



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento

Departamento de Farmacología y Terapéutica

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

***REGULACIÓN POR EL
GLUCOSAMINOGLICANO CONDROITÍN SULFATO
DE LA NEUROTRANSMISIÓN SINÁPTICA EN
CULTIVOS DE NEURONAS DE HIPOACMAPO***

Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor
presentada por

Marcos Maroto Pérez

Director:
Antonio García García

Madrid, mayo de 2014

Dedicatoria

Agradecimientos

ÍNDICE

1.- <u>MARCO Y ORGANIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL</u>	1
2.-<u>INTRODUCCIÓN</u>	3
2.1 <i>El descubrimiento de la matriz extracelular</i>	4
2.2 <i>La matriz extracelular del sistema nervioso central: la MECn</i>	7
2.2.1 <u>Los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular neural</u>	9
2.2.2 <u>Los proteoglicanos de la matriz extracelular neural</u>	13
2.2.3 <u>Papel de los proteoglicanos de condroitín sulfato en el sistema nervioso</u>	15
2.2.4 <u>La cicatriz glial</u>	18
2.2.5 <u>La red perineuronal</u>	20
2.3 <i>La matriz extracelular en condiciones fisiopatológicas</i>	24
2.3.1 <u>La matriz extracelular como diana terapéutica</u>	25
2.4 <i>La matriz extracelular neural y plasticidad sináptica</i>	28
2.5 <i>Receptores para condroitín sulfato y proteoglicanos de condroitín sulfato</i>	30
2.6 <i>El hipocampo</i>	31
2.6.1 <u>Localización y nomenclatura del hipocampo en mamíferos</u>	31
2.6.2 <u>Estructura y organización del hipocampo y el giro dentado</u>	34
2.6.3 <u>Tipos celulares en la formación hipocampal</u>	36
2.7 <i>Receptores de glutamato</i>	39
2.7.1 <u>Tipos de receptores de glutamato</u>	40
2.7.2 <u>Estructura molecular de los receptores de glutamato</u>	42
2.7.3 <u>Receptor AMPA</u>	43
2.7.4 <u>Receptor Kainato</u>	44
2.7.5 <u>Receptor NMDA</u>	45
2.7.6 <u>Receptores metabotrópicos</u>	46
3.- <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	48
4.-<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	51
4.1 <i>Cultivo de neuronas de hipocampo de embrión de rata</i>	52

4.2 <i>La técnica de patch-clamp</i>	55
4.2.1 <u>Registros electrofisiológicos</u>	58
4.3 <i>Técnicas de fluorescencia</i>	60
4.3.1 <u>Inmunocitoquímica del cocultivo de neuronas/glia de hipocampo</u>	60
4.3.2 <u>Medida de la concentración citosólica de calcio: sondas fluo 4 y fura 2</u>	61
4.3.3 <u>Medida de la concentración citosólica de calcio en poblaciones celulares</u>	62
4.3.4 <u>Medida de la concentración citosólica de calcio en célula única</u>	63
4.3.5 <u>Medida de la concentración de calcio en el retículo endoplásmico</u>	63
4.5 <i>Disoluciones</i>	64
4.5.1 <u>Disoluciones extracelulares empleadas</u>	64
4.5.2 <u>Disoluciones intracelulares empleadas</u>	64
4.6 <i>Compuestos químicos</i>	65
4.7 <i>Análisis estadístico y cálculos matemáticos</i>	66
5.- <u>RESULTADOS</u>	68
6.- <u>DISCUSIÓN</u>	107
7.- <u>CONCLUSIONES</u>	121
8.- <u>AYUDAS DE INVESTIGACIÓN</u>	124
9.- <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	126
10.- <u>APÉNDICE: ARTÍCULOS</u>	161

MARCO DE ESTA TESIS DOCTORAL

1.- MARCO Y JUSTIFICACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL

El trabajo de investigación cuyos resultados componen la presente Tesis Doctoral han sido realizados en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del medicamento (ITH); la necesidad de conocer los mecanismos que disparan la cascada neurodegenerativa en la células del sistema nervioso es imperiosa. Actualmente, ningún tratamiento es capaz de frenar el deterioro de las funciones cognitivas o la degeneración celular más allá de unos cuantos meses, según la patología neurodegenerativa en cuestión y su tratamiento farmacológico. Por ello, entre las líneas de investigación del ITH se encuentran el estudio de la dinámica de circulación del Ca^{2+} citosólico, el estudio de los procesos excitotóxicos que subyacen a la comunicación intercelular en el sistema nervioso y una importante línea centrada en los mecanismos de muerte neuronal y la búsqueda de tratamientos con fármacos neuroprotectores. Para ello se dispone en el ITH de un grupo de química médica capaz de sintetizar principios activos con potencial neuroprotector frente a estímulos tóxicos de diversa naturaleza (que simulan las condiciones fisiopatológicas de distintas enfermedades).

Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de una cátedra de patrocinio de los laboratorios *Bioibérica S.A.* y la *Universidad Autónoma de Madrid* sobre inflamación crónica y citoprotección (CABICYC), que es otra línea de investigación prioritaria en el ITH. Una de las moléculas protagonistas de la cartera de productos de los laboratorios Bioibérica es el Condroitín Sulfato. Los laboratorios Bioibérica son además el primer productor de heparinas y heparán sulfato del mundo y poseen un método de purificación del condroitín sulfato con los más altos estándares de calidad y pureza.

Como en estudios anteriores del grupo (trabajos de la Dra. Cañas) se había explorado el papel de esta molécula como antioxidante y antineuroinflamatoria tanto en cultivos de la línea celular SH-SY5Y (Cañas y col. 2007) como en rodajas de hipocampo (Martín-de-Saavedra y col. 2011) nos propusimos continuar con esta línea de investigación en Condroitín Sulfato pero explorando, esta vez, los fenómenos moleculares que subyacen al proceso de neurotransmisión. Tomando como modelo biológico el cocultivo de neuronas y glía de hipocampo de embrión de rata hemos realizado un estudio electrofisiológico y de señales de calcio citosólicas y reticulares con Condroitín Sulfato.

Además, dado que hay una enorme cantidad de bibliografía acerca de los distintos tipos de CS y de su diversidad de funciones fisiológicas, nosotros también quisimos comprobar el efecto del tipo de sulfatación de la molécula y de su tamaño sobre los efectos descritos.

INTRODUCCIÓN

2.1. Descubrimiento de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) ha sido, hasta hace relativamente poco, patrimonio exclusivo de los tejidos conectivos, donde el componente celular era proporcionalmente muy inferior al ocupado por la MEC. El conjunto de familias moleculares que forman la matriz como el colágeno o la elastina, los glucosaminoglicanos (GAG) y proteoglicanos (PG) y otras glicoproteínas son componentes habituales de los diferentes tipos de tejidos conectivos, tejidos compuestos por células y una matriz extracelular abundante. Así, las principales propiedades físico-químicas de estos tejidos conectivos son atribuidas a su matriz y ésta, a su vez, debe sus características a la cantidad y proporción de estos tipos de moléculas, responsabilidad que cae sobre las células que se embeben en ella, encargadas de sintetizarla. Sin embargo, otros tejidos como el epitelial y el nervioso se consideraban carentes de matriz extracelular. Las células, elemento principal de estos tejidos, estaban tan estrechamente unidas unas a otras que no existía apenas espacio intercelular y, por ende, matriz extracelular.

Cuando el célebre anatomopatólogo alemán, Rudolf Virchow, introdujo el concepto de la neuroglía para designar a aquellas células que servían como elemento de soporte del cerebro, se les atribuyó a éstas el papel que la matriz extracelular tenía en otros tejidos; una especie de pegamento para las neuronas (glía del griego *γλῖα* que significa unión o pegamento). El tejido nervioso era así diferente a otros tejidos que tenían algún tipo de sustancia intercelular cementante. Pero fue otro investigador alemán, H. Gierke, quien publicó un trabajo en el que indicaba que el armazón de soporte del cerebro no estaba formado solamente por las células gliales, sino que existía también una sustancia fundamental, que estimó en un 20-25% del volumen total (Gierke 1885). Sin embargo, con la llegada de los métodos de impregnación argéntica (método Golgi), la atención de la mayoría de los neurocientíficos, capitaneados por D. Santiago Ramón y Cajal, se desvió hacia la visualización de las neuronas y células gliales, dejando completamente olvidado el estudio de la sustancia fundamental.

En los años 60, el estudio del sistema nervioso estaba dominado por la microscopía electrónica de transmisión, la cual aportaba pruebas en contra de la existencia de una matriz extracelular en el sistema nervioso ya que el espacio intercelular que quedaba entre las membranas plasmáticas de las células gliales y nerviosas era tan ínfimo que si existía una matriz, ésta era despreciable. La controversia

era tal que en un simposio sobre el sistema nervioso (Según Rulka y cols., citado por (Bignami y col. 1993)) en 1962 se formaron dos bandos de opiniones contrapuestas; por un lado los biólogos celulares defendían que la matriz extracelular debía existir en el sistema nervioso del mismo modo que estaba presente en otros sistemas celulares y debido a la tinción PAS positiva obtenida por varios autores en el marcaje de estructuras cerebrales de vertebrados: tinción que reconoce la presencia de mucopolisacáridos y glicoproteínas (Leblond 1950; Bairati y col. 1953; Glegg y col. 1953). Así, estos autores sospechaban que la MEC en el cerebro debía estar compuesta de mucopolisacáridos como el condroitín sulfato, glicoproteínas y ácido hialurónico (Freedman 1953; Glegg y col. 1956). En el lado opuesto, los morfológicos rechazaban frontalmente la existencia de matriz extracelular en el cerebro apoyándose en fotografías de microscopía electrónica del sistema nervioso central en las que los elementos celulares se presentaban altamente compactados reduciendo el espacio extracelular al mínimo y postulaban que las células gliales eran las que ejercían esta función en los tejidos nerviosos. Hoy sabemos que las sustancias utilizadas para fijar el tejido y realizar las microfotografías no eran capaces de conservar la ultraestructura de los componentes de la matriz y el pequeño espacio intercelular observado en esas imágenes era meramente artefactual.

La existencia de la MEC en el sistema nervioso está, hoy día, más que demostrada y se sabe que representa entre el 17 y el 25 % del volumen total del tejido (Bruckner y col. 1996). Además es un componente dinámico ya que la actividad neuronal determina su composición y volumen (Lehmenkuhler y col. 1993; Sykova y col. 1993) y desempeña un papel crucial en la plasticidad sináptica estructural dependiente de actividad (Theodosis y col. 1999).

Hablando en términos generales, la MEC, se compone de glicoproteínas, GAG, PG, ácido hialurónico y otras proteínas como pueden ser: factores de crecimiento, moléculas de señalización, citocinas y enzimas (Borkenhagen y col. 1998). Es muy importante la presencia y función de proteínas fibrosas (como el colágeno, la laminina o la fibronectina) ya que al situarse entre los proteoglicanos y formar enlaces cruzados con ellos proveen a la MEC de propiedades elásticas y resistencia a la deformación. Esta composición le proporciona a la MEC una estructura reticulada y porosa que permite la difusión de oxígeno, nutrientes y productos del metabolismo celular así como moléculas de señalización desde y hacia las células del tejido. Las interacciones entre

las células y la MEC a través de proteínas de membrana llamadas integrinas contribuyen a procesos tan importantes como la proliferación, migración y diferenciación celular. Además es señal, imprescindible en muchos casos, para la supervivencia celular ya que una célula adherente sin un sustrato sobre el que crecer dispara un mecanismo de muerte celular llamado anoikis. Así pues, la MEC se postula como un elemento fundamental que va a condicionar el tipo de respuesta frente a un estímulo exógeno y la viabilidad del componente celular que allí se encuentra (Discher y col. 2005).

