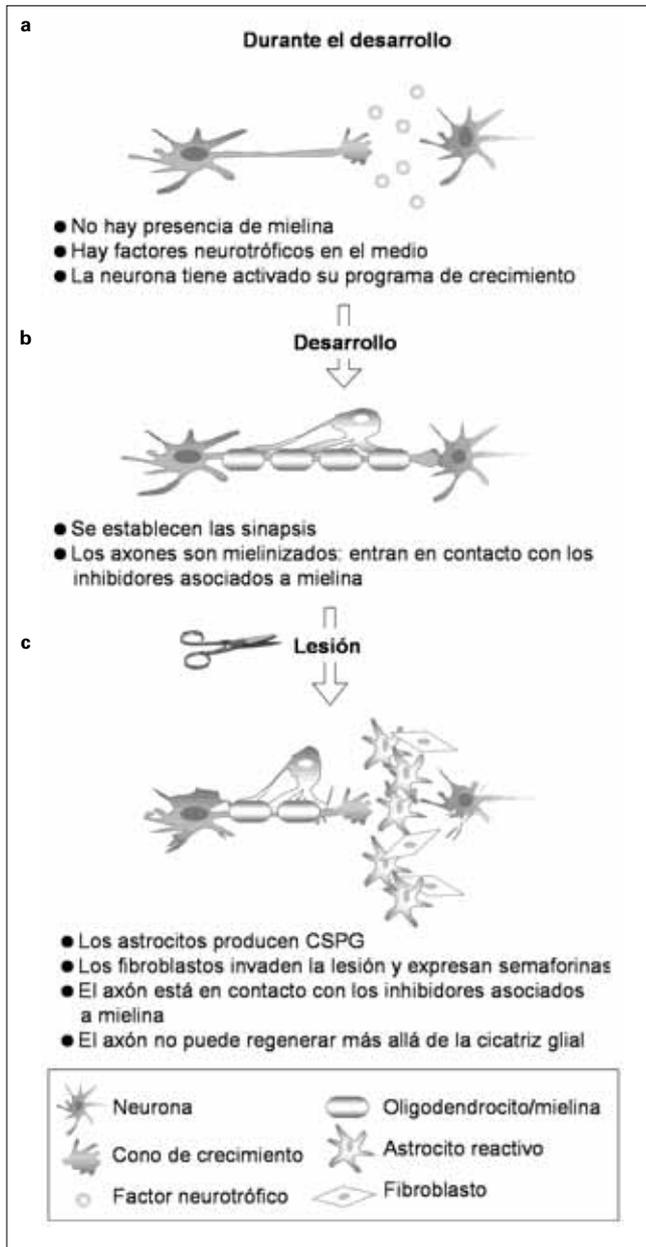


Figura 1. Esquema de la aparición de los inhibidores asociados a mielina durante el desarrollo. a) Durante el desarrollo los axones crecen y se guían hasta sus dianas, donde establecen sinapsis; b) Posteriormente, estas conexiones se mielinizarán; c) Tras una lesión, los inhibidores presentes en la mielina pueden contribuir a que el axón no sea capaz de regenerar.

segmento transmembrana cruza la misma en una o dos ocasiones y deja el largo dominio N-terminal de Nogo-A, con su región NiG, expuesto al lado extracelular en una fracción de las proteínas [19]. Diversos estudios han señalado que en estos dos dominios, el *loop-66* y el NiG, se localiza la actividad inhibitoria de Nogo-A [2,3,19,20].

FUNCIONES DE NOGO-A DURANTE EL DESARROLLO DEL SNC

Durante el desarrollo, Nogo-A se expresa en la mayoría de poblaciones neuronales, incluyendo las que se encuentran en es-

tadios de proliferación y migración (Figs. 3a y 3b) [15,17,18]. Esta presencia de Nogo-A en neuronas, previa a la expresión de NgR, ha llevado a algunos autores a indicar que Nogo-A podría llevar a cabo durante el desarrollo funciones no relacionadas con la inhibición del crecimiento axonal [17,18,21]. Tozaki et al, buscando un marcador para el tracto olfatorio lateral (LOT), obtuvieron un conjunto de anticuerpos monoclonales [17]. Uno de los anticuerpos teñía muy claramente este tracto axonal, principalmente en su porción más distal rica en conos de crecimiento. Para sorpresa de todos, el epítipo que observaban era Nogo-A. Los autores proponían para Nogo-A algún papel relacionado con la promoción del crecimiento axonal [17]. Recientemente, hemos aportado la primera evidencia directa de las funciones de Nogo-A durante el desarrollo axonal [18]. Haciendo crecer explantes de hipocampo embrionario *in vitro* sobre sustratos que contenían el *loop-66* aislado o bien la proteína entera Nogo-A, pudimos observar que las neuronas hipocámpicas embrionarias, en ausencia de NgR, son capaces de responder a la presencia de Nogo-A, y que esta respuesta se traduce en un incremento en la fasciculación axonal del explante (Figs. 3c y 3d) [18]. Por lo tanto, durante el desarrollo, Nogo-A podría participar en la formación de tractos –como apoya su patrón de expresión–, ya sea por interacciones homofílicas o heterofílicas; por ejemplo, vía la proteína F3/contactina, a la que Nogo-A es capaz de unirse (véase más adelante) (Fig. 4a) [22].

