



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

Elisabet Reyes Irisarri
Barcelona 2007

Discusión

Los resultados obtenidos en la presente tesis ponen en evidencia que, de todas las fosfodiesterasas analizadas, la PDE4B2 es la que se halla involucrada en algunos procesos inflamatorios, bien activando posiblemente las células en las que se expresa, linfocitos T y microglía en el caso de la EAE o bien participando en la comunicación entre el sistema inmune periférico y el sistema nervioso central en el modelo de inflamación del LPS.

1. PDE4 Y SUS ISOFORMAS

1.1. Expresión del ARNm de las variantes de *splicing* de la PDE4B

El estudio de la localización de la expresión de los ARNm de las cuatro isoformas de la PDE4B en cerebro de rata mediante hibridación *in situ* mostró un patrón diferencial para cada isoforma que coincidía en algunas regiones como, por ejemplo, la capa granular del cerebelo y la corteza piriforme (Trabajo 3).

Se encontró expresión de las cuatro isoformas de la PDE4 en la formación hipocampal, una de las regiones límbicas implicadas en procesos de aprendizaje y memoria. Estudios realizados con rolipram y otros inhibidores específicos de las PDE4, han puesto en evidencia la participación de la PDE4 en procesos cognitivos (Barad et al., 1998; Bach et al., 1999; Nagakura et al., 2002; Rose et al., 2005; Comery et al., 2005), tales como la posibilidad de fomentar la memoria operativa (*working memory*) dependiente de hipocampo o bien la reducción del deterioro cognitivo asociado con enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas. La posible relación entre la PDE4 y la memoria viene ya de los resultados obtenidos al transfectar el gen de rata de esta familia en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* con mutaciones en el gen *dunce* que provocaba una recuperación de los procesos de memoria y aprendizaje alterados por la mutación (Dauwalder and Davis, 1995). Las cuatro isoformas están presentes en los campos CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, siendo la PDE4B2 la única que se expresa en el giro dentado. La transmisión de la información en el hipocampo forma un circuito trisináptico (Brown and Zador, 1990) en el que los estímulos sensoriales entran por la corteza entorrinal para llegar a las células granulares del giro dentado, desde donde, a través de los axones de las fibras musgosas, se dirigen hacia las neuronas piramidales de la CA3, que envía sus axones colaterales de Schaffer hacia las neuronas piramidales de la CA1. Algunas de las sinapsis de este circuito presentan una forma de plasticidad, la potenciación a largo plazo (LTP, *long term potentiation*), que es importante en las funciones de memoria (Brown et al., 1988), y el aprendizaje rápido en mamíferos (Brown and Zador, 1990). La LTP se ha estudiado principalmente en fibras musgosas y en axones colaterales de Schaffer. Estos estudios realizados con rolipram, junto con la expresión exclusiva de la PDE4B2 en el giro dentado, podrían sugerir la implicación de esta isoforma en la regulación de la LTP en las fibras musgosas. Se ha descrito que la PDE4B3 participa en la regulación de la LTP en el hipocampo (Ahmed and Frey, 2003). Al existir diferentes mecanismos de LTP para ambos sistemas, el de las fibras musgosas y el de los axones colaterales de Schaffer, sugeriría que la PDE4B3 podría participar en la

regulación de la LTP de los axones de Schaffer, que tiene lugar en el CA3, donde todas las isoformas de la PDE4B se expresan, y que la PDE4B2, estaría involucrada en la LTP del sistema de fibras musgosas, que se origina en el giro dentado, donde únicamente se expresa esta isoforma.

Además se encontraron diferencias en la expresión de las isoformas en la sustancia blanca, integrada por oligodendrocitos y astrocitos, donde el ARNm de la PDE4B1 no se detectó, los de la PDE4B4 y la PDE4B2 mostraron niveles bajos de expresión, y el de la PDE4B3 presentó una elevada expresión que podría indicar su participación en la regulación de los niveles de AMPc de estas células.

Otra región importante donde se encontraron diferencias entre la expresión de las isoformas es el área postrema, órgano circumventricular relacionado con la inducción del vómito (Borinson H.L. and Wang, 1953; Carpenter et al., 1988). Los efectos eméticos del rolipram, al usarse inicialmente como antidepresivo (Scott et al., 1991) y otros inhibidores de la PDE4 como, roflumilast y cilomilast, utilizados en el tratamiento del asma o de la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, COPD) (Spina, 2003) son bien conocidos. En este órgano se encontró la expresión de la PDE4B1, la PDE4B2 y la PDE4B3, pero no la de la PDE4B4. El hecho de no encontrar el ARNm de la PDE4B4 en el área postrema de la rata junto con la observación de que la PDE4B4 en humanos no codifica para una proteína (Shepherd et al., 2003) señala la importancia de conocer la expresión de las isoformas de la PDE4B en ésta y otras áreas relacionadas con estos efectos secundarios en el cerebro humano. Esta información puede ser de gran utilidad en la búsqueda de inhibidores específicos de las variantes de *splicing* de la PDE4B que no presenten dichos efectos secundarios.