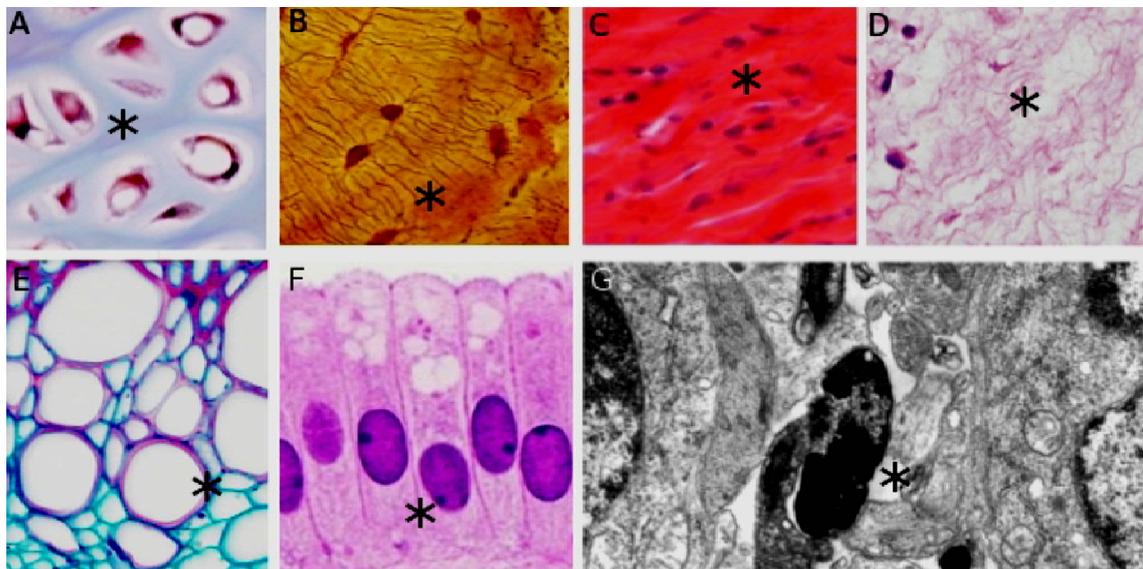


Figura 1: En esta imagen se presentan ejemplos de distintos tipos de matrices extracelulares (señalados por *). A: Cartilago hialino, B: Matriz ósea compacta, C: Tejido conectivo denso (tendón), D: Conectivo gelatinoso del cordón umbilical, E: Células epiteliales, G: Imagen de microscopía electrónica del tejido nervioso.

2.2. La matriz extracelular en el sistema nervioso central: matriz extracelular neural

El espacio existente entre las células en el sistema nervioso central (SNC), que representa alrededor del 20% del volumen total, se ocupa con diferentes moléculas que conforman la matriz extracelular neural (MECn). Estructuralmente, la MECn provee a las neuronas de puntos de anclaje que facilitan la organización de éstas en distintas regiones del SN dando lugar al correcto desarrollo citoarquitectónico del cerebro. Sin embargo, más allá de considerarla como un mero soporte o andamiaje, hoy en día se acepta que las moléculas que forman parte de esta estructura juegan un papel fundamental no solo mediando las respuesta celular frente a los estímulos externos sino también actuando como señales *per se*.

Aunque la presencia de la MEC en el SNC fue descrita por primera vez hace más de un siglo por los pioneros de la neuroanatomía celular, incluyendo a Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal, su verdadera función ha permanecido insondable. Son numerosas las moléculas presentes en la MEC que han sido identificadas, pero su función y relevancia fisiológica siguen sin estar bien caracterizadas ya que estas moléculas participan en un gran número de procesos celulares. Entre las funciones propuestas para las moléculas de la matriz extracelular en el cerebro, están las relacionadas con el desarrollo (migración celular, crecimiento y guía de axones y dendritas), formación y estabilización de sinapsis así como la de modular distintos tipos de plasticidad sináptica (Dityatev y col. 2003), mantenimiento de la homeostasia iónica, diferenciación celular, unión y protección frente a su degradación de distintos factores tróficos y moléculas de señalización y, no por ser lo más evidente, es menos importante, el anclaje y soporte de los elementos celulares del tejido y su organización estructural en el espacio tridimensional.

Este espacio extracelular, concretamente la matriz intersticial, tiene una composición única en el SN, ocupado fundamentalmente por proteoglicanos de condroitín sulfato (PGCS) siendo los más representados los de la familia de los lecticanos y hialuronano o ácido hialurónico (Margolis y col. 1975). Curiosamente, otras proteínas fibrilares como el colágeno, fibronectina o laminina, frecuentes en la MEC de otros tejidos, están poco representados en la MEC neural (Ruoslahti 1996). La importancia de la MEC en el SN es tal, que los ratones transgénicos con ablación de

genes que codifican para este tipo de estructuras producen letalidad *in útero* o pocos días después del nacimiento (Rauch 2004). De hecho sabemos que varias enfermedades neurológicas están causadas por una MECn anormal, por ejemplo la enfermedad de Batten o el síndrome de Fabry; ello desencadena, entre otros, alteraciones en la citoarquitectura del tejido y de la neurotransmisión sináptica (Weber y col. 1999; Arnaud y col. 2003; Szpak y col. 2007).

La MECn se fabrica en las células que se localizan en ella y está formada principalmente por (1) Glucosaminoglicanos, bien unidos a proteínas en forma de PG o bien de forma libre en el caso del hialuronano, (2) proteínas fibrosas (colágenos y elastinas) (Gama y col.) y glicoproteínas de adhesión (fibronectina, laminina y tenascina) (Gama y col.) y neuropéptidos, implicados en la regulación de la plasticidad neuronal (Pizzorusso y col. 2002) y la neuroprotección (Morawski y col. 2004).

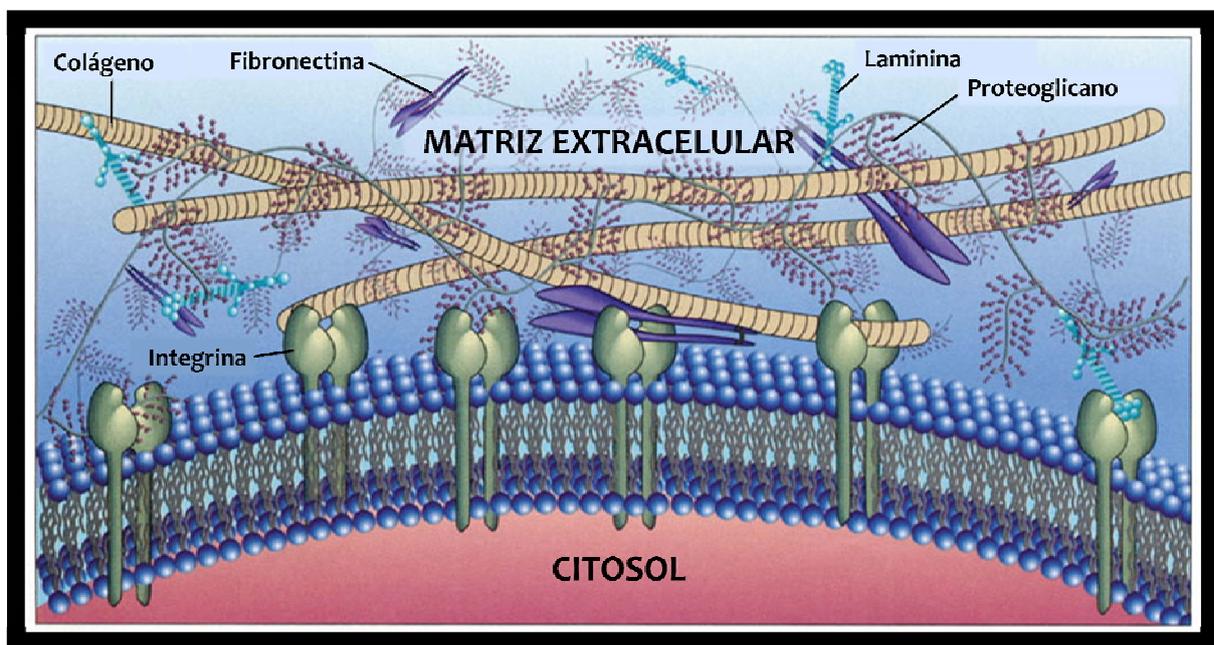


Figura 2. Modelo de organización estructural de la matriz extracelular. Se representan las proteínas fibrosas (en este caso fibras de colágeno), la glicoproteína de adhesión fibronectina y sus receptores en membrana: las integrinas. También aparecen representados los proteoglicanos con los GAGs unidos covalentemente a éstos. Esquema modificado de Karp (Karp 2010).

En los siguientes epígrafes repasaremos con algo más de profundidad algunos aspectos concretos relacionados con los GAG y los PG centrándonos en los aspectos fisiológicos relacionados con el condroitín sulfato (Isaacson) ; es decir, su composición química y su síntesis, el papel que desempeña en estructuras específicas de la matriz como la red perineuronal. También haremos alguna reseña al papel que juegan estas moléculas en procesos fisiológicos y patológicos y los receptores para CS y CSPG descritos hasta la fecha.

2.2.1. Los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular neural

Dentro de los polisacáridos presentes en la naturaleza podemos encontrar dos tipos:

- Los homopolisacáridos, compuestos por numerosas unidades del mismo monosacárido. Ejemplos típicos son el almidón o el glucógeno que están compuestos de numerosas glucosas unidas unas a otras por medio de distintos tipos de enlace.
- Los heteropolisacáridos, aquellos que están formados por más de un tipo de monosacárido. En este grupo a su vez, podemos encontrar las siguientes estructuras:
 - Los poli-disacáridos, que son repeticiones de dímeros en tándem y son conocidos como glicosaminoglicanos o mucopolisacáridos.
 - Los multimonoméricos, que están formados por múltiples tipos de monosacáridos. Éstos son los que se unen a las proteínas en las modificaciones post-traduccionales para dar lugar a las glicosilaciones proteicas que bien se pueden dar en el grupo hidroxilo de la serina o la treonina o en el amino terminal de la asparragina.

Los GAG pertenecen a los heteropolisacáridos del tipo polidisacáridos y son macromoléculas no ramificadas que se forman a partir de repeticiones en tándem (entre 20 y 200) de una unidad disacáridica (Fig 2). Cada una de ellas presenta un aminoazúcar *N*-acetilado, que bien puede ser la *N*-acetilgalactosamina (NAcGal) ó

N-acetilglucosamina (NAcGlc) a la que se une una molécula de un ácido urónico como el glucuronato ó iduronato. Cada tipo de GAG siempre presenta el mismo aminoazúcar, pero puede presentar cualquier clase de ácido urónico ya que el paso de glucurónico a idurónico lo lleva a cabo una epimerasa. Ambas unidades se unen mediante enlace glucosídico que dependiendo del grupo hidroxilo del carbono anomérico puede ser tipo α o β .

Un aspecto importante a considerar cuando hablamos de GAG es la susceptibilidad que presenta este tipo de macromoléculas a modificaciones del tipo sulfatación. Ambas unidades sacarídicas pueden presentar grupos sulfatos en varias posiciones. Por este hecho, los GAG son moléculas negativamente cargadas lo que provoca la atracción de cationes Na^+ con la subsiguiente captación de moléculas de agua que confieren alta viscosidad al medio donde están presentes. Además, en muchas ocasiones, este patrón de sulfatación es específico y selectivo de presentar una u otra actividad fisiológica (Nandini y col. 2006; Shipp y col. 2007).

Los GAG están principalmente ubicados en la superficie de las células o en los PG de la MEC. Junto con la viscosidad que brindan los GAG también aportan una compresibilidad baja al tejido la cual hace que estas moléculas sean ideales como líquido lubricante de las articulaciones. Así se entiende fácilmente que tanto el humor vítreo como el líquido sinovial, entre otros fluidos corporales, tengan una composición muy concreta en cuanto al tipo y la concentración de GAG. Al mismo tiempo, su rigidez brinda integridad estructural a las células y provee vías que facilitan la migración celular. Los GAG específicos de significancia fisiológica son el ácido hialurónico, el dermatán sulfato, el condroitín sulfato, la heparina o heparán sulfato y el queratán sulfato. A pesar de que cada GAG tiene un componente disacárido que predomina (Figura 2), existe una heterogeneidad entre los azúcares que forman parte de cualquier clase de GAG.