FUNCIONES INTRACELULARES DE NOGO-A

Desde su localización en el retículo endoplasmático, Nogo-A puede llevar a cabo diversas funciones, todavía poco caracterizadas (Fig. 4b). Por el contrario, se conoce que Nogo-B modula la actividad del protooncogén Bcl-2, lo transloca a retículo, e impide su función antiapoptótica; por tanto, Nogo-B cumple funciones proapoptóticas [23,24]. Dado que Nogo-A contiene la secuencia completa de Nogo-B, es muy posible que pueda regular también el proceso apoptótico. En este sentido, se ha descrito una proteína mitocondrial (NIMP), de función desconocida, capaz de interaccionar con Nogo-A [25]. La mitocondria desempeña un papel central en el proceso de apoptosis, por lo que NIMP puede representar una segunda vía que implicaría a Nogo-A en este proceso. Otras proteínas capaces de interaccionar con Nogo-A son la tubulina y la MBP, aunque se desconoce qué papel pueda desempeñar estas interacciones [26]. Además, algunos miembros de la familia Reticulón cumplen funciones relacionadas con el tráfico vesicular e incluso interaccionan con las proteínas SNARE; por ello, debido al alto grado de homología de los reticulones y su facilidad para asociarse unos a otros, no podemos descartar para Nogo-A una función similar [27].

FUNCIONES DE NOGO-A EN LA UNIÓN AXOGLIAL

En el inicio de la mielinización, Nogo-A se concentra especialmente –en la vaina de mielina– en la región paranodal, que es la zona que flanquea los nodos de Ranvier y donde el oligodendrocito y la neurona establecen un contacto más estrecho (Fig. 4c) [22]. Durante este período, Nogo-A (vía el *loop-66*) interacciona con el complejo Caspr/F3 de la superficie neuronal. Esta unión da lugar a un desplazamiento de los canales de potasio

desde el nodo al yuxtaparanodo, un proceso necesario para permitir la conducción saltatoria [22]. Es posible que pasado este período la distribución de Nogo-A varíe e interaccione preferentemente con NgR.

La interacción de Nogo-A con el complejo Caspr/F3 sólo se ha estudiado en el contexto de la unión axoglial; sin embargo, F3 es una proteína conocida por regular el crecimiento y fasciculación axonal durante el desarrollo—interacciona con diversas proteínas como componentes de la matriz extracelular y proteoglicanos como el fosfacán— [28,29]. Por tanto, F3 podría ser un ligando de Nogo-A durante el desarrollo, al expresarse ambos en neuronas e implicarse en fasciculación axonal.

NOGO-A COMO PROTEÍNA CLAVE EN LA INHIBICIÓN DE LA REGENERACIÓN AXONAL

Sin duda alguna, el papel mejor caracterizado de Nogo-A es el relacionado con la inhibición asociada a mielina. Nogo-A, junto con MAG y OMgp, se localiza en la membrana más exterior de la mielina, en estrecho contacto con el axón mielinizado, que expresa un conjunto de receptores capaces de inducir el colapso del cono de crecimiento en respuesta a estos ligandos [30,31].

Los receptores de Nogo-A y su señalización intracelular

El Nogo-receptor (NgR) se identificó inicialmente como receptor para el *loop-66* de Nogo-A, aunque más tarde resultó ser también el receptor común de los tres inhibidores asociados a mielina [20,32-34]. NgR es una proteína anclada a GPI y, por tanto, necesita el concurso de otras proteínas con dominio intracelular para poder inducir señalización intracelular.

El primer correceptor que se identificó fue p75, el receptor de baja afinidad de neurotrofinas [35,36]. Las neuronas del ratón deficiente para p75 tienen una mayor facilidad para crecer sobre sustratos ricos en mielina y, aunque su nivel de expresión es muy bajo en el SNC adulto, p75 se sobreexpresa tras lesión [35,36]. El tercer miembro del sistema de señalización NgR/p75 es una proteína específica del sistema nervioso que no se había caracterizado previamente y que ha recibido el nombre de LINGO-1 [37]. LINGO-1 se sobreexpresa en los axones de la médula espinal después de lesión y, al contrario que p75, se expresa a lo largo de todo el desarrollo [37]. Si bien no se ha determinado cómo LINGO-1 participaría en la señalización que da lugar a la inhibición del crecimiento axonal, su presencia parece ser necesaria para que esta señalización ocurra, posiblemente modulando la actividad de p75. Sin embargo, queda por descubrir el receptor neuronal para el dominio NiG de Nogo-A, por lo que no todos los inhibidores asociados a mielina emplearían el mismo complejo de receptores [38].

La principal vía de señalización que se activa tras la unión de Nogo-A a NgR es la de las GTPasas Rho, que también participan en la guía axonal mediada por otras moléculas de guía axonal como la efrina A1, sema 3A y netrina [35,38,39]. Para inducir la inhibición del crecimiento axonal, p75 libera a RhoA del complejo Rho-GDI—el cual impide la activación de RhoA—, y permite que RhoA se active por algún efector todavía sin identificar [40]. En consonancia, la señalización de NgR lleva a la inhibición de Rac1, una GTPasa de efecto opuesto al de RhoA [38]. El efecto combinado es la estabilización del citoesqueleto y el colapso del cono de crecimiento.