1.2. Regulación de la expresión de la PDE4B y sus variantes de *splicing* en el modelo de inflamación con LPS y en el modelo de esclerosis múltiple, EAE

En los trabajos 3 y 4 hemos estudiado la regulación de la expresión de las cuatro isoformas de la PDE4B en el cerebro de la rata en dos modelos animales diferentes, EAE e inflamación con LPS, cuya característica común es la inducción de una respuesta inmune.

Los niveles de nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, juegan un papel importante en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria (Dent and Giembycz, 1996; Essayan, 1999). El tratamiento con moléculas que producen un aumento en los niveles de AMPc provoca la inhibición de la respuesta inmune (Goodwin and Ceuppens, 1983; Moore and Willoughby, 1995). Muchos de ellos se han realizado con inhibidores de las PDE, especialmente los de la PDE4, como el rolipram (Seldon et al., 1995; Eigler et al., 1998; Giembycz, 2000), el cilomilast o el roflumilast (Lagente et al., 2005) en el estudio de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (asma o EPOC), artritis reumatoide o esclerosis múltiple (Huang et al., 2001).

El fenotipo de los ratones mutantes nulos para diferentes isoenzimas de la PDE4 (PDE4A, PDE4B y PDE4D) (ver Tabla 1.5.) generados por el grupo de Conti (Jin et al.,

1999; Jin and Conti, 2002; Ariga et al., 2004; Jin et al., 2005a) apoyan la idea de la implicación de estas isoenzimas, especialmente de la PDE4B, en la respuesta inflamatoria. Los leucocitos obtenidos a partir de ratones mutantes nulos para la PDE4B producen muy poco TNF- α después de una estimulación *in vitro* con LPS, mientras que la respuesta de los leucocitos de ratones mutantes nulos de la PDE4D no está alterada (Jin and Conti, 2002). Estos autores también demuestran que de las tres PDE4 expresadas en macrófagos periféricos sólo la PDE4B es la que está involucrada en la señalización del LPS (Jin et al., 2005a). En este mismo trabajo se concluye que los efectos farmacológicos sobre la producción de TNF- α de los inhibidores de las PDE4 son a través de la inhibición directa del isoenzima PDE4B.

En el modelo inflamatorio con LPS estudiamos la expresión de los ARNm de las isoformas de la PDE4 en varias regiones de cerebro, incluidos algunos órganos circumventriculares. En el cerebro de estos animales encontramos que los niveles del ARNm de la COX-2 estaban aumentados considerablemente en los vasos y las leptomeninges a las 2 horas de la inyección de LPS, tal y como era de esperar según lo descrito (Cao et al., 1997). La variante de *splicing* PDE4B2 mostró un incremento de su expresión en plexos coroideos y en otros órganos circumventriculares, aunque en estos últimos no era estadísticamente significativo. En cambio las otras isoformas, PDE4B1, PDE4B3 y PDE4B4 no mostraron ningún tipo de alteración en ninguna de las regiones analizadas. Otros autores han observado un aumento regulado de varios ARNm relacionados con las respuestas inflamatorias (CD14, TNF- α , COX-2, IKappaB- α , IL-1 β) en áreas como leptomeninges, plexos coroideos y otros órganos circumventriculares (área postrema, eminencia media, órgano vasculoso de la lámina terminal) tras la administración periférica de LPS. En estas áreas el aumento observado en citocinas proinflamatorias puede ser consecuencia de la disminución de los niveles de AMPc debido a su vez al aumento de la expresión de la PDE4B2 tras la administración de LPS.

Con este trabajo pudimos concluir que el incremento de la expresión del ARNm de la PDE4B2 observado en los plexos coroideos y en otros órganos circumventriculares después de la administración de LPS puede tener interés en la respuesta inflamatoria ya que, como se ha propuesto recientemente, los plexos coroideos parecen comportarse como un sensor de señales inmunológicas del cerebro (Marques et al., 2007) y estar involucrado en la vigilancia inmune del SNC (Engelhardt et al., 2001). No obstante experimentos adicionales que muestren en qué tipo de células se produce este aumento junto con la generación de inhibidores específicos para las diferentes isoformas de la PDE4B permitirán conocer más a fondo la implicación de esta variante de *splicing* en el proceso inflamatorio.