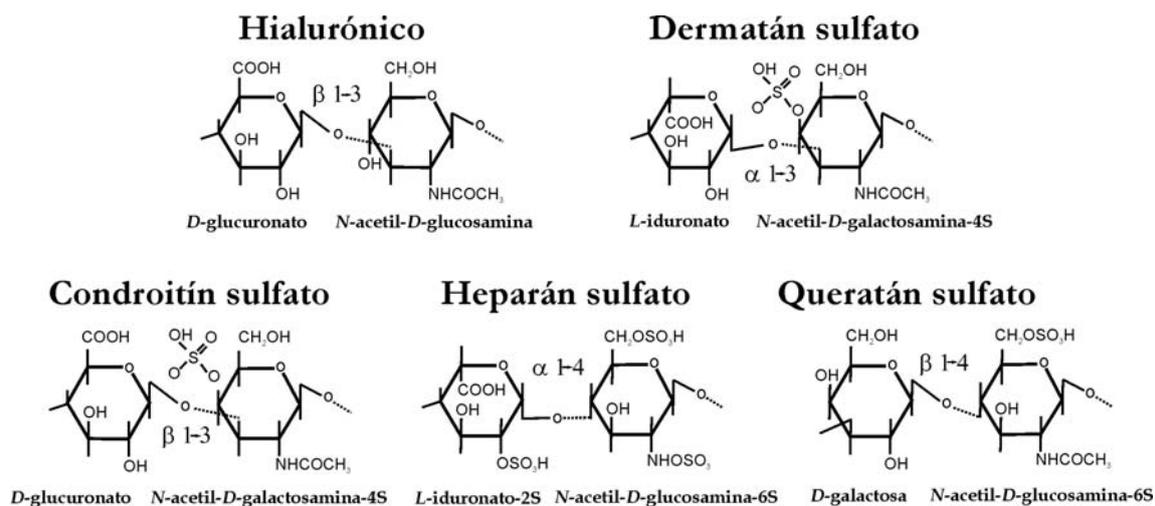


Figura 3: Estructura química de los disacáridos constituyentes de los distintos glucosaminoglicanos. En muchas ocasiones lo que distingue uno de otro es simplemente la posición de un grupo –OH (epímeros) o el tipo de enlace glicosídico

Tal y como se representa en la figura 3, la unidad básica que constituye el CS es la formada por ácido glucurónico (AGlc) y *N*-acetil galactosamina (NAcGal) unidos por un enlace β-glicosídico. Como ya hemos visto, en un mismo GAG, el AGlc puede encontrarse en forma de su epímero, el ácido idurónico (AI). Así, el GAG formado por NAcGal más AI recibe el nombre de dermatán sulfato o CS tipo B. El heparán sulfato consiste en repeticiones del disacárido formado por *N*-acetilglucosamina (NAcGlc) y AGlc. Sin embargo el queratán sulfato no presenta en su estructura el ácido urónico característico de otros GAGs y su disacárido patrón se compone de cadena de *D*-galactosa y *N*-acetilglucosamina. Y por último, el ácido hialurónico (AH) que está compuesto por los disacáridos AGlc y NAcGlc. El AH es único entre los GAG ya que no presenta grupos sulfato en su estructura y tiene la peculiaridad de presentarse en la MEC de forma libre, es decir, no se encuentra unido a ninguna proteína; así el AH no forma parte de ningún PG. Sin embargo, sí es parte de los complejos que se forman de manera no covalente con proteoglicanos ya que éstos presentan un dominio de unión a ácido hialurónico y se unen a éste mediante una proteína de unión (Fig 3). Los polímeros de ácido hialurónico son de gran tamaño (con pesos moleculares entre 100–10.000 KDa) y pueden desplazar un gran volumen de agua. Esta propiedad les permite actuar como lubricantes y amortiguadores de

fuerzas; por ello su presencia es fundamental en el líquido sinovial de las articulaciones

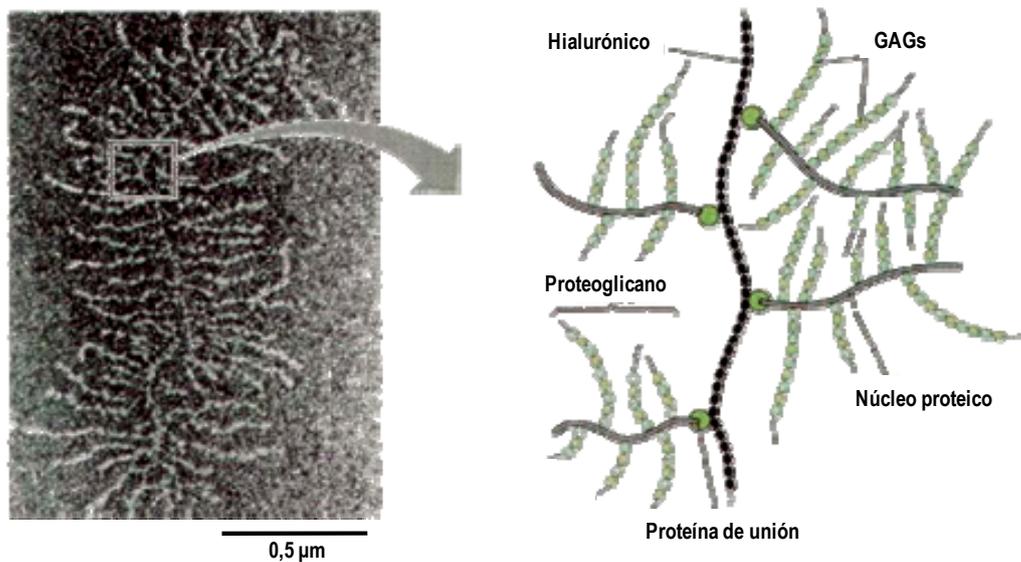


Figura 3: Estructura de los PG con sus GAGs y unidos a las cadenas de AH. A la izquierda se presenta una imagen de microscopía electrónico de la ultraestructura de varios PG unidos a una molécula de ácido hialurónico. A la derecha se representa esquemáticamente esta misma estructura. Modificado de Plopper (Ploppler 2013).

Por todo esto, la visión actual de los GAG es que representan una fuente enorme de variación estructural y química en los PG y por ende, de la MECn. Por tener un dato, si consideramos todas las variables, las posibles combinaciones de un pentasacárido de CS/DS ascienden a 1008 (Caterson, 2012). La longitud de las cadenas laterales así como su patrón de sulfatación y su propia naturaleza modificable por la acción de distintas enzimas hacen a estas moléculas difíciles de estudiar pero al mismo tiempo ya han captado la atención de muchos grupos de investigación que creen que estas peculiaridades podrían revestir interés en ciertos procesos fisiopatológicos.

2.2.2. Los proteoglicanos de la matriz extracelular neural

Los PG consisten en un núcleo proteico cuyos residuos de serina pueden presentar, unido de forma covalente a través de un tetrasacárido, una o varias cadenas polisacarídicas o GAG. Dependiendo de la composición de estos GAG, los PG pueden clasificarse en proteoglicanos de heparán sulfato (PGHS), proteoglicanos de condroitín sulfato (PGCS), proteoglicanos de dermatán sulfato (PGDS) y los proteoglicanos de queratán sulfato (PGQS).

Es en la MEC del sistema nervioso donde los PGCS cobran mayor relevancia estando presentes no solo en la matriz sino también en las membranas celulares en forma de proteínas transmembrana. Así, los PGCS representan los PG más abundantes del SNC de los mamíferos. Los PGCS presentes en el SNC se engloban en 3 familias: los lecticanos (agrecano, versicano, brevicano y neurocano), la familia de los fosfacanos o RPTP β y el antígeno neuroglial 2 (NG2).

Los lecticanos presentan un dominio en su extremo N-terminal que se une por medio de proteínas de unión (como la BRAL1 o también conocida HAPLN2) al ácido hialurónico y por su otro extremo, el C-terminal, se une a proteínas de matriz como la tenascina R que acaba uniéndose a los receptores de membrana celulares. Los lecticanos presentan mucha heterogeneidad estructural, el tamaño de la fracción proteica varía entre 95 y 400 KDa mientras que los CS GAG unidos van de 1 a 100 cadenas. Además, los CSPG pueden unir un único tipo de GAG o bien presentar varios al mismo tiempo. Por ejemplo, los PG de la familia del sindecano o glipicano presentan cadenas tanto de CS como HS. Por su parte, el CSPG NG2 es el único que se presenta como proteína transmembrana en las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) (Tabla 1)

Tabla 1: Clasificación de los proteoglicanos (PGCS) de la matriz extracelular neural (MECn). Se detalla el número de cadenas laterales de GAG que presentan así como la célula que se encarga de su síntesis. Aunque todos ellos están presentes en la MECn también se especifica si son específicos de ésta o no, además de si se localizan en la membrana o en la MEC (Cafferty y col.).

Proteoglicanos de CS de la MEC neural					
Familia de CSPGs	Tipo	Nº de GAGs (Isaacson)	Origen	Específico	Localización
Lecticanos	Agrecano	~100	Neuronas	Si	MEC-PG
	Versicano V0	17 a 23	Astroцитos	No	MEC-PG
	Versicano V1	12 a 15	Astroцитos	No	MEC-PG
	Versicano V2	5 a 8	Oligodendrocitos	Si	MEC-PG
	Neurocano	3	Neur/Astro	Si	MEC-PG
	Brevicano	0 a 5	Glía/Neuronas	Si	TM&MEC-PG
	GPI-Brevicano	0 a 5	Glía	Si	TM-PG
Fosfacano-	Fosfacano	0 a 3	Glía/Neuronas	Si	MEC-PG
RPTP	RPTP	0 a 3	Glía/Neuronas	Si	TM-PG
PGs ricos en leucina	Decorina	1	¿?	¿?	MEC-PG
	Biglicano	1 a 2	¿?	¿?	MEC-PG
	Neuroglicano C	3 a 5	Neuronas	Si	TM-PG
Otros	Trombomodulina	1	¿?	¿?	TM-PG
	Apicano	1	Glía	No	TM-PG
	NG2	0 a 3	O2A Progenitor	No	TM-PG

Los proteoglicanos están implicados en numerosos procesos como el crecimiento, adhesión y migración celular, unión a receptores y proteínas de señalización; poseen también una gran capacidad de interactuar con otros componentes de la MEC (Rhodes y col. 2004). De forma específica, los proteoglicanos son capaces de unir un gran número de factores de crecimiento. Esta unión se da en el componente sacarídico de la molécula, es decir, en los GAG y es el patrón de sulfatación lo que determina su especificidad de reconocimiento (Shipp y Hsieh-Wilson 2007). La distribución espacial de las cargas negativas contribuye a esta interacción. Este fenómeno sirve para modular la actividad de estos factores, bien estabilizando la interacción con su receptor en membrana o también controlando el paso hacia su receptor de membrana o preservando la molécula de su degradación proteolítica, comportándose así como un depósito de reserva liberable en las condiciones en las que se remodele o se degraden los PG de la MEC.

2.2.3. Papel de los proteoglicanos de condroitín sulfato en el sistema nervioso

La mayoría de las funciones de los PGCS son atribuibles a la presencia de CS como cadena lateral de la molécula, aunque también se ha estudiado la contribución del componente proteico a la función biológica (Kato y col. 1998). Como ya se ha comentado para los GAG en general, los PGCS son capaces de unir varios factores tróficos, tanto factores promotores del crecimiento como la midquina, pleiotrofina y algunos miembros de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (Milev y col. 1998; Deepa y col. 2002; Kawashima y col. 2002; Deepa y col. 2004) como también factores inhibidores del crecimiento como las semaforinas (Kantor y col. 2004). Como el resto de PG, los PGCS juegan un papel fundamental tanto en el inicio como en el desarrollo de procesos inflamatorios (Taylor y col. 2006). Las funciones por las que acomete este rol serían (1) localizar factores de crecimiento y otras moléculas de señalización en sitios concretos de la anatomía; por ejemplo la localización de moléculas guía para el crecimiento axonal en la corteza frontal en desarrollo como vieron Emerling y Lander (Emerling y col. 1996); (2) regulación de la actividad de estas moléculas; por ejemplo, la semaforina 5A unida a un GAG la convierte en una molécula inhibidora siendo su función, en estado libre, fundamentalmente permisiva para el crecimiento axonal (Kantor y col. 2004; Gama y col.) (Gama y col.)

estabilización de la unión ligando/receptor, induciendo oligomerización de receptores en membrana, modulando la señalización mediada en cada caso (Milev y col. 1998; Coles y col. 2011); y como explicamos anteriormente, (4) protección de proteínas de su degradación; promoviendo por ello (5) la formación de un depósito de reserva de moléculas activas disponibles para futuras movilizaciones.