Otras vías parecen afectar la inhibición de la regeneración axonal y, por tanto, pueden interferir en la señalización mediada

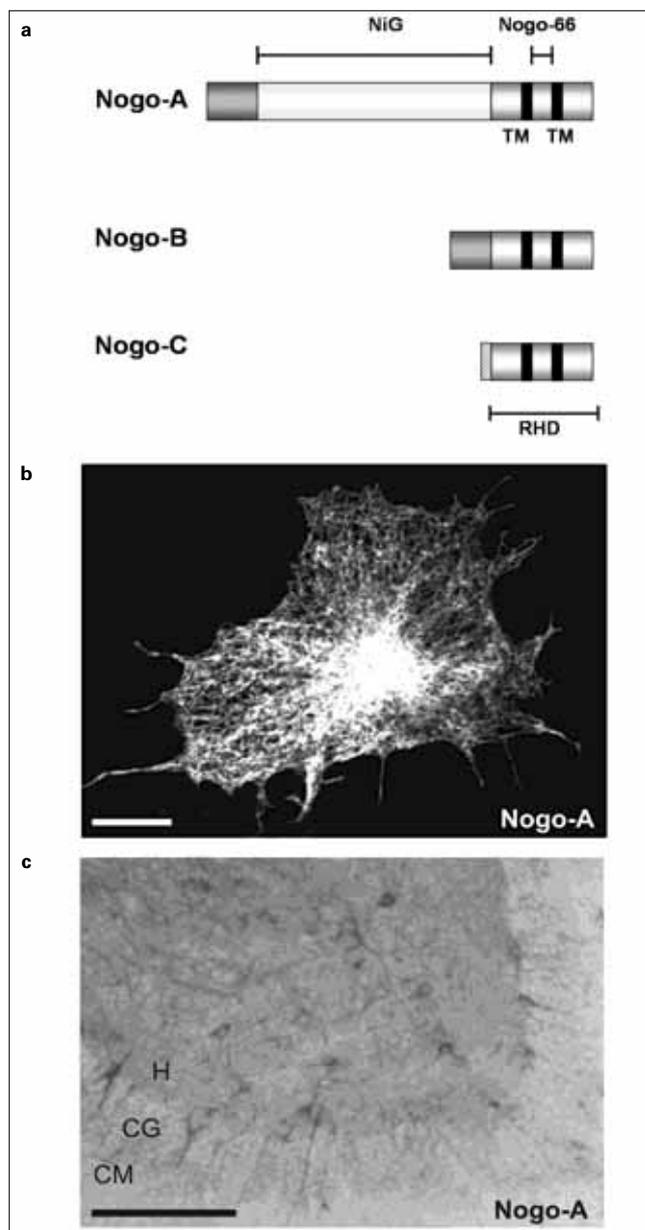


Figura 2. Estructura y localización celular de Nogo-A. a) Estructura de Nogo-A, -B y -C; b). Topología de Nogo-A en células COS transfectadas. El patrón de Nogo-A es típicamente reticular; c). Expresión de Nogo-A en neuronas del giro dentado. Algunas neuronas del hilus expresan niveles muy altos de Nogo-A. CG: capa granular; CM: capa molecular; H: hilus; NiG: dominio central exclusivo de Nogo-A; Nogo-66: dominio *loop-66* de Nogo-A; TM: dominios transmembrana. Barras de escala: B, 10 μ m; C, 30 μ m.

por NgR. Recientemente, se ha visto que tanto la mielina como los CSPG son capaces de activar a la proteína cinasa C (PKC) [41]. Esta activación parece necesitarse para que se produzca la inhibición de la regeneración axonal, ya que el bloqueo farmacológico y genético de la PKC atenúa los efectos inhibitorios de los mismos [41]. También la elevación farmacológica del AMP cíclico con análogos consigue bloquear la inhibición por mielina de un modo dependiente de la proteína cinasa A (PKA), lo que indica que el proceso de inhibición del crecimiento axonal se regula por PKC y PKA [42-44].