La EAE es un modelo animal de esclerosis múltiple, una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en jóvenes adultos (entre 20 y 40 años) y que afecta especialmente a mujeres (3 mujeres afectadas por cada dos hombres). Los signos clínicos, de intensidad variable, pueden abarcar desde un hormigueo en las extremidades hasta parálisis, desde visión borrosa a ceguera, además de fatiga, dolor y alteraciones cognitivas. A nivel histopatológico se caracteriza por la presencia de

áreas desmielinizadas (debido a pérdida de oligodendrocitos), con daño axonal y remielinización relativos, gliosis e inflamación, características por las que se ha definido como una enfermedad desmielinizante con un componente inflamatorio importante. Las características patológicas de la EAE son similares a las observadas en humanos, incluyendo rotura de la barrera hematoencefálica, infiltración de células inmunes en el SNC, inflamación y desmielinización (Floris et al., 2004; Pomeroy et al., 2005).

Como se ha comentado en la introducción, no existe un único y exclusivo modelo de esta enfermedad, pero todos ellos tienen la característica común de desarrollar una respuesta inmune contra la mielina, o alguno de sus componentes, con la entrada de linfocitos Th1 (CD4+) a través de la barrera hematoencefálica, que una vez reconocen su antígeno, inician un complejo proceso inflamatorio en el que se reclutan células inflamatorias no específicas y se producen citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno, complemento, células B y anticuerpos.

La PDE4 se expresa predominantemente en células proinflamatorias e inmunes, como eosinófilos, monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Teixeira et al., 1997). De hecho, los linfocitos T humanos expresan predominantemente las familias PDE3, PDE4 y PDE7 (Giembycz et al., 1996), pero parece ser que únicamente disminuyen su producción de TNF- α al tratarlas con inhibidores de PDE4 (Manning et al., 1999). Por este motivo estudiamos en nuestro modelo EAE la expresión de los ARNm de los cuatro isoenzimas de la PDE4 además de los de las cuatro variantes de *splicing* de la PDE4B.

De las cuatro isoenzimas de la PDE4 únicamente se encontraron cambios en la expresión del ARNm de la PDE4B, particularmente de su isoforma PDE4B2. Esta variante de *splicing* aumentó su expresión siguiendo un patrón asimétrico en forma de parches en la médula espinal y en zonas caudales del cerebro en las ratas a las que se les había inducido la EAE. Las diferencias entre las ratas sacrificadas a los 10 y 13 días de la inducción de la enfermedad se encontraron en la distribución y alcance de este patrón de expresión asimétrico. Es decir, en las ratas de 13 días la regulación a alza del ARNm de la PDE4B2 llegaba hasta niveles más rostrales y estaba distribuida por todo el parénquima cerebral, en cambio, en las ratas sacrificadas a los 10 días esta inducción se extendía hasta niveles menos rostrales y estaba concentrada en zonas marginales y periventriculares. Este aumento en su expresión se localizó en linfocitos T y macrófagos/microglía. Este estudio nos permite concluir que la isoforma PDE4B2 parece ser la única de las isoformas de la familia de las PDE4 implicada en el desarrollo de la enfermedad aumentando su expresión en linfocitos T y en macrófagos/microglía progresando de niveles caudales hacia niveles rostrales, y de los márgenes del tejido, es decir de áreas periventriculares y de las leptomeninges hacia el interior del parénquima según el patrón característico de este modelo.

Los isoenzimas de las PDE4 se consideran posibles dianas para fármacos antiinflamatorios no sólo por su amplia distribución anatómica sino también por su participación en el control de las respuestas celulares en modelos de enfermedades inflamatorias, incluyendo la EAE (Genain et al., 1995; Sommer et al., 1995). Jin y