Los PGCSs son moléculas de la MEC ampliamente expresadas en el cerebro en desarrollo y en el del adulto tanto en el SNC como en el SNP (Carulli y col. 2006) y juegan un papel protagonista en el desarrollo del sistema nervioso (Margolis y col. 1997), así como en la regeneración axonal, ya que estas moléculas restringen la plasticidad estructural tras un daño, isquémico o traumático (Jones y col. 2003). Es bien sabido que el CS ejerce funciones inhibitoras aunque existe controversia respecto al patrón de sulfatación y tamaño necesarios para ejercer tal efecto. Respecto a la sulfatación, se sabe que es necesaria para que el CS presente actividad inhibitora, por ello, una forma de evitar su actividad inhibitora en la cicatriz glial sería prevenir su sulfatación (Smith-Thomas y col. 1995). La unidad disacáridica de CS más representada en el SNC del adulto es el 4-sulfato (CS-A). Algunos estudios han revelado que tras un daño existe un aumento en los niveles de ARNm de la enzima condroitín-6-sulfotransferasa 1 y mayores niveles de CS monosulfatados en el C6 del residuo de NAcGal (CS-C) (Properzi y col. 2005). El CS-C es fundamentalmente inhibidor (Snow y col. 1990), mientras que el tipo D (CS-D 2,6 disulfatado) y el 4,6 sulfato (CS-E) promueven la elongación de los axones de neuronas embrionarias *in vitro* (Clement y col. 1998; Clement y col. 1999).

Si bien es cierto que este tipo de aseveración no es universal ya que dependiendo del modelo celular utilizado (tipo neuronal, estado de desarrollo) otros autores han visto justo lo contrario, siendo el CS-A y el CS-E los que mayor efecto inhibidor ejercen (Gilbert y col. 2005; Kwok y col. 2011; Brown y col. 2012) mientras que existe, curiosamente plasticidad estructural (permisividad para la regeneración) tras un aumento en la sulfatación en posición 6 (Kwok y col. 2011; Miyata y col. 2012; Takeuchi y col. 2013). En lo que sí parece que existe bastante consenso en la literatura es que es la fracción GAG de los PGCS la que ejerce el efecto inhibidor del crecimiento axonal y restringe por ello la plasticidad estructural.

Tabla 2: Resumen de los GAG más representados en los PG de la MECn las funciones descritas y los receptores por los que las lleva a cabo. Los números detrás del CS hacen referencia a la posición de los grupos sulfato CS-6 es CS sulfatado en la posición 6. DO: dominancia ocular. Modificado de Mironova (Mironova y col. 2013)

GAGs: Moléculas parecidas, funciones muy diversas						
GAGs	Expresión en el SNC adulto	Δ Expresión tras un daño en el SNC	Actividad inhibitoria en neuritas <i>in vitro</i>	Receptores	Función en el SNC	Referencias
CS- B (Dermatán)	Modesta	Si	No	RPTP σ , NgR1, NgR3	Cicatriz fibrótica	(Dickendesher y col. 2012; Li y col. 2013)
CS-C (CS-6)	Modesta	Si	No	Desconocido	¿Plasticidad en DO?	(Wang y col. 2008; Miyata y col. 2012)
CS-D (CS-2,6)	Minoritaria	¿?	Desconocido	NgR1, NgR3	¿Plasticidad en DO?	(Dickendesher y col. 2012)
CS-E (CS-4,6)	Minoritaria	Si	Muy intensa	RPTP σ , NgR1, NgR3	¿Plasticidad en DO? ↓ regeneración axonal en CNS	(Gilbert y col. 2005)
CS-A (CS-4)	Muy abundante	No	Modesta	Desconocido	Desconocida	(Wang y col. 2008)
Queratán Sulfato (QS1 y QS2)	Cerebro, médula espinal y abundante en la córnea	Si	Intensa	Desconocido	Guía axonal, ↓ regeneración axonal en CNS	(Imagama y col. 2011)
Heparán sulfato (HS)	Abundantes, incluyen glicoproteínas y sindecanos	Si	Promotora o inhibitoria	NgR1, NgR3, EphB, CAMs, FGFRs, LARs, Semaforinas	Guía axonal, sinaptogénesis, estructura sináptica, neurotransmisión	(Kaksonen y col. 2002; Johnson y col. 2006; Coles y col. 2011)
Hialurónico (sin grupos S)	Muy abundante en la RPN	No	Inocuo	Toll-like receptor 2	Plasticidad en DO Mielinización	(Dityatev y col. 2010)

2.2.4. La cicatriz glial

La respuesta del sistema nervioso ante un estímulo traumático o isquémico implica una compleja cascada de eventos que concluye con la instauración de un microambiente (tejido cicatricial) que resulta inhibitorio para la recuperación funcional (Fitch y col. 2008). Los astrocitos reactivos así como las células precursoras de oligodendrocitos (CPO) se hipertrofian y aumentan la expresión de PGCS inhibidores del crecimiento axonal asociados al tejido cicatricial (agrecano, brevicano, neurocano, fosfacano, versicano y NG2) en la proximidad de la barrera hematoencefálica (BHE) dañada (Silver y col. 2004). La deposición de componentes de la MEC es regulada en condiciones fisiológicas por factores de crecimiento; sin embargo la producción de PGCS y su deposición en la MEC se estimula por citoquinas proinflamatorias como el TGF- β (Fitch y col. 1999).

En algunas ocasiones las meninges se rompen y ciertos elementos del tejido conectivo, como los fibroblastos, pasan al sistema nervioso e invaden el núcleo de la lesión junto con macrófagos activados (Fitch y col. 1999; Preston y col. 2001). Si nosotros inhibimos la división e hipertrofia astrocitaria tras el daño, no se produce la restauración de la BHE con la consiguiente extensión de la zona lesionada y aumento de la degeneración celular. Así, estos hallazgos demuestran que los astrocitos proveen señales y acciones en el tejido para preservar la función en la manera de lo posible (daño leve o moderado) como se ejemplifica en un modelo de lesión en la médula espinal (Faulkner y col. 2004). Desafortunadamente este fenotipo reactivo del astrocito conlleva la síntesis y liberación de PGCS que forman un gradiente, alcanzando su máxima expresión en el núcleo del sitio de la lesión y disminuyendo progresivamente hacia el área de penumbra (Silver y Miller 2004). Este mecanismo se desencadena pocas horas tras la lesión permaneciendo instaurado hasta mucho tiempo después, 3-6 semanas según el modelo murino y el tipo de lesión (Kwok y col. 2008). En este punto querría destacar un modelo *in vitro* de cicatriz glial (Tom y col. 2004), que mimetiza el gradiente de CSPG consecuencia de una lesión en la médula espinal. Este modelo ha sido validado con algunas modificaciones (fig 4, pie de figura) e incluido como ensayo celular *in vitro* en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del medicamento como test para evaluar la capacidad de cualquier molécula de revertir el efecto inhibitorio del agrecano en el sustrato, tal y como se observa en las imágenes de inmunocitoquímicas de la figura 4.

Figura 4. Cicatriz glial modelada *in vitro*. Mediante la deposición de una gota de agrecano (0,7 mg/ml) sobre la que se deposita una capa de MaxGel (1:50-SigmaAldrich) se obtiene un halo de inhibición por el que los axones son incapaces de cruzar. A, imagen de campo claro de un fragmento de la circunferencia inhibidora. B, Tinción con Hoescht de los núcleos celulares; las flechas indican la disposición de los núcleos siguiendo el perímetro de la gota de agrecano. C, crecimiento axonal tras la digestión de los GAGs del agrecano con ChaseABC. D, E y F, tinción nuclear con Hoescht, marcaje glial con anti-GFAP y marcaje neuronal con anti NeuN respectivamente. H es una ampliación de la región marcada y seleccionada con la flecha en G; el resto de recuadros marcan algunos cruces axodendríticos espontáneos. Barras de calibración A, B, C y H: 10 μm , D, E y F: 100 μm .

Aunque no se aprecia en las imágenes en esta preparación (fig 4) tal y como se demuestra en el artículo de Tom y col (2008), los axones en contacto con esta zona de alta concentración de PGCS forman unas estructuras en sus extremos que se llenan de vacuolas y son extremadamente dinámicas, extendiendo procesos y endocitando grandes vesículas que se transportan retrógradamente a la base del cono de crecimiento. Ramón y Cajal fue el primero en describir estas estructuras subcelulares en los axones de neuronas lesionadas a los que llamó bulbos distróficos y de los que creía incapaces de regenerar estructuras funcionales de novo (Oxford Univ. Press, London, 1928). Por el contrario, estudios recientes han demostrado que los bulbos distróficos del cono de crecimiento no son quiescentes del todo sino que podrían mantener un potencial

intrínseco de regeneración en el ambiente hostil de la zona lesionada (Tom y col. 2004). Así pues, uno de los abordajes utilizados ha sido aprovecharse de esta capacidad innata e inducir la regeneración del tejido mediante la transformación del microambiente inhibitorio (Galtrey y col. 2007; Dityatev y col. 2010). De este interesante tema comentaré algunos aspectos en el siguiente epígrafe.

2.2.5. La red perineuronal: una forma especializada de la matriz extracelular rica en proteoglicanos de condroitín sulfato

Aunque la mayor parte de la MECn es amorfa, existen zonas de matriz densa, una subestructura especializada, que se conoce como red perineuronal (RPN) y que se dispone rodeando los cuerpos celulares y las dendritas de ciertos subtipos neuronales en el SNC (Celio y col. 1998). La RPN, ya descrita por los eminentes neuroanatomopatólogos Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX, está formada por proteoglicanos de la familia de los lecticanos, como el brevicano (Hagihara y col. 1999; John y col. 2006), neurocano, versicano (Bignami y col. 1993) y el agrecano (Zaremba y col. 1989), el ácido hialurónico, proteínas de unión y tenascinas C y R (Bandtlow y col. 2000; Matthews y col. 2002). La mayoría de estos componentes se sintetizan por la neurona envuelta por la RPN (Carulli y col. 2006) aunque la contribución de los astrocitos circundantes, que extienden procesos protoplásmicos hacia la célula en cuestión, no debe obviarse ya que en concreto el brevicano y el neurocano pueden ser sintetizados tanto por la neurona provista de RPN como por el astrocito en contacto con ella. Experimentos de microscopía confocal han revelado que esta estructura se diferencia claramente de los procesos protoplásmicos de astrocitos que también pueden contactar con la superficie neuronal y apoya la hipótesis de que la RPN es una forma especializada de matriz extracelular que se interpone entre la superficie de algunas neuronas inhibitorias y los procesos astrocíticos (Blumcke y col. 1995).