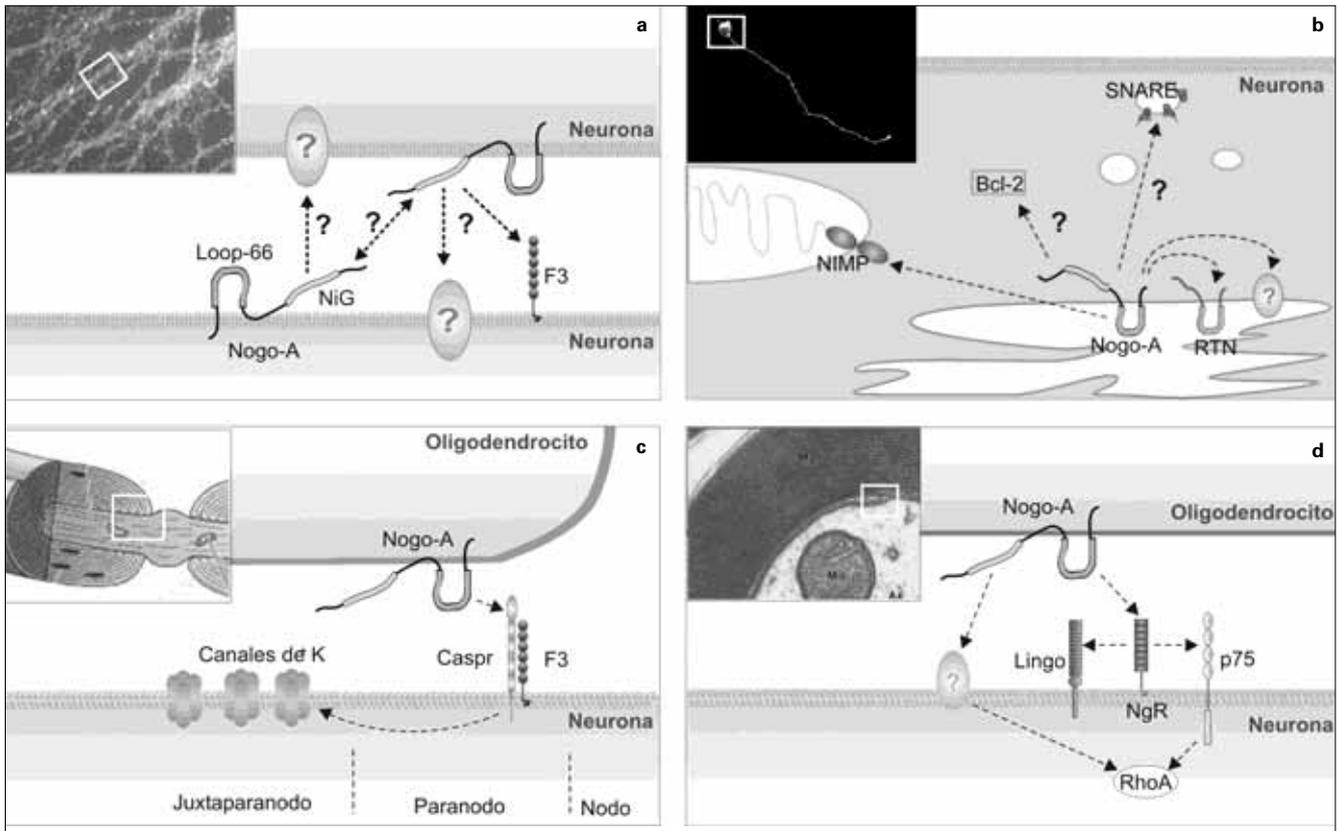


Figura 3. Funciones de Nogo-A. a) Función del Nogo-A neuronal durante el desarrollo. La inducción de fasciculación por parte de Nogo-A puede mediar-se por una asociación homofílica (Nogo-A/Nogo-A) o heterofílica, por unión a proteínas todavía sin identificar o, por ejemplo, F3/contactina; b) Funcio-nes intracelulares de Nogo-A. Se señalan las distintas proteínas conocidas por interactuar con Nogo-A u otros reticulones; c) Función de Nogo-A en la unión axoglial. Nogo-A se localiza en la mielina, en la región correspondiente con los paranodos; d) Función inhibitoria de Nogo-A. Nogo-A promueve inhibición neuronal vía sus dos dominios. El receptor de NiG se desconoce. El *loop-66* actúa a través de NgR y sus dos correceptores (LINGO-1 y p75). Ambos dominios inducen la activación de Rho-A. MAG y OMgp, que activan las mismas vías a través de NgR, no se representan.

EL BLOQUEO DE LAS FUNCIONES DE NOGO-A Y LA POTENCIACIÓN DE LA REGENERACIÓN AXONAL

Hasta el momento se han llevado a cabo tres estrategias para estudiar las funciones de Nogo-A como inhibidor e intentar potenciar la regeneración axonal. La primera ha sido la generación de ratones deficientes para Nogo-A y NgR, y las siguientes, con aplicabilidad terapéutica clara, son el bloqueo de los dominios NiG y *loop-66* de Nogo-A, y la vacunación con antígenos presentes en la mielina.

La regeneración axonal en ausencia de Nogo-A, el ratón deficiente

Tres grupos independientes han generado un total de cuatro líneas de ratones deficientes para Nogo-A, deficientes para Nogo-A y -B (dos líneas diferentes) y deficientes para Nogo-A, -B y -C [45-47]. El fenotipo, comportamiento y viabilidad de todos los animales mutantes es completamente normal; sin embargo, corroborando los ensayos *in vitro*, la mielina obtenida a partir de todas las líneas deficientes posee unas propiedades inhibitorias muy reducidas [45-47]. Respecto a regeneración axonal, el resultado más positivo fue el obtenido con un mutante para Nogo-A y -B. Al menos en los animales jóvenes, los axones del tracto corticospinal (CST) son capaces de crecer extensivamente y regenerar hasta segmentos medulares distales,

lo que ha permitido una mejora funcional [45]. Los resultados con el mutante simple para Nogo-A son muchos más modestos y en las dos últimas líneas, deficientes de Nogo-A/B y Nogo-A/B/C, no se ha podido ver ningún incremento en la capacidad de regeneración [46, 47]. Por desgracia, la variabilidad de regeneración axonal que se observa en las diferentes líneas de ratones no permite extraer un dato concluyente acerca de la importancia final de Nogo-A en la ausencia de regeneración neuronal a partir de su estudio.