colaboradores (Jin and Conti, 2002; Ariga et al., 2004; Jin et al., 2005a) utilizando ratones mutantes nulos tanto para la PDE4B como para la PDE4D, han demostrado que la estimulación por LPS de células inflamatorias de ratón, induce la acumulación del ARNm de la PDE4B así como un aumento de la actividad enzimática de la fosfodiesterasa. La secreción del TNF- α estimulada por LPS estaba disminuida en los ratones nulos de la PDE4B, pero no en los de la PDE4D. Lo que indica que la inducción de la expresión de la PDE4B es esencial para la respuesta del TNF- α al LPS. Como no se observan cambios en los niveles del AMPc en las células de los ratones nulos de la PDE4B, una parte minoritaria del AMPc regulada por la PDE4B es la que estaría involucrada en la señalización del receptor *Toll-like*. La inducción en la expresión de ARNm de la PDE4B2 tanto en las células T y microglía en el modelo EAE como en las células de los plexos coroideos y de otros órganos circumventriculares en el modelo inflamatorio del LPS apoyan los resultados reportados por el grupo de Conti y que se han discutido anteriormente. En su caso, la PDE4B2 es la única isoforma inducible por LPS, de la misma manera que sucede en nuestro modelo de EAE. La activación tanto de la microglía residente como de los macrófagos perivasculares, así como el reclutamiento de linfocitos T que tiene lugar en el sistema nervioso son los tipos de cambios que se observan más frecuentemente en las ratas con EAE (Sobel et al., 1984; Polman et al., 1986). Todo esto nos lleva a sugerir que la PDE4B2 parece estar directamente implicada en la enfermedad de la EAE y que su función en estas células donde su expresión está aumentada tiene que ser muy especializada y precisa.

La inducción observada del ARNm de la PDE4B2 en los infiltrados de linfocitos y en los macrófagos/microglía (seguramente activada) en el cerebro de las ratas con EAE en el día 13, parece ser que coincide con el pico de expresión descrito para algunas citocinas, como TNF- α , IFN- γ , LT, IL- β and TGF- β (Issazadeh et al., 1995a; Issazadeh et al., 1995b; Martinez et al., 1999a). Todo esto sugiere que la inducción de esta isoforma en los infiltrados celulares puede ser necesaria para la producción de citocinas.

La estimulación de los linfocitos T a través de los receptores de antígeno en sus membranas da lugar a un aumento en los niveles intracelulares del AMPc debido probablemente a la activación de una adenilato ciclasa por una proteína G acoplada al receptor de antígeno (Kammer et al., 1988). Niveles elevados de AMPc inhiben muchas de las respuestas biológicas de los linfocitos T (Li et al., 1999), por lo que la señalización del antígeno mediada por el receptor tiene que estar coordinada necesariamente con la activación de las PDE. (Giembycz et al., 1996). Arp y colaboradores han demostrado que la síntesis *de novo* de la PDE4B2, induce la activación de linfocitos T e incrementa la producción de IL-2 (Arp et al., 2003). Además estos autores proponen una compartimentalización de la PDE4B2, después de la estimulación de los linfocitos T que se localizaría en los llamados *lipid rafts* cercanos a las sinapsis inmunológicas que es donde se genera el AMPc al principio de la estimulación de estas células T. Por lo que no sería de descartar que la inducción de la PDE4B2 observada en nuestro estudio fuera en compartimentos determinados de las células, ayudando así mantener niveles bajos de AMPc en estos "microcompartimentos" permitiendo la respuesta de las citocinas. Trabajos

preliminares de nuestro laboratorio con animales tratados con rolipram según Sanchez y colaboradores (Sanchez et al., 2005) nos han permitido ver un descenso en los infiltrados celulares con la consiguiente desaparición del ARNm de la PDE4B2 descrita antes y que es la característica principal de este modelo. Por este motivo, sería de gran interés la realización de estudios futuros para determinar si la expresión aumentada de la PDE4B2 se localiza en alguna subpoblación específica de los linfocitos T infiltrados.

Como conclusión del estudio de la regulación de la expresión de las PDE4 y de las isoformas de la PDE4B en dos modelos animales con componente inflamatorio, se puede afirmar que la PDE4B2 es la única isoforma que se regula en estos procesos inflamatorios, lo que sugiere una posible implicación en la activación de estas células o en la progresión de su respuesta inflamatoria en el caso de la EAE, o bien de una probable implicación en la comunicación entre sistema inmune periférico y cerebro para el modelo del LPS. El que sea exclusivamente una sola isoforma de la PDE4B, la PDE4B2, la que se altere a consecuencia de la neuroinflamación tiene unas implicaciones tanto fisiológicas como farmacológicas muy importantes, ya que por un lado confieren funciones exclusivas a cada PDE, es decir, funciones que no son redundantes y por otro lado, proporciona soporte experimental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas encaminadas al uso de inhibidores de las PDE con selectividad para cada una de sus isoformas.