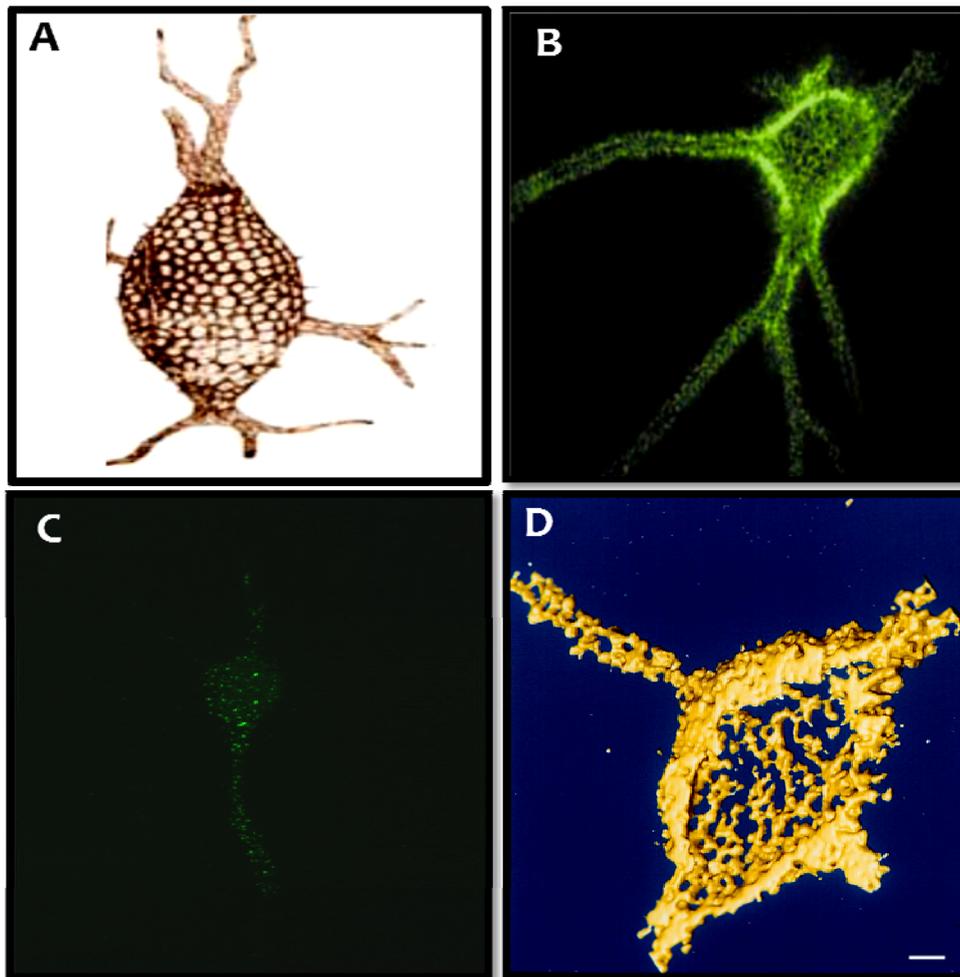


Figura (5): Estructura de la red perineuronal. A, Dibujo realizado por D. Santiago Ramón y Cajal. B, Imagen de microscopía confocal de una interneurona de la región CA1 del hipocampo marcada con un anticuerpo de *Wisteria floribunda*. C, Inmunohistoquímica del anticuerpo anti-CS (CS-56) en neuronas de hipocampo de embrión de rata con 3 días de cultivo *in vitro*. D, Marcaje de la red perineuronal de una interneurona de la corteza somatosensorial de la rata con la lectina biotinilada *Vicia Villosa* y revelada con la avidina marcada con un fluorocromo (reconstrucción 3D de la imagen de barrido laser confocal). Barra de calibración: 1 μ m. A, B y D modificadas de (Celio y col. 1998; Dityatev y Schachner 2003) C, experimento propio.

La RPN forma unidades poligonales cuyos espacios se interpretan como sitios donde los contactos sinápticos pueden producirse; por ello se entiende que la RPN es una estructura que restringe la plasticidad sináptica (Gogolla y col. 2009) reforzando al mismo tiempo los contactos sinápticos una vez formados. Para fundamentar esta afirmación me gustaría aquí introducir el concepto de *periodo crítico*: Durante el

desarrollo postnatal y juvenil del tejido nervioso, la estructura de numerosas neuronas es refinada por la experiencia (contactos sinápticos nuevos producidos a raíz de estímulos sensoriales) para optimizar el procesamiento interno de las señales que recibe del exterior. Este proceso de refinamiento dirigido solo se produce durante un periodo de tiempo denominado periodo crítico (PC) caracterizado por una alta capacidad plástica y una alta sensibilidad a los estímulos. Tras el PC, las redes son maduras y más estables desde el punto de vista estructural asegurando con ello el flujo efectivo y el procesamiento de la información. El PC reviste una importancia fundamental en los cambios finos de los microcircuitos cerebrales asociados a la percepción sensorial, el aprendizaje motor y el lenguaje. Una forma de manipular la instauración y el final del PC es mediante el antagonismo de los inhibidores del crecimiento axonal entre los que se incluyen los PGCS. Pero no cualquier patrón de sulfatación de los CS del PGCS afecta de forma determinante al PC; en concreto parece ser el ratio entre 4S y 6S, y no la expresión global de PGCS lo que determina el fin del PC (Miyata y col. 2012). Esto se explica por el hecho de que hacia el final del PC se produce una remodelación de la MECn acompañada de un aumento en la expresión de PGCS que se condensan alrededor de ciertas neuronas para formar la RPN (Orlando y col. 2012); coherentemente, el bloqueo de su formación o la degradación de las RPN ya formadas promueve la dilatación del PC, prolongándolo incluso en estados de desarrollo más avanzados (Pizzorusso y col. 2002; Carulli y col. 2010; Beurdeley y col. 2012).

Como ya hemos visto, la alteración y modificación de la RPN incrementa la plasticidad morfológica y funcional pero los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo están aún por esclarecer. La RPN es especialmente prominente en las interneuronas GABAérgicas (Celio y col. 1994; Celio y col. 1998) y en algunas neuronas piramidales (Hausen y col. 1996; Hartig y col. 1999) así como en otras neuronas de tipo inhibitor en otras estructuras cerebrales como la corteza, la sustancia negra, el tálamo, el hipocampo y la médula espinal del SN adulto no solo de mamíferos, sino también en peces, anfibios y reptiles. Una característica común a muchas de las interneuronas que presentan RPN es la expresión de la proteína parvalbúmina (Morris y col. 2000). Una característica común de las células cubiertas por RPN es la gran actividad que presentan, disparando potenciales de acción a una frecuencia muy elevada (Morris y Henderson 2000). Por ello se ha propuesto que la RPN crea un ambiente idóneo para la actividad de estas células posiblemente,

almacenando una alta densidad de cargas positivas (cationes de Na, Ca) gracias a las cargas negativas de los grupos sulfato de los GAG haciendo posible así un rápido intercambio de estos iones que la célula necesita (Bruckner y col. 1993; Hartig y col. 1999).

La formación de la RPN comienza tarde en el desarrollo postnatal, durante el periodo caracterizado por el refinamiento, mielinización y el desarrollo de un patrón de actividad más parecido al del adulto (Dityatev y col. 2007). Así el primer marcaje positivo de la aglutinina de *Wisteria floribunda* (WFA- por su siglas en inglés) que marca los residuos de N-acetilgalactosamina del CS, en el cerebro de una rata, se observa a día 7 postnatal en el cerebelo indicando una maduración más avanzada de los componentes de la matriz en regiones subcorticales (Koppe y col. 1997). La expresión espacio-temporal de los PGCS en el desarrollo del SNC correlaciona con los límites gliales, como el “spinal cord roof plate” o la zona de entrada de la raíz dorsal (DREZ- por sus siglas en inglés) (Snow y col. 1990; Pindzola y col. 1993). Estos trabajos sostienen la hipótesis de que los CSPG podrían dirigir la guía axonal mostrando los caminos permisivos a modo de “quitamiedos” en las autopistas.

En el SNC del adulto, alteraciones en la RPN podrían resultar en un proceso incontrolable de ramificación y sinaptogénesis no deseado; de hecho, se han observado cambios en la RPN tras largos periodos de convulsiones, y podrían propagar la actividad epileptogénica que se caracteriza por una desregulación del balance entre la actividad excitadora e inhibidora (McRae y col. 2012).

2.3. La matriz extracelular neural en condiciones fisiopatológicas

Cualquier lesión en el SNC (esclerosis múltiple, lesión en la médula espinal o la enfermedad de Alzheimer) promueve alteraciones en la MECn cuya intensidad depende tanto de la gravedad como de la cronicidad del daño que las ocasione.

La ausencia de regeneración y escasa capacidad de autorreparación en el SNC maduro tras un daño se contraponen con la observada capacidad plástica que existe en el SNP (Steinmetz y col. 2005). Esta diferencia ha despertado la curiosidad de algunos investigadores por esclarecer los mecanismos moleculares subyacentes con la esperanza de sacar partido a esta información en potencia y lograr una regeneración con éxito en el SNC tras un estímulo lesivo.

El declive gradual en la capacidad intrínseca de crecimiento de las neuronas conforme el organismo madura, podría explicar el fracaso en la regeneración del SNC del adulto. A pesar de que muchas neuronas del SNC pueden sobrevivir muchos años después de sufrir una axotomía, los axones de esas células no consiguen atravesar el sitio de la lesión (Tom y col. 2004), a diferencia de sus correspondientes en el SNP o en el sistema nervioso del embrión. Las estructuras mielínicas que recubren las fibras nerviosas, formadas por los oligodendrocitos, pueden sufrir daño exponiendo a los axones dañados a los llamados inhibidores asociados a mielina (Filbin 2003; Yiu y col. 2003). Además, los astrocitos reactivos de la cicatriz glial en el sitio de la lesión actuarían como barrera adicional para la regeneración axonal (Silver y Miller 2004).

Investigaciones recientes han mostrado que aparecen alteraciones en la expresión y cantidad de los PGCS en ciertas enfermedades del SN incluyendo la esquizofrenia, el ictus o la enfermedad de Alzheimer que podrían revestir para conocer su fisiopatología (Shioi y col. 1995; Morawski y col. 2011). Algunos trabajos han encontrado no solo alteraciones en el componente neuronal sino también en el glial en pacientes diagnosticados de esquizofrenia y no en aquellos con enfermedad bipolar (Pantazopoulos y col. 2010); para los que estén interesados, este tema ha sido revisado recientemente por (Berretta 2011).

Para el caso del ictus, se conoce que existe plasticidad en la zona de penumbra y en regiones remotas al sitio de la lesión; ello ocasiona una reorganización de los mapas

neuronales de la corteza que se asocian con cierta recuperación de la función (Carmichael 2003). Muchos de estos procesos están íntimamente ligados a cambios en la expresión de PGCS; de hecho, las técnicas de inmunomarcaje del cerebro de la rata revelan una reducción de neuronas con RPN en la región de penumbra isquémica (peri-infarto) entre 7 y 14 días tras una lesión fotoquímica y tras la oclusión de la arteria cerebral media (Hobohm y col. 2005) con la consiguiente reducción en los PGCS agrecano, versicano y fosfacano (Carmichael 2003).

El papel de los PGCS en la enfermedad de Alzheimer (EA) parece ser múltiple y controvertido. Algunos estudios han observado una reducción en el número de neuronas con RPN en cerebro de enfermos de EA (Kobayashi y col. 1989; Baig y col. 2005) mientras que otros investigadores vieron una correlación negativa entre el número de neuronas asociadas a una RPN y su vulnerabilidad a cambios en el citoesqueleto relacionados con una neurodegeneración mediada por Tau en pacientes con EA (Bruckner y col. 1999). Así según esta última línea de investigación, la RPN proveería protección frente a un estrés excitotóxico (Okamoto y col. 1994), estrés oxidativo (Morawski y col. 2004), y la formación de ovillos neurofibrilares (Bruckner y col. 1999; Hartig y col. 2001) en regiones subcorticales de cerebros de pacientes con EA (Morawski y col. 2010). Los PGCS en estas circunstancias aparecen colocalizados con las placas de amiloide y ovillos neurofibrilares sugiriendo que podrían tener un papel en su etiopatología o ser una consecuencia de ello (DeWitt y col. 1993; McLaurin y col. 1999). Otros estudios *in vitro* han demostrado que los GAGs de los PGCS promueven la oligomerización de fibrillas de A β y además esta interacción inhibe la proteólisis de los acúmulos del péptido β amiloide (Gupta-Bansal y col. 1995). Curiosamente, el A β es un potente estimulante de la producción astrocítica de PGCS en el entorno neuronal donde desempeñan una función inhibitoria del crecimiento axonal (Canning y col. 1993) y pueden desencadenar pérdida de sinapsis y un descenso en la densidad axonal en el cerebro del enfermo de Alzheimer (DeWitt y col. 1993) (DeWitt y col. 1996).