El ratón deficiente en NgR

Recientemente, el grupo del profesor Stephen Strittmatter ha generado el ratón mutante que carece de NgR [48]. Las neuronas de este animal presentan una sensibilidad bastante reducida a la mielina cuando se cultivan *in vitro*. Además, en el ratón deficiente de NgR, la regeneración del CST se incrementa respecto a animales control, y se acompaña por una recuperación funcional muy significativa incluso tras sección completa de la médula espinal [48]. Los datos obtenidos a partir de este animal indican que NgR desempeña un papel principal en la transducción de señal de los inhibidores asociados a mielina, y que éstos, a su vez, contribuyen de manera significativa a la escasa regeneración axonal que se observa en el SNC adulto. Posiblemente, en los mutantes simples de Nogo-A, la presencia de MAG y OMgp sea suficiente para impedir una regene-

ración clara de los axones lesionados, y es el ratón deficiente para NgR el que representa la mejor aproximación para determinar el papel de los inhibidores asociados a mielina [49].

El anticuerpo bloqueador de Nogo-A: IN-1

Desde antes de que se descubriera Nogo-A como el antígeno reconocido por IN-1, este anticuerpo se usó en numerosos estudios *in vivo* e *in vitro*, y se consiguieron buenos resultados. Actualmente, se conoce que el anticuerpo IN-1 reconoce la región central de Nogo-A (el dominio NiG), un dominio capaz de inhibir tanto células neuronales como no neuronales a través de un receptor desconocido [50]. La mayoría de los experimentos con IN-1 se centraron en el CST, donde se observó un incremento de axones capaces de regenerar después del tratamiento con el anticuerpo. Si bien no conseguían una regeneración cuantitativamente importante, los axones eran capaces de recrecer largas distancias y permitir cierto grado de recuperación funcional [10,11,51,52]. En otros ensayos se estudió con éxito el efecto de IN-1 sobre la regeneración de los tractos rubroespinal, corticoestriatal y corticofugal, los axones septohipocámpicos, el tracto auditivo, las proyecciones eferentes corticales y la conexión entorrinohipocámpica [18,53-57]. Sin embargo, el anticuerpo IN-1—tanto en su forma IgM original como en fragmento F_{ab} recombinante— presenta una afinidad muy baja y una especificidad limitada por Nogo-A, lo que ha limitado su uso como agente terapéutico [50].

El péptido NEP1-40

El *loop*-66 es el segundo dominio inhibitorio de Nogo-A [20]. Para impedir la unión de este dominio a su receptor (NgR), se ha sintetizado un péptido, con los primeros 40 aminoácidos del *loop*-66, con capacidad de unirse a NgR, pero no de activarlo [58]. El péptido agonista NEP1-40 (del inglés, *Nogo Extracellular Peptide, residues 1-40*) promueve la regeneración anatómica y funcional del CST [58]. La administración del NEP1-40 ha resultado ser muy eficaz como terapia sistémica, y puede administrarse incluso por vía subcutánea en animales de experimentación [59]. Otro dato positivo es que, posponiendo el inicio del tratamiento con NEP1-40 en ratas lesionadas hasta una semana después de la lesión, los efectos continúan siendo igualmente efectivos, lo que convierte al NEP1-40 en un agente terapéutico con elevado potencial [58,59].

La vacunación como prevención de esclerosis múltiple y como potenciador de la regeneración axonal tras lesión

Una aproximación terapéutica muy reciente para promover regeneración tras lesiones medulares es la vacunación contra an-