2. PDE7 (PDE7B)

2.1. Localización anatómica de la PDE7B

El estudio de la expresión del ARNm en el cerebro de la rata de uno de los dos isoenzimas de la familia PDE7, la PDE7B, mostró una distribución bien definida en diferentes regiones en el cerebro y una colocalización diferencial con diferentes neurotransmisores.

Los niveles más elevados de expresión del mensajero de la PDE7B los encontramos en el tubérculo olfativo, preferentemente en células GABAérgicas y apenas en células colinérgicas, y en las islas de Calleja. La expresión en éstas, podría estar relacionada con la señalización de los receptores dopaminérgicos D3 (GPCR Gi/o), y contribuir de esta manera en la comunicación de la información sensorial hacia otras regiones del SNC (Millhouse, 1987).

Una expresión elevada de este ARNm la encontramos en el núcleo estriado, localizada mayoritariamente en subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas, que presentan bajos niveles de los ARNm de las GAD_{65/67}. En estas interneuronas que proyectan a la sustancia negra o al globus pallidus, la PDE7B podría estar participando en la liberación del GABA. También se ha descrito una activación de la variante PDE7B1 en cultivos estriatales tras la activación de los receptores D1 (GPCR Gs) (Sasaki et al., 2004), sugiriendo su implicación en el sistema de señalización dopaminérgico. La importancia de los ganglios basales en el movimiento y en enfermedades motoras como Parkinson o Huntington, justificaría la necesidad de estudiar más profundamente

este isoenzima. Entre las distintas PDE del AMPc que se expresan en este núcleo (PDE1B, PDE2, PDE4B, PDE10A y PDE7), la PDE7 es la que tiene mayor afinidad por el AMPc de las PDE específicas para este nucleótido, sugiriendo que ésta se encargaría de regular los niveles de AMPc en momentos de baja concentración de nucleótido. El hecho de disponer de diferentes PDE (con distintas constantes de afinidad) en una misma región, y por lo tanto posiblemente en una misma célula, sugiere la capacidad de la célula a responder a cambios diversos de las concentraciones del nucleótido, con el objetivo de intentar mantener unos niveles basales.

Este isoenzima también se expresa en áreas límbicas sugiriendo su implicación en procesos de memoria, aprendizaje y plasticidad sináptica. En el giro dentado encontramos que casi la totalidad de las células que expresaron la PDE7B eran glutamatérgicas, y alguna GABAérgica. También eran glutamatérgicas la mayoría de las células que expresaban el ARNm de la PDE7B en tálamo, no pudiendo excluir la posible implicación de este isoenzima en las vías glutamatérgicas tálamo-corticales y tálamo-estriales. La expresión de este isoenzima específico del AMPc en las células de Purkinje, donde la mayoría de las PDE expresadas son PDE que hidrolizan el GMPc, indica la coexistencia de los dos sistemas de señalización, el de GMPc y el de AMPc, en la misma célula, y por lo tanto la posibilidad de una comunicación cruzada (*crossstalk*) entre ambos sistemas, a través de la regulación por parte de los nucleótidos cíclicos sobre la actividad de alguna PDE que hidrolice el otro nucleótido, como se ha postulado en el sistema de contracción muscular (Abdel-Latif, 2001).

La expresión de la PDE7B se ha encontrado en diversos órganos circumventriculares como el órgano subfornical, relacionado con la ingesta de líquido; el área postrema, centro controlador de la émesis; o en la eminencia media, donde se realiza la transducción neuroendocrina, es decir la traducción de la actividad eléctrica del SNC en liberación de factores por parte de la pituitaria anterior. Se ha comentado en el apartado anterior la posible implicación de los órganos circumventriculares en la comunicación de las señales inmunológicas entre sistema nervioso y sistema inmune en situaciones de inflamación periférica (Marques et al., 2007) además de ser lugares de entrada de células del sistema inmune hacia el SNC y el líquido cefalorraquídeo (Schulz and Engelhardt, 2005). La expresión del ARNm de la PDE7B en estas regiones, que presentan una expresión constitutiva de receptores de citocinas y de patógenos (Roth et al., 2004) necesarios para actuar como sensores de la situación inmune que se presenta en periferia, sugiere su posible participación en el mantenimiento de esta expresión constitutiva.