2.3.1. La matriz extracelular neural como diana terapéuticas

En las últimas décadas la matriz extracelular se ha convertido en diana hacia la que dirigir distintos abordajes terapéuticos, a saber (1) remodelado enzimático de los componentes de la MEC (2) reducción de la producción de componentes inhibitorios de

la MEC en el medio extracelular o del componente celular que los sintetiza y (Gama y col.) bloqueo de la señalización mediada por las moléculas inhibitorias de la MEC.

En esta línea de trabajo, algunos autores han observado que el tratamiento con condroitinasa ABC (ChABC), una enzima con actividad catalítica sobre los PGCS que libera las cadenas de CS del núcleo proteico (Prabhakar y col. 2005), reduce o elimina la condición inhibidora de la matriz cicatricial (Zuo y col. 1998; Barritt y col. 2006). Coherentemente con esta hipótesis otros autores han confirmado que el bloqueo en la traducción de la enzima limitante en la síntesis de CS en los PGCS, la xylosiltransferasa-1, promueve la regeneración de los axones de neuronas del ganglio basal trasplantadas en un modelo de lesión neuronal (Grimpe y col. 2004). *In vivo*, el tratamiento con ChABC aumenta la regeneración de los axones de neuronas dopaminérgicas (Moon y col. 2001) y promueve la regeneración axonal y la recuperación funcional tras una lesión de la médula espinal (Bradbury y col. 2002; Moon y col. 2002; Yick y col. 2003; Caggiano y col. 2005).

Las enzimas análogas a la condroitinasa ABC y responsables de la remodelación de la MEC en organismos superiores, incluyen varias familias de proteasas entre las que se encuentran las metaloproteasas de matriz (MMP- por sus siglas en inglés) y las desintegrinas y metaloproteasas con motivos de trombospondina (ADAMTS). Existen en mamíferos 24 MMPs que en conjunto son capaces de degradar todos los componentes de la MEC (Yong y col. 1998). Muchas MMPs aumentan su expresión en condiciones patológicas como el ictus, un daño de la médula espinal o en la esclerosis múltiple (Yong 2005; Park y col. 2009) con efectos deletéreos indeseables como pueden ser la inducción de citotoxicidad, aumento de la neuroinflamación o rotura de la BHE (Yong y col. 1998). Sin embargo, la actividad de estas enzimas también promueve cierto grado de recuperación en la zona lesionada; por ejemplo en modelos murinos de lesión medular, la expresión de la MMP2 se asocia a mayor arborización dendrítica, menor tejido cicatricial y de una recuperación funcional locomotora (Hsu y col. 2006). Las MMP pueden ser secretadas hacia la MEC o encontrarse en forma de proteína transmembrana. Los factores que inducen su expresión incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés) (Machida y col. 1991; Muir 1994; Khan y col. 2002), la citocina interleucina 1 α y β (Gottschall y col. 1995; Vecil y col. 2000), AMPc (Muir 1995), la proteína cinasa C (Arai y col. 2003), las especies reactivas de oxígeno (Kim y col. 2003) y la radiación ultravioleta (Ramos y col. 2004). Los estímulos o

tratamientos antiinflamatorios a base de glucocorticoides (metilprednisolona) e interferones, median la inhibición de estas enzimas (Ma y col. 2001; Xu y col. 2001).

En estado activo, la MMP-2 y la MMP-3 pueden de forma independiente activar a la MMP-9. Esta cascada de activación se encuentra sobreestimulada y en general existe un aumento de expresión de las MMPs casi tras cualquier estímulo nocivo como una lesión traumática en el SNC, tras un estímulo hipóxico-isquémico (Dietzmann y col. 2000) una lesión en la médula espinal (Xu y col. 2001), en la enfermedad de Alzheimer (Yoshiyama y col. 2000) y en el ictus (Sole y col. 2004; Nagel y col. 2005), y este fenómeno es imprescindible para la formación de la cicatriz glial (Hsu y col. 2008). Curiosamente, la degradación de las moléculas de la MECn por estas enzimas facilita y promueve la extensión y el crecimiento neurítico, además de la migración celular. El grupo del Dr Seiki observó un claro ejemplo de este fenómeno midiendo la expresión de la enzima; que era específica de tejido nervioso y además los niveles de ARNm caían a niveles muy bajos pocos días tras el nacimiento. Además constataron que la MMP-5, proteína transmembrana, se localiza en el extremo del cono de crecimiento axonal de neuronas de la raíz dorsal y del cerebelo y apreciaron una facilitación del crecimiento neurítico cuando éste se encontraba inhibido por PGCS. De forma análoga el grupo de Zuo y col (1998) encontraron que la presencia de la MMP-2 en el extremo de un axón en crecimiento facilita su extensión gracias a la degradación de sustratos de PGCS en el nervio ciático (Zuo y col. 1998). Se obtuvo evidencia adicional en experimentos realizados en la línea celular de feocromocitoma PC12 cuando, al inhibir la expresión de MMP-3 dio como resultado menores niveles de migración celular a través de un sustrato de lamina basal reconstituida (Nordstrom y col. 1995). Estos datos indican que las MMPs modifican la estructura y composición de la MECn promoviendo por ello cierta permisividad a la migración celular y crecimiento axonal durante el desarrollo del SNC o en procesos de reparación convirtiéndose, por este motivo en candidatos a dianas terapéuticas en un contexto neuroregenerador; de esta manera, los procesos neuronales pudieran verse remodelados modificando el circuito de conexiones sinápticas, con el objetivo último de recuperar ciertos parámetros de funcionalidad (Shiosaka y col. 2000). De forma general, los candidatos a diana terapéutica serían: el activador del plasminogeno tisular (tPA por sus siglas en inglés), las MMP y las ADAMs. Respecto al papel del tPA, se ha demostrado que es capaz de promover la plasticidad en la corteza visual (Muller y col. 1998; Berardi y col. 2004; Oray y col. 2004).

Las MMPs se encuentran expresadas en niveles muy elevados en regiones cerebrales de alta plasticidad neuronal y en etapas del desarrollo donde esta plasticidad es imprescindible para la correcta organización sináptica, aunque aparecen también en el cerebelo del individuo adulto (Vaillant y col. 1999; Hayashita-Kinoh y col. 2001) y en el eje hipotálamo-hipófisis (zona de gran plasticidad estructural)(Miyata y col. 2005). Así pues, parece que la RPN y otras estructuras moleculares de la MECn son específicamente degradadas por distintos miembros de la familia de las MMPs y ADAMTS en situaciones patológicas, mecanismo que serviría de inducción compensación de la plasticidad sináptica de forma parecida a la MECn juvenil.

Por ello, y como ya hemos argumentado, la eliminación de las cadenas de CS de los PGCS endógenos en el SN normal y aquellos sobreexpresados en la cicatriz glial tras un daño, presentan un potencial terapéutico para recuperar la plasticidad y la regeneración axonal (Lesma y col. 1996).

2.4. La matriz extracelular neural en la excitabilidad neuronal y plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica refleja los cambios dependientes de actividad en la eficacia de la transmisión sináptica. El aumento o la reducción en la transmisión de las sinapsis estimuladas y que persisten en el tiempo se conoce como potenciación o depresión a largo plazo (LTP o LTD por sus siglas en inglés). En términos mecanísticos, los estímulos que disparan ambos procesos pueden implicar la activación presináptica de receptores NMDA (N-methyl-D-aspartate) y la despolarización de la membrana, lo que produce la apertura de los canales de Ca^{2+} -voltaje dependientes y la entrada de este catión al interior celular. Los niveles de Ca^{2+} controlan de forma bidireccional la eficacia sináptica influyendo en el balance entre la actividad quinasa/fosfatasa de distintas proteínas que, en última instancia, regulan la actividad de los receptores para neurotransmisores mediante su fosforilación o desfosforilación (Dityatev y Schachner 2003).

En los últimos años se ha visto que la MEC no sólo actúa como una estructura pasiva con carga iónica, sino que también es capaz de modular la conductancia y excitabilidad neuronales y contribuye a la organización estructural de distintas proteínas en la membrana, incluyendo los canales iónicos. Diversos trabajos han demostrado que tanto la tenascina C como la tenascina R interaccionan directamente con los canales de sodio dependientes de voltaje. Esta interacción con las subunidades auxiliares $\beta 1$ y $\beta 2$ modulan la localización pericelular durante la mielinización de la membrana axonal (Srinivasan y col. 1998; Xiao y col. 1999; Kazarinova-Noyes y col. 2001). Otras moléculas presentes en la MECn como el brevicano, estabilizan la compartimentalización en superficie de moléculas de señalización y organizan en grupos de proteínas que, entre otras funciones, permean iones en regiones específicas de membrana para formar los nodos de Ranvier (Susuki y col. 2008) que son estructuras electrofisiológicamente muy activas y con gran concentración de proteínas implicadas en la neurotransmisión. En concreto, se ha visto que la vitronectina (proteína de la familia de las integrinas y ligando de éstas) aumenta la corriente de potasio en explantes de hipocampo de ratón; con los experimentos publicados en este trabajo se demostró la capacidad que tienen las proteínas de la MECn de regular la excitabilidad neuronal (Vasilyev y col. 2003; Vasilyev y col. 2004). En otro estudio, Ever y col estudiaron la modulación de los canales de calcio de tipo L por las tenascinas, hecho que afecta profundamente a distintos modelos de plasticidad sináptica como son la LTP y la LTD (Evers y col. 2002; Dityatev y Schachner 2003; Dityatev y col. 2008). Además el ratón deficiente en el PGCS brevicano muestra reducida la LTP (Brakebusch y col. 2002). Pero aún hay más, algunos otros trabajos apuntan a que los PGCS juegan un papel en fenómenos de plasticidad sináptica anteriormente mencionados, que se sabe son el sustrato del aprendizaje y la memoria en la región CA1 del hipocampo del individuo adulto (Malenka y col. 1999; Dityatev y Schachner 2003). Por ejemplo, la eliminación enzimática de las cadenas laterales de CS de los PGCS provoca la reducción tanto de la LTP como la LTD en cultivos de rodajas de hipocampo de ratón (Bukalo y col. 2001; Saghatelian y col. 2001). Sin embargo los mecanismos por los que se produce este efecto se desconocen. Una posibilidad es que este tratamiento enzimático movilice factores de crecimiento que estuvieran unidos a las cadenas de CS, por ejemplo la pleiotrofina que presenta afinidad por PGCS (Milev y col. 1998; Nakanishi y col. 2010) es capaz de inhibir la LTP en el hipocampo (Amet y col. 2001). Otra evidencia adicional proviene de los estudios electrofisiológicos en un ratón transgénico con

ablación del gen para el brevicano (CSPG de la familia de los lecticanos) en los que se observó ausencia de LTP, que fue comparable al resultado obtenido tras inyectar un anticuerpo anti-brevicano en el ratón silvestre. (Brakebusch y col. 2002). Otro estudio abordó el análisis de la LTP en ratones deficientes en neurocano. Este animal presentaba una potenciación inicial normal mientras que la fase tardía se veía reducida drásticamente.

2.5. Receptores para condroitín sulfato y proteoglicanos de condroitín sulfato en el Sistema Nervioso

Hasta la fecha, varios han sido los receptores implicados en el reconocimiento y la mediación de los efectos fisiológicos y patológicos tanto del CS como de los PGCSs entre ellos, el más importante como protagonista de la inhibición de la regeneración axonal. El primero en identificarse fue la fosfatasa $PTP\sigma$ (Shen y col. 2009). Poco tiempo después identificaron el receptor LAR (Leucocyte common antigen-related) que también presenta actividad fosfatasa (Fisher y col. 2011). Además otros autores también han identificado la existencia de afinidad a los PGCSs por algunos miembros de la familia de los receptores para Nogo66, en concreto los NgR1 y NgR3 (Dickendesher y col. 2012). NgR1 es miembro de la subfamilia de proteínas ancladas a lípidos con repeticiones ricas en leucina (en inglés- LRR) y es el responsable junto con la proteína PirB, de mediar los efectos inhibitorios que presentan las glicoproteínas asociadas a mielina, la glicoproteína derivada de oligodendrocito y Nogo66. Para una revisión exhaustiva sobre este tema, refiero a los lectores que estén interesados a (Yiu y col. 2006). Otro receptor al que se ha visto que el CS es capaz unirse con gran afinidad es el receptor de contactina-1 (Mikami y col. 2009). Curiosamente el CS tipo E (disulfatado en posiciones 4 y 6) que muestra un perfil inhibitorio contundente y se une directamente tanto al receptor $PTP\sigma$ como a NgR1 y NgR3 (Brown y col. 2012; Dickendesher y col. 2012).