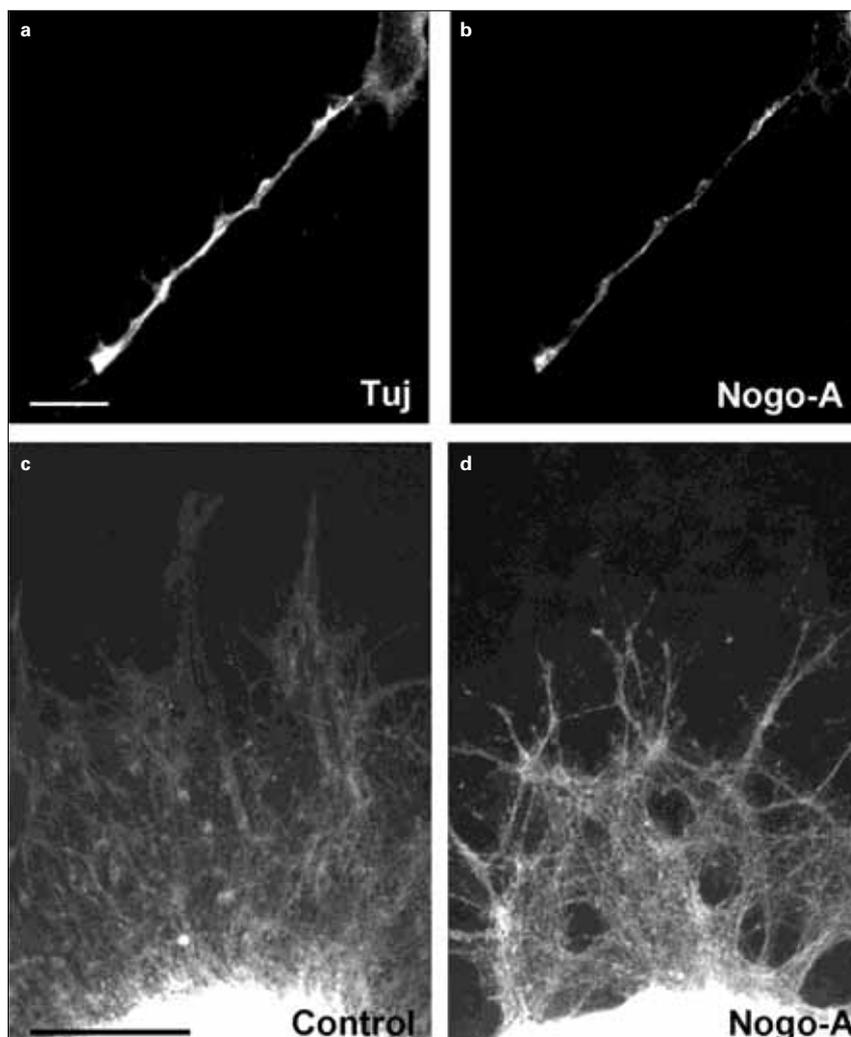


Figura 4. Expresión de Nogo-A por neuronas y su efecto sobre axones en desarrollo. a,b) Presencia de Nogo-A en neuronas granulares de cerebelo *in vitro*. Las neuronas se obtuvieron de un ratón en el día posnatal cinco y mantenidas en cultivo por 16 horas. La imagen a corresponde con una inmunocitoquímica para TUJ-1 (tubulina, marcador neuronal) y la imagen b corresponde a la misma célula marcada con un anticuerpo anti-Nogo-A. Notar la presencia de Nogo-A en el axón y el cono de crecimiento. c,d). Efecto de Nogo-A en explantes embrionarios. Los explantes de hipocampo se obtuvieron de un ratón en el estadio embrionario E16, y se plantaron sobre un sustrato con o sin Nogo-A (d y c, respectivamente). Después de cinco días *in vitro*, los explantes que no han entrado en contacto con Nogo-A presentan un crecimiento radial, mientras que los explantes que se han expuesto a Nogo-A presentan una fasciculación muy llamativa. Barras de escala: a-b, 10 µm; c-d, 100 µm.

tígenos presentes en la mielina. La inmunización con péptidos derivados de Nogo-A y otros inhibidores asociados a mielina es capaz de estimular al sistema inmunitario para producir anticuerpos contra estas proteínas. Este tratamiento, que se puede administrar después de realizada la lesión, ha resultado ser de gran utilidad para promover la regeneración del CST y del tracto óptico en animales de experimentación [60-62]. Otra enfermedad en la que se ha aplicado recientemente con éxito la vacunación contra Nogo-A es el de la esclerosis múltiple (EM) [64]. La EM es una enfermedad inflamatoria autoinmune contra componentes de la mielina [63]. Gran parte de la sintomatología que presenta esta enfermedad deriva del daño neuronal asociado a la desmielinización, debido en parte a la gran cantidad de proteínas inhibitorias presentes en los restos de mielina y que entran en contacto con los axones. La vacunación activa con un péptido derivado de Nogo-A, o el

tratamiento con anticuerpos que reconocen a Nogo-A, disminuye este daño neuronal en un modelo animal de EM [64]. Esta inmunización tiene la ventaja de no inducir *per se* la enfermedad, como es el caso de otras proteínas asociadas a mielina (como MOG y MBP), y en cambio bloquea la inhibición por Nogo-A una vez comenzada la desmielinización [64]. Por tanto, la vacunación contra Nogo-A tras una lesión o tras el inicio de una EM es capaz de prevenir parte del daño axonal y promover su regeneración, si bien en el caso de la EM no es capaz de impedir el desarrollo inflamatorio de la enfermedad.

CONCLUSIONES

En esta revisión hemos pretendido dar una visión integradora del conocimiento actual que se tiene sobre las funciones de Nogo-A. A la luz de lo que se ha descrito sobre Nogo-A en los cuatro años que han transcurrido desde su descubrimiento, todo hace pensar que nos encontramos con una familia de proteínas capaces de llevar a cabo muy diversas funciones, ya sea durante el desarrollo o en el adulto, de un modo similar a los que se ha descrito para las efrinas, implicadas en guía axonal y fasciculación durante el desarrollo, y, curiosamente, en inhibición de la regeneración axonal tras lesión en el adulto [65].