La comparación entre la expresión del ARNm de la PDE7B con el de la PDE7A (Miró et al., 2001) mostró coincidencia en algunas estructuras cerebrales, como la corteza o el giro dentado, indicando que posiblemente estén involucradas en las mismas funciones, o en el caso de estar en la misma célula controlando el AMPc a diferente nivel. También encontramos regiones en las que se expresaba el ARNm de la PDE7B y no el de la PDE7A, como por ejemplo en el núcleo accumbens, en algún núcleo talámico o en el núcleo dorsal motor del vago, y regiones como la sustancia negra,

núcleos del tronco del encéfalo o los plexos coroideos que sólo expresaban la PDE7A, sugiriendo la implicación de ambos isoenzimas en funciones distintas.

2.2. Expresión de los isoenzimas de la PDE7 en la EAE

Los efectos secundarios asociados a inhibidores de la PDE4 estimuló el interés en la búsqueda de inhibidores de otras PDE que pudiesen también estar implicadas en la regulación de la respuesta inmune (Giembycz, 2000).

La PDE7 es otro de los enzimas específicos del AMPc que se encuentran expresados en células del sistema inmune como las células T o los monocitos/macrófagos (Giembycz et al., 1996; Smith et al., 2003). De hecho, el ARNm de la isoforma PDE7A1 se expresa en tejido linfoide humano (bazo, nódulos linfáticos, timo y leucocitos periféricos) y su proteína, a pesar de ser prácticamente indetectable en linfocitos periféricos aislados, se ha visto que es requerida para la activación de células T dependiente de CD3/CD28 (Li et al., 1999). La actividad del resto de las PDE del AMPc que se expresan en estos linfocitos (PDE4 y PDE3) permanece inalterada. El tratamiento de linfocitos T humanos con el T-2585, inhibidor de la PDE3, de la PDE4 y de la PDE7, inhibe la respuesta inmune actuando principalmente sobre la PDE7 (Nakata et al., 2002).

Esta implicación de la PDE7, especialmente el isoenzima PDE7A, en la regulación de la respuesta inmune planteó la pregunta de si en nuestro modelo de la EAE, mediado por células T, se encontraba alterada la expresión de su ARNm. A la vez se estudió la posible implicación de la PDE7B en este modelo, puesto que, a pesar de no encontrarse expresada en leucocitos periféricos de humano, ni en bazo de humano y ratón (Gardner et al., 2000; Hetman et al., 2000b), sí que se expresaba en bazo de rata (Sasaki et al., 2002).

En el análisis de la expresión de los ARNm de la PDE7A y de la PDE7B no se encontraron cambios entre los animales control y los animales con EAE. Según la bibliografía encontrada en ratón y humano, se esperaría encontrar un patrón similar al de la PDE4B2, ya que la PDE7A se expresa en algunos linfocitos T y macrófagos/microglía. La falta de regulación de la expresión que para esta familia se encontró apoya el resultado obtenido con el ratón mutante nulo para la PDE7A, que al presentar linfocitos T funcionales, sugiere que este isoenzima no es necesario para la activación de estas células. En un estudio realizado con linfocitos T humanos, se observó que el bloqueo de la actividad de la adenilato ciclasa, de la PDE1 y de la PDE4 (utilizando inhibidores selectivos), pero no la de la PDE7 (mediante oligonucleótidos antisentido), suprimía la producción de la IL-13, interleucina involucrada en la activación de linfocitos B (Kanda and Watanabe, 2001). Algunos autores sugieren que esta disparidad de resultados sobre a la implicación de la PDE7 en la activación de células T puede deberse a diferencias entre especies o bien a problemas metodológicos (Stein, 2001), como por ejemplo el uso de oligonucleótidos antisentido para la PDE7.

En nuestro modelo ninguno de los dos isoenzimas de la PDE7 estaban alterados en el parénquima cerebral, por lo se podría concluir que estos dos isoenzimas no parecen estar participando en este tipo de respuesta inmune.

3. PDE2, PDE5, PDE9

3.1. Expresión de los ARNm de la PDE2, la PDE5 y la PDE9 en cerebros humanos control

Existen pocos datos sobre la distribución de la superfamilia de las PDE en cerebro humano. En nuestro laboratorio se ha estudiado la expresión de los cuatro isoenzimas de la PDE4 (Pérez-Torres et al., 2000), de los dos de la PDE7 y de la PDE8 (Pérez-Torres et al., 2003). En el trabajo nº 2 de esta tesis mediante hibridación *in situ* con ribosondas radiactivas se estudió la expresión de los ARNm de la PDE2 y la PDE9 en el cerebro humano. En cambio no se detectó señal de hibridación para el ARNm de la PDE5. La distribución de los ARNm de la PDE2 y la PDE9 presentó algunas diferencias con respecto a la encontrada en el cerebro de la rata.