Ya que en esta tesis todo el trabajo experimental ha sido realizado en cultivos de neuronas de hipocampo de embrión de rata pasaré a explicar brevemente esta estructura anatómica del cerebro.

2.6. El hipocampo

El hipocampo es una de las regiones cerebrales más estudiadas por los neurocientíficos por diversas razones: (1) Su peculiar estructura, altamente organizada, (2) la facilidad que presenta para su estudio electrofisiológico, tanto *in vitro* como *in vivo* así como (Gama y col.) su implicación en los procesos de aprendizaje y memoria, además de la relevancia clínica de la degeneración de esta estructura en enfermedades como el Alzheimer.

El hipocampo, junto a la amígdala, el área septal, el núcleo accumbens, la habénula, el núcleo anterior del tálamo, parte de los ganglios basales, el hipotálamo y la corteza orbitofrontal, forma parte del sistema límbico. En sí mismo, el sistema límbico no es una estructura anatómica, sino más bien un concepto funcional cuyo papel sería el control y regulación de los estados emocionales y motivacionales y la manifestación comportamental de los mismos. El sistema límbico cumple también un importante papel en la regulación de las funciones metabólicas y vegetativas. En particular, el hipocampo estaría relacionado con los procesos de memoria, almacenamiento de los recuerdos y aprendizaje espacial (Reznikov 1991).

Anatómicamente, el hipocampo recibe señales sensoriales de diversa índole, pero muy alejadas sinápticamente de sus fuentes primarias. Del mismo modo, por sus proyecciones eferentes, también se encuentra muy alejado de los centros motores. Así pues, el hipocampo ocupa un emplazamiento ideal para el análisis no contingente de la información interna y subjetiva que recibe a través de sus aferencias subcorticales.

2.6.1. Localización y nomenclatura del hipocampo en mamíferos

Filogenéticamente, el sistema límbico corresponde a la parte más antigua del telencéfalo y a las estructuras corticales que de él derivan. En el desarrollo evolutivo desde el paleocortex al neocortex, el hipocampo se considera como el arquicortex intermedio (Shepherd 1979; Nieuwenhuys y col. 1982).

El hipocampo en mamíferos es el paradigma de la corteza simple, consistente principalmente en un tipo celular básico y sus interneuronas asociadas. Estas neuronas base están empaquetadas en una de las tres capas que conforman el arquicortex (capa polimórfica, capa piramidal y capa molecular), en contraste con las seis capas que

estarían formando el neocortex (capa molecular, capa granular externa, capa piramidal externa, capa granular interna, capa piramidal interna o ganglionar y capa fusiforme o multiforme).

En la rata, la formación hipocampal se encuentra en la parte medial del lóbulo temporal y está situada profundamente. Por su lado lateral, la formación bordea la pared mediobasal del ventrículo lateral. Como se puede observar en la figura 6, la formación hipocampal está curvada a lo largo de su eje longitudinal (septo-temporal), de manera que la región dorsal se sitúa de forma casi horizontal y la región ventral desciende a la base del cerebro (Blackstad y col. 1970; Hjorth-Simonsen 1972), es decir, asemejaría a una “C”.

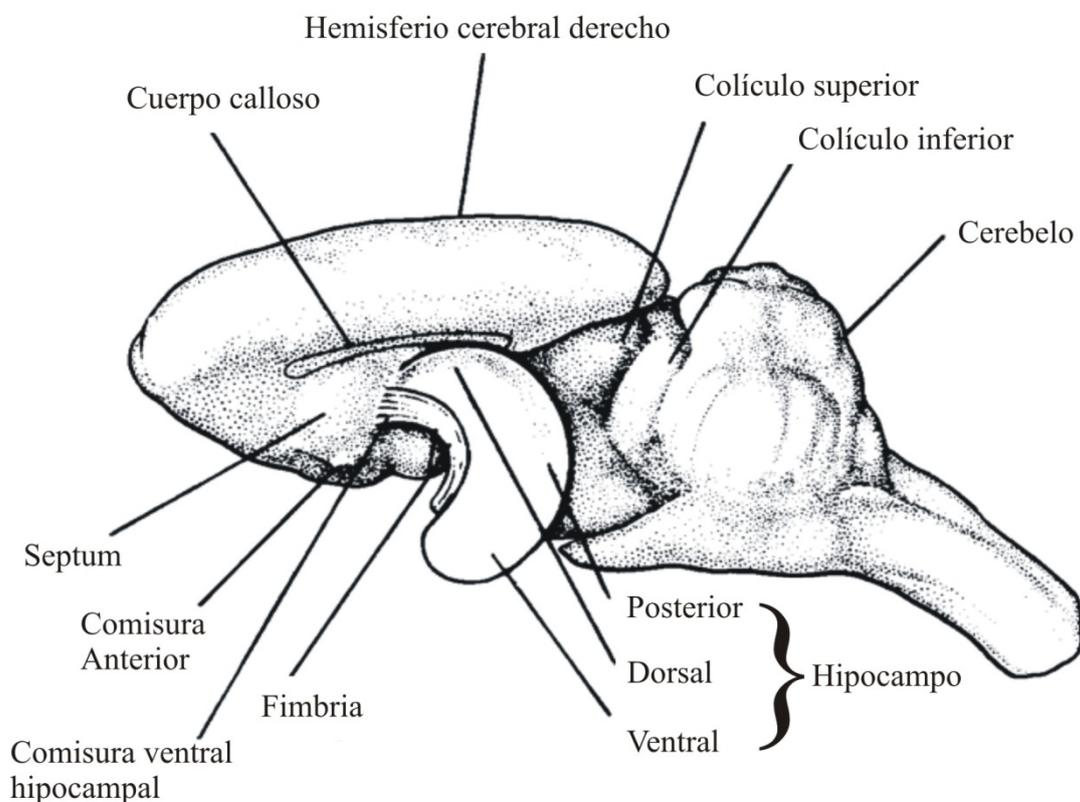


Fig. 7. Dibujo del hipocampo izquierdo de rata. El resto de estructuras del prosencéfalo izquierdo han sido eliminadas. En este animal el hipocampo ocuparía una gran porción del prosencéfalo. Con propósitos descriptivos, el hipocampo puede ser dividido en una región dorsal, encontrándose justo debajo del *septum*, una región posterior donde empieza a doblarse ventral y lateralmente y una región ventral que se encuentra en la región temporal del cerebro. La parte del hipocampo visible en este aspecto dorsal es el hipocampo propiamente dicho, mientras que la *fascia dentata* estaría enterrada dentro y en el fondo de esta superficie. Modificado de (Angevine 1965)

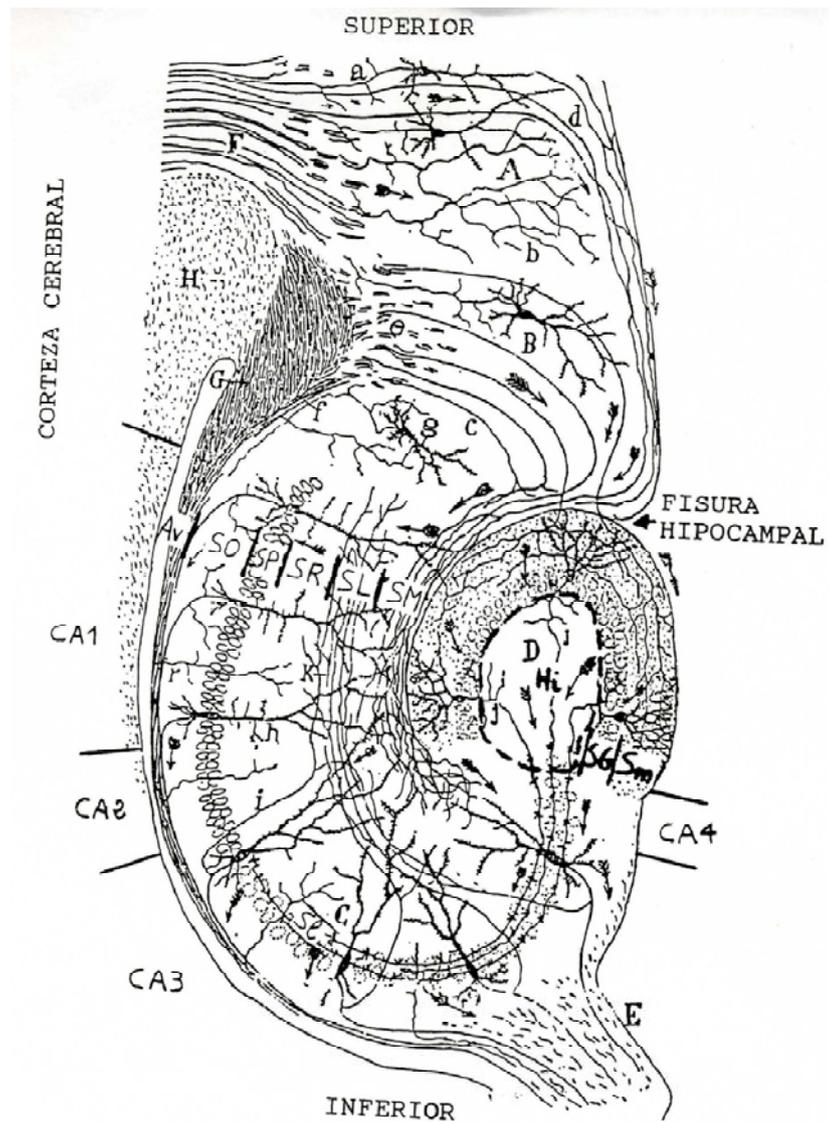


Fig. 8. Esquema de la arquitectura y de las conexiones del hipocampo y giro dentado de rata. Modificado de Ramón y Cajal, 1911. **A:** ganglio del extremo occipital; **B:** *subiculum*; **C:** hipocampo; **D:** giro dentado; **E:** fimbria; **F:** cíngulo; **G:** fascículo angular o tracto temporo-ammónico cruzado; **H:** cuerpo calloso; **K:** colaterales recurrentes resultantes de las células piramidales y entrando al *stratum lacunosum* del hipocampo; **a:** cilindro-eje penetrando en el cíngulo; **b:** fibras del cíngulo terminando en el núcleo del extremo occipital; **c:** fibras temporo-ammónicas perforantes o directas; **d:** fibras perforantes del cíngulo; **e:** plano de fibras temporo-ammónicas superiores; **g:** célula del *subiculum*; **h:** células piramidales de la región superior del hipocampo; **i:** colaterales ascendentes de las grandes células piramidales; **j:** cilindroeje de un grano; **r:** colaterales de fibras del alveus. Está remarcado los distintos *strata* del hipocampo y sus límites (**Av:** *alveus*; **SO:** *stratum oriens*; **SP:** *stratum pyramidale*; **SR:** *stratum radiatum*; **SL:** *stratum lucidum*; **SL:** *stratum lacunosum*; **SM:** *stratum moleculare*); la subdivisión en áreas del hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4); y las capas del giro dentado (**Sm:** *stratum moleculare*; **SG:** *stratum granulosum*; **Hi:** *hilus*).

El hipocampo propiamente dicho puede ser dividido más a fondo en base a criterios anatómicos y celulares. A principios del siglo pasado don Santiago Ramón y Cajal (1911) distinguió en roedores dos regiones: una superior y otra inferior, siendo esta última la que contendría la zona de células piramidales grandes. Posteriormente, un estudio morfológico más detallado permitió a Lorente de No (1934) dividir el hipocampo en cuatro regiones (CA1-4), siendo el significado de CA: *cornu ammonis*. El área CA1 corresponde a la mayor parte de la región superior próxima al *subiculum*, CA2 está situada cerca de la curva del arco mayor del hipocampo, CA3 ocupa la mayor parte de la región inferior y CA4 situaría a unas células aisladas dentro del *hilus* del giro dentado. Aunque estas células no están alineadas con las células piramidales de CA3, están incluidas en el hipocampo propiamente dicho por presentar unas características similares al resto de células piramidales. Recientemente se ha adaptado esta terminología por criterios de patrones de proyección (Ishizuka y col. 1990) y se considera esta área como componente de la capa polimórfica del giro dentado.