BIBLIOGRAFÍA

1. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999; 49: 377-91.
2. Chen MS, Huber AB, Van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000; 403: 434-9.
3. GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000; 403: 439-44.
4. Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 2000; 403: 383-4.
5. McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE, et al. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 1994; 13: 805-11.
6. Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 1994; 13: 757-67.
7. Kottis V, Thibault P, Mikol D, Xiao ZC, Zhang R, Dergham P, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem* 2002; 82: 1566-9.
8. Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 1988; 106: 1281-8.
9. Caroni P, Schwab ME. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1988; 1: 85-96.
10. Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 1990; 343: 269-72.
11. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, Dai HN, Gao D, Schwab ME. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995; 378: 498-501.
12. Thallmair M, Metz GA, Z'Graggen WJ, Raineteau O, Kartje GL, Schwab ME. Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci* 1998; 1: 124-31.
13. Oertle T, Klinger M, Stuermer CA, Schwab ME. A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *FASEB J* 2003; 17: 1238-47.
14. Oertle T, Schwab ME. Nogo and its partners. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 187-94.
15. Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, Olson L, Spenger C. NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol* 2001; 169: 319-28.
16. Huber AB, Schwab ME. Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* 2000; 381: 407-19.
17. Tozaki H, Kawasaki T, Takagi Y, Hirata T. Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 104: 111-9.
18. Mingorance A, Fontana X, Sole M, Burgaya F, Urena JM, Teng FY, et al. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Mol Cell Neurosci* 2004; 26: 34-49.
19. Oertle T, Van der Haar ME, Bandtlow CE, Robeva A, Burfeind P, Buss A, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 2003; 23: 5393-406.
20. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001; 409: 341-6.
21. Hunt D, Mason MR, Campbell G, Coffin R, Anderson PN. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Mol Cell Neurosci* 2002; 20: 537-52.
22. Nie DY, Zhou ZH, Ang BT, Teng FY, Xu G, Xiang T, et al. Nogo-A at CNS paranodes is a ligand of Caspr: possible regulation of K(+) channel localization. *Embo J* 2003; 22: 5666-78.
23. Li Q, Qi B, Oka K, Shimakage M, Yoshioka N, Inoue H, et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3929-36.
24. Watari A, Yutsudo M. Multi-functional gene ASY/Nogo/RTN-X/RTN4: apoptosis, tumor suppression, and inhibition of neuronal regeneration. *Apoptosis* 2003; 8: 5-9.
25. Hu WH, Hausmann ON, Yan MS, Walters WM, Wong PK, Bethea JR. Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein (NIMP). *J Neurochem* 2002; 81: 36-45.
26. Taketomi M, Kinoshita N, Kimura K, Kitada M, Noda T, Asou H, et al. Nogo-A expression in mature oligodendrocytes of rat spinal cord in association with specific molecules. *Neurosci Lett* 2002; 332: 37-40.
27. Steiner P, Kulangara K, Sarria JC, Glauser L, Regazzi R, Hirling H. Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J Neurochem* 2004; 89: 569-80.
28. Xiao ZC, Revest JM, Laeng P, Rougon G, Schachner M, Montag D. Defasciculation of neurites is mediated by tenascin-R and its neuronal receptor F3/11. *J Neurosci Res* 1998; 52: 390-404.
29. Falk J, Bonnon C, Girault JA, Faivre-Sarrailh C. F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol Cell* 2002; 94: 327-34.
30. Fournier AE, GrandPre T, Gould G, Wang X, Strittmatter SM. Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res* 2002; 137: 361-9.
31. Schwab ME. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14: 118-24.
32. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002; 417: 941-4.
33. Liu BP, Fournier A, GrandPre T, Strittmatter SM. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science* 2002; 297: 1190-3.
34. Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 2002; 35: 283-90.
35. Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol* 2002; 157: 565-70.
36. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002; 5: 1302-8.
37. Mi S, Lee X, Shao Z, Thill G, Ji B, Relton J, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004; 7: 221-8.
38. Niederost B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 2002; 22: 10368-76.
39. Gallo G, Letourneau PC. Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* 2004; 58: 92-102.
40. Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 2003; 6: 461-7.
41. Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM, et al. PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 2004; 7: 261-8.
42. Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 1999; 22: 89-101.
43. Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT. Neuronal

- cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci* 2001; 21: 4731-9.
44. Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* 2002; 34: 895-903.
 45. Kim JE, Li S, GrandPre T, Qiu D, Strittmatter SM. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 2003; 38: 187-99.
 46. Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, et al. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron* 2003; 38: 201-11.
 47. Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 2003; 38: 213-24.
 48. Kim JE, Liu BP, Yang X, Strittmatter SM. Recovery from spinal cord injury in mice lacking the nogo-66 receptor. Program No. 415.11. 2003 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience; 2003 [on line]. URL: <http://sfn.scholarone.com/itin2003/index.html>.
 49. Woolf CJ. No Nogo: now where to go? *Neuron* 2003; 38: 153-6.
 50. Fiedler M, Horn C, Bandtlow C, Schwab ME, Skerra A. An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng* 2002; 15: 931-41.
 51. Raineteau O, Fouad K, Noth P, Thallmair M, Schwab ME. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6929-34.
 52. Von Meyenburg J, Brosamle C, Metz GA, Schwab ME. Regeneration and sprouting of chronically injured corticospinal tract fibers in adult rats promoted by NT-3 and the mAb IN-1, which neutralizes myelin-associated neurite growth inhibitors. *Exp Neurol* 1998; 154: 583-94.
 53. Merkle D, Metz GA, Raineteau O, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J Neurosci* 2001; 21: 3665-73.
 54. Wenk CA, Thallmair M, Kartje GL, Schwab ME. Increased corticofugal plasticity after unilateral cortical lesions combined with neutralization of the IN-1 antigen in adult rats. *J Comp Neurol* 1999; 410: 143-57.
 55. Z'Graggen WJ, Metz GA, Kartje GL, Thallmair M, Schwab ME. Functional recovery and enhanced corticofugal plasticity after unilateral pyramidal tract lesion and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors in adult rats. *J Neurosci* 1998; 18: 4744-57.
 56. Cadelli D, Schwab ME. Regeneration of lesioned septohippocampal acetylcholinesterase-positive axons is improved by antibodies against the myelin-associated neurite growth inhibitors NI-35/250. *Eur J Neurosci* 1991; 3: 825-32.
 57. Tatagiba M, Rosahl S, Gharabaghi A, Blomer U, Brandis A, Skerra A, et al. Regeneration of auditory nerve following complete sectioning and intrathecal application of the IN-1 antibody. *Acta Neurochir (Wien)* 2002; 144: 181-7.
 58. GrandPre T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 2002; 417: 547-51.
 59. Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury. *J Neurosci* 2003; 23: 4219-27.
 60. Huang DW, McKerracher L, Braun PE, David S. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord. *Neuron* 1999; 24: 639-47.
 61. Hauben E, Ibarra A, Mizrahi T, Barouch R, Agranov E, Schwartz M. Vaccination with a Nogo-A-derived peptide after incomplete spinal-cord injury promotes recovery via a T-cell-mediated neuroprotective response: comparison with other myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15173-8.
 62. Sicotte M, Tsatas O, Jeong SY, Cai CQ, He Z, David S. Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23: 251-63.
 63. Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25: 491-505.
 64. Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, et al. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 2004; 7: 736-44.
 65. Martínez A, Otal R, Soriano-García E. Efrinas, desarrollo neuronal y plasticidad. *Rev Neurol* 2004; 38: 647-55.