En humano y rata el ARNm de la PDE2 presenta niveles elevados de hibridación en la formación hipocampal, corteza insular, caudado, putamen y claustrum y en cambio no hibrida en el globus pallidus. Un dato a destacar es la expresión en capas a nivel de corteza insular y visual y la ausencia de éstas en corteza entorrinal. Sin embargo en el cerebelo de la rata hay expresión del mensajero en células granulares cerebelares y en las de Purkinje (van Staveren et al., 2003), pero no en el cerebelo humano.

La imposibilidad de detectar el ARNm de la PDE5 en el cerebro humano podría atribuirse a niveles de expresión muy bajos. Por otro lado podemos descartar los posibles problemas de hibridación por tratarse de una ribosonda del mensajero de la PDE5 de rata, ya que la similaridad de secuencia para este gen entre estas dos especies es elevada. El tratamiento con sildenafil (inhibidor específico de la PDE5) en rebanadas de cerebro de ratas viejas no produce cambios en la síntesis del GMPc por estimulación con NO, sin embargo, sí se producen cambios al tratar con inhibidores de la PDE2. Además en este modelo se observó una disminución significativa de los niveles de expresión del ARNm de la PDE5, y no de la PDE2 o la PDE9 en el cerebro de las ratas viejas (Domek-Lopacinska et al., 2005a; Domek-Lopacinska et al., 2005b).

Encontramos altos niveles de hibridación del ARNm de la PDE9 en el cerebelo, concretamente en las células granulares, en las de Purkinje y en el núcleo dentado y moderados en algunas regiones de la formación hipocampal, en el claustrum y en los núcleos caudado y putamen además de la expresión en las capas II-VI de la corteza visula. Este patrón coincide en general con el encontrado en rata, excepto en el globus pallidus, donde se expresa la PDE9 sólo en rata (Andreeva et al., 2001; van Staveren et al., 2003).

El conocimiento de la expresión en cerebro de estos isoenzimas supone un paso más en el conocimiento de la vía de señalización del GMPc, ya que a pesar de que la PDE2 es una PDE dual, capaz de hidrolizar el AMPc y el GMPc, tiene mayor afinidad por el GMPc, y tanto la PDE5 como la PDE9 son PDE específicas del GMPc. El hecho

de que la PDE9 sea la PDE con mayor afinidad por el GMPc (K_m 0.07-0.17 μ M) sugiere que las células en las que se expresa serán capaces responder o hidrolizar GMPc a bajas concentraciones de este nucleótido cíclico, mientras que las células que expresen la PDE2, cuya K_m es de 15-30 μ M, necesitarán concentraciones más elevadas del nucleótido cíclico para poder hidrolizarlo.

Varios trabajos relacionan la vía del GMPc con procesos de aprendizaje y memoria en roedores. Por ejemplo, se ha observado que el tratamiento *in vitro* de un inhibidor de la PDE2 (BAY 60-7550) aumenta la plasticidad neuronal en hipocampo, y que su administración *in vivo* mejora las funciones de memoria (Boess et al., 2004). También se ha comprobado que tras la administración de inhibidores de la PDE5 se mejora la memoria de reconocimiento de objetos y el aprendizaje pasivo, pero no la memoria espacial, por lo tanto, parece ser que el aumento del GMPc puede ser importante en estados tempranos de la formación de la memoria (Prickaerts et al., 2004b). Todo esto, junto con la presencia de la PDE2 y la PDE9 en la formación hipocampal sugiere que estas enzimas pueden participar en procesos de aprendizaje y memoria en humanos.

La elevada y exclusiva expresión de la PDE9 en células de Purkinje del cerebelo humano indica que esta isoenzima puede formar parte del sistema de regulación de los niveles de GMPc en estas células, donde se encuentra también el ARNm de la subunidad β 1 de la guanilato ciclasa (Pifarre et al., 2007). Por lo tanto la PDE9 podría estar implicada en la transmisión de las señales eferentes de la corteza cerebelar hacia los núcleos del cerebelo.

La expresión de estas dos enzimas, especialmente la PDE2, en los núcleos caudado y putamen, en claustrum o en diferentes regiones corticales sugiere una posible implicación en la regulación del GMPc en el movimiento o en la integración de señales o estímulos externos al organismo.