2.6.2. Estructura y organización del hipocampo y el giro dentado

La organización estructural del hipocampo y del giro dentado en roedores ha sido estudiada con gran detalle (Ramón y Cajal 1911; Lorente de No 1934; Blackstad 1956; Laatsch y col. 1966; Blackstad y col. 1970; Amaral 1978; Stanfield y col. 1979; Gaarskjaer 1986).

Giro dentado

El giro dentado consta de la *fascia dentata* y el *hilus* y se pueden distinguir 3 capas o *strata* en él:

- *Stratum moleculare*: está situado junto a la fisura hipocampal y contiene las dendritas apicales de las neuronas granulares. A esta capa llegan las fibras de la vía perforante procedentes del área entorrinal lateral. También es la zona de destino de fibras comisurales y asociacionales procedentes del *hilus*. Contiene diversos tipos de interneuronas.
- *Stratum granulosum*: está formado por las células principales del giro dentado, las células granulares, y se sitúa adyacente a la capa molecular. Los axones de estas células forman las fibras musgosas que inervan con colaterales a las células del *hilus* y continúan formando paquetes de fibras

hacia las células principales de la capa CA3 del hipocampo. A lo largo de la superficie de la capa granular se encuentran otros tipos de células, la mayoría de ellas interneuronas inhibitorias.

- *Hilus*: también conocido como capa polimórfica. Su principal componente celular son las células musgosas. Éstas son células piramidales modificadas que se introducen en el giro dentado y que serían las células que conforman la región CA4 hipocampal clásica. También presenta otros tipos celulares minoritarios localizados principalmente cerca del stratum granulosum.

Hipocampo

Las regiones CA del hipocampo propiamente dicho tienen una distribución en capas que de forma general tiene una organización parecida:

- *Alveus*: es la capa más profunda del hipocampo. Por él transcurren los axones mielinizados de las neuronas piramidales.
- *Stratum oriens*: formado por las dendritas basales de las células piramidales y por él cursan axones de las células principales de CA3 (colaterales de Schaffer).
- *Stratum pyramidale*: formado por los somas de las células principales del hipocampo, las células piramidales. En esta capa se encuentran diversos tipos de interneuronas entre los que se encuentran las células en cesto.
- *Stratum lucidum*: esta estrecha capa acelular se encuentra exclusivamente a nivel de CA3. Representa la franja de fibras musgosas que proceden del giro dentado y anatómicamente delimita CA3 de CA2.
- *Stratum radiatum*: contiene las dendritas apicales de las neuronas piramidales y las colaterales de Schaffer de las células piramidales de CA3 que acaban en la parte proximal de las dendritas apicales de las células piramidales de CA1.
- *Stratum lacunosum-moleculare*: es la zona más superficial del hipocampo y contiene la parte distal de las dendritas apicales de las células piramidales. Es el lugar donde los axones de la vía perforante procedentes de la corteza entorrinal medial y el tracto temporo-ammónico contactan con las dendritas de las células piramidales.

2.6.3. Tipos celulares en la formación hipocampal

Los tipos, características y conectividad de las células principales en el hipocampo y el giro dentado (Lopes da Silva y col. 1990; Amaral y col. 1995), así como los de las interneuronas que con ellas se relacionan (Freund y col. 1996) han sido ampliamente estudiados.

Se podría decir que las células principales de la formación hipocampal estarían formando el circuito trisináptico hipocampal cuya primera estación sería el giro dentado (células granulares y células musgosas), la segunda la región CA3 (células piramidales de CA3) y la última la región CA1 (células piramidales de CA1).

- **Células granulares:** son las células principales de la *fascia dentata*. Están densamente empaquetadas en el *stratum granulosum* y tienen un soma pequeño con dos árboles dendríticos dirigidos hacia el *stratum moleculare*. Los axones de las células granulares surgen del polo del soma opuesto a los árboles dendríticos y se denominan fibras musgosas. Conectan con las dendritas proximales de las células piramidales de CA3 formando los característicos terminales musgosos, concentrados en el *stratum lucidum* de CA3.
- **Células musgosas:** son las células “principales” de la capa polimórfica del giro dentado. Lorente de No acuñó la terminología CA4 confundiendo con neuronas piramidales desplazadas. De hecho comparten características electrofisiológicas y neuroquímicas con las células piramidales de CA3. Se caracterizan por tener una elevada densidad de espinas dendríticas así como excrescencias espinosas en el soma y en el tramo proximal del árbol dendrítico. Sus proyecciones se circunscriben al *hilus* sin invadir CA3.
- **Neuronas piramidales CA3/CA2:** comparten, en cierta medida, las características morfológicas de las neuronas piramidales de CA1 aunque presentan cuerpos celulares un poco más grandes. Los axones de las neuronas piramidales de CA3 envían colaterales hacia la región CA1 (colaterales de Schaffer).
- **Neuronas piramidales CA1:** estas células presentan un gran árbol dendrítico apical a nivel del *stratum radiatum*, donde contactan las

colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de CA3, y un árbol dendrítico basal extendido en el *stratum oriens* que en ocasiones alcanza el *alveus*. Algunas de las ramas del árbol dendrítico apical inervarían el *stratum lacunosum-moleculare* llegando incluso a la fisura hipocampal.

Neuroquímicamente este circuito intrahipocampal, formado por las células principales, tiene una naturaleza excitadora y usa el glutamato como neurotransmisor. A su vez, está modulado por las aferencias de otras zonas cerebrales de diferente naturaleza neuroquímica (figura 9) y por los otros tipos celulares de la formación hipocampal. Estos se distribuyen por todas las capas y regiones del hipocampo y se consideran neuronas inhibitoras de circuito local o interneuronas puesto que en su mayoría presentan inmunorreactividad para GABA. Dependiendo del criterio utilizado se han clasificado estas interneuronas en diversas categorías, llegando a solaparse los diferentes subgrupos, lo que indica la compleja heterogeneidad de esta población celular.

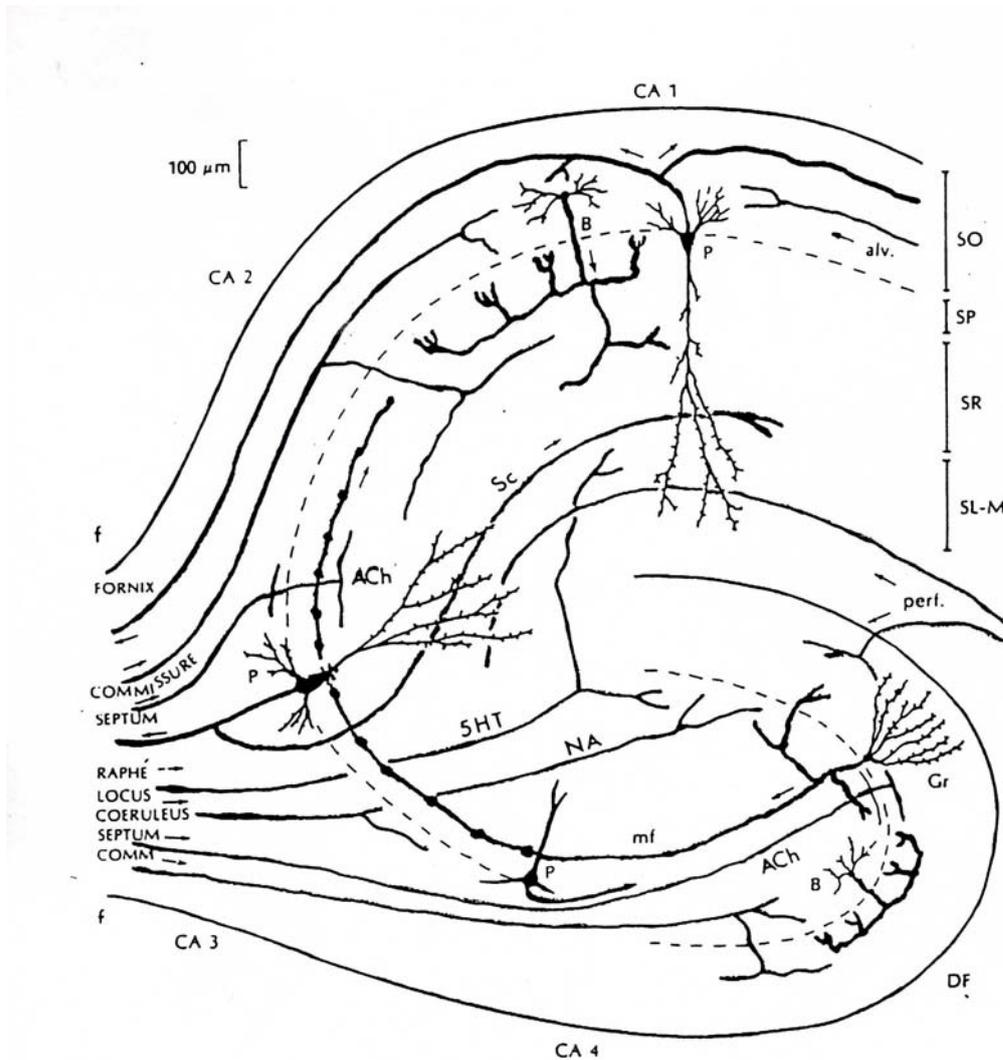


Figura 9. Representación esquemática de la neuroquímica de las fibras aferentes hipocampales. El circuito trisináptico hipocampal está formado por conexiones glutamatérgicas y la gran mayoría de las interneuronas intrahipocampales son GABAérgicas. A estos neurotransmisores hay que añadir la serotonina (5HT) procedente de los núcleos del rafe, la noradrenalina (NA) procedente del *locus coeruleus*, y la acetilcolina (ACh) procedente del *septum medial* (complejo de la banda diagonal).

En el presente trabajo se han realizado cultivos primarios de esta estructura, por lo que hay que tener en cuenta que las características citoarquitectónicas y morfológicas se han perdido. Es por ello por lo que en adelante, el criterio de clasificación de los distintos subtipos celulares será por el principal neurotransmisor sintetizado y liberado. Es decir, nos referiremos a las células principales como células glutamatérgicas y a las interneuronas como células GABAérgicas.

2.7. Receptores de Glutamato

La sinapsis glutamatérgica constituye el sistema de neurotransmisión rápida más abundante en el Sistema Nervioso Central de los vertebrados, siendo el glutamato el principal neurotransmisor excitador del sistema. La primera demostración de que el glutamato podía actuar como un agente excitador se remonta a los años 50 del siglo pasado cuando el profesor Takashi Hayashi observó que una inyección directa de glutamato monosódico (1-2 M) en la corteza motora producía convulsiones tipo clónicas con muy poco tiempo de latencia (Hayashi 1954). Sin embargo no fue hasta 1984 que se demostró que cumplía con los criterios necesarios para ser considerado como neurotransmisor (Fonnum 1984).

Varios motivos han impulsado el gran avance producido en el conocimiento molecular, bioquímico, farmacológico y fisiológico de este sistema de neurotransmisión: por un lado, se sabe que los cambios duraderos en la eficacia de la transmisión glutamatérgica es un aspecto fundamental de los procesos de plasticidad sináptica que son el sustrato bioquímico de la memoria y el aprendizaje; por otro, también se ha relacionado la degeneración y muerte neuronal patentes en diversas enfermedades neurológicas (isquemia cerebral, Alzheimer, Parkinson...etc) con niveles anormalmente elevados de este neurotransmisor en el espacio extracelular.

Además de mediar la neurotransmisión excitadora, el glutamato ejerce una pléyade de funciones adicionales entre las que se encuentran (Michaelis 1998):

- Actúa como estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario.
- Intermedia en procesos de migración neuronal.
- Produce cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas.
- Participa en el crecimiento y guía