FUNCIONES DE NOGO-A DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y EN EL ANIMAL ADULTO

Resumen. *Objetivo.* Los inhibidores asociados a la mielina desempeñan un papel muy importante a la hora de impedir la regeneración axonal del sistema nervioso central (SNC) en el animal adulto. Dentro de estos inhibidores destaca Nogo-A, una proteína recientemente identificada con expresión en oligodendrocitos. Sin embargo, tras su descubrimiento como proteína asociada a la mielina, se han empezado a describir nuevas funciones para Nogo-A que distan mucho de su papel en la mielina de los oligodendrocitos. *Desarrollo.* Tras una introducción a los cambios moleculares que tienen lugar después de una lesión en el SNC, nos centramos en la figura de Nogo-A y su familia de proteínas. Finalmente, hacemos un repaso de las diferentes funciones que hasta la fecha se han descrito para Nogo-A, desde el desarrollo del SNC hasta la inhibición de la regeneración en el adulto, y haremos hincapié en el potencial terapéutico que representa el bloqueo de Nogo-A. *Conclusiones.* Aunque Nogo-A se descubriera en el contexto de la inhibición del crecimiento axonal, y efectivamente desempeña un papel determinante en esta inhibición, Nogo-A ha resultado ser también una proteína neuronal implicada en diversos procesos durante el desarrollo y en el adulto, que van desde la fasciculación axonal hasta la apoptosis. A medida que profundizamos en nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que organizan el complejo funcionamiento del SNC, resulta más claro que las proteínas que se implican en fasciculación y guía axonal durante el desarrollo llevan a cabo en el SNC adulto funciones igualmente importantes en procesos como la inhibición axonal o la regulación de la plasticidad sináptica. [REV NEUROL 2004; 39: 440-6]

Palabras clave. Fasciculación. Inhibición. Mielina. NgR. Nogo-A. Regeneración.

FUNÇÕES DE NOGO-A DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVIOSO CENTRAL E NO ANIMAL ADULTO

Resumo. *Objectivo.* Os inibidores associados à mielina desempenham um papel importante no momento de impedir a regeneração axonal do sistema nervoso central (SNC) no animal adulto. Dentro destes inibidores destaca-se a Nogo-A, uma proteína recentemente identificada com expressão em oligodendrócitos. Contudo, após a sua descoberta como proteína associada à mielina, começaram a descrever-se novas funções para a Nogo-A que distam muito do seu papel na mielina dos oligodendrócitos. *Desenvolvimento.* Após uma introdução às alterações moleculares que têm lugar após uma lesão no SNC, centramo-nos na figura da Nogo-A e sua família de proteínas. Finalmente, fazemos uma revisão das diferentes funções, que até à data foram descritas para Nogo-A, desde o desenvolvimento do SNC até à inibição da regeneração no adulto, e insistiremos sobre o potencial terapéutico que representa o bloqueio de Nogo-A. *Conclusões.* Embora Nogo-A tenha sido descoberto no contexto da inibição do crescimento axonal, e efectivamente desempenhe um papel determinante nesta inibição, Nogo-A é também uma proteína neuronal envolvida em diversos processos durante o desenvolvimento e no adulto, que vão desde a fasciculação axonal até à apoptose. À medida que aprofundamos o nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares que organizam o complexo funcionamento do SNC, é mais claro que as proteínas envolvidas na fasciculação e guia axonal durante o desenvolvimento realizam no SNC adulto funções igualmente importantes em processos como a inibição axonal ou a regulação da plasticidade sináptica. [REV NEUROL 2004; 39: 440-6]

Palavras chave. Fasciculação. Inibição. Mielina. NgR. Nogo-A. Regeneração.