3.2. Expresión de la PDE2 y la PDE9 en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer

En la enfermedad de Alzheimer se han observado alteraciones en los distintos componentes de las vías de transducción de señales tanto, del AMPc como del GMPc. Así pues se han descrito cambios en los sistemas colinérgico, glutamatérgico y serotoninérgico (Cowburn et al., 1996), cambios en la actividad o expresión de la adenilato ciclasa (Ohm et al., 1997; Garcia-Jimenez et al., 1999), en los niveles de AMPc (Martinez et al., 1999b), en la expresión de la PKA (Bonkale et al., 1999) y en la expresión de algunas fosfodiesterasas del AMPc (Pérez-Torres and Mengod, 2002; Pérez-Torres et al., 2003). Además se han demostrado alteraciones en la vía de transmisión de señales NO/GMPc en la neurotransmisión colinérgica (Cummings et al., 2000; Cummings et al., 1998; Blusztajn and Berse, 2000), alteración en la expresión de NOS (1, 2 y 3) (Simic et al., 2000; Luth et al., 2002), disminución de la actividad de la guanilato ciclasa o de su expresión en astrocitos localizados en las placas amiloides (Bonkale et al., 1995; Baltrons et al., 2004), entre otras.

Las deficiencias en alguno de los componentes de la vía de señalización del NO/GMPc que se acaban de comentar, además del déficit de memoria y aprendizaje de enfermos de Alzheimer atribuido a alteraciones histopatológicas en el área hipocampal y cortezas asociativas junto con nuestro estudio de la expresión de la PDE2 y la PDE9 en estas áreas nos indujo a realizar un estudio piloto sobre la posible regulación de la expresión de los ARNm de estas PDE, implicadas en el metabolismo del GMPc, en cerebros de Alzheimer.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de ninguno de los dos enzimas en ninguna de las regiones estudiadas entre cerebros control y Alzheimer. La expresión del ARNm de la PDE9 mostró una tendencia a disminuir, especialmente en la corteza perirrinal de los cerebros de pacientes con Alzheimer, si bien ésta era tan pequeña (del orden del 20%) que no justifica las consecuencias fisiológicas de esta enfermedad.

El componente inflamatorio que presenta esta enfermedad puede estar también relacionado con la vía de transmisión del NO/GMPc. Se cree que un exceso de NO, y por lo tanto el aumento de los niveles de especies reactivas de nitrógeno, contribuyen a la muerte celular por excitotoxicidad (Gross and Wolin, 1995; Szabo, 1996). A pesar de esto, el NO también puede ejercer acciones neuroprotectoras mediante el GMPc (Estevez et al., 1998; Kim et al., 1999; Ciani et al., 2002). Niveles elevados de GMPc desencadenan señales antiapoptóticas en neuronas y astrocitos (Kim et al., 1999; Takuma et al., 2001) y producen señales inhibitorias en macrófagos y células gliales (Kiemer and Vollmar, 1998; Paris et al., 1999; Kiemer et al., 2000). El componente celular inflamatorio en la enfermedad de Alzheimer está formado por microglía (activada para algunos autores (Weiner and Frenkel, 2006) o envejecida/senescente para otros (Streit, 2004)) y por astrocitos reactivos que se localizan en las placas de β -amiloide. Experimentos realizados *in vitro* con cultivos de microglía murina han demostrado que el mecanismo de activación de estas células por el péptido β -amiloide es dependiente de fosfodiesterasas del GMPc (Paris et al., 1999). También se ha visto que en los astrocitos reactivos situados en el centro de las placas de β -amiloide disminuye la expresión de la subunidad β 1 de la guanilato ciclasa soluble y por lo tanto la capacidad de generar GMPc, confirmando al astrocito un estado permisivo para desarrollar respuestas inflamatorias (Baltrons et al., 2004). La importancia de los niveles de GMPc en la activación de células de respuesta inmune innata (astrocitos y microglía) en las proximidades de la placa senil, nos hizo pensar en el posible aumento regulado de alguna de las PDE que degradan este nucleótido para mantener bajos estos niveles y así contribuir en el proceso neuroinflamatorio que cursa en la enfermedad de Alzheimer. En ningún cerebro de Alzheimer observamos este aumento, sugiriendo que estos enzimas no parecen estar implicados en el mantenimiento de los niveles de GMPc necesarios para que se dé activación de células gliales y macrófagos. Estos resultados no contradicen que la falta de actividad de la guanilato ciclasa soluble en cerebros de Alzheimer (Bonkale et al., 1995), se deba a una disminución de activadores o efectores endógenos (Schmidt et al., 2001; Stasch et al., 2001) o a un aumento de un inhibidor endógeno de este enzima (Mo et al., 2004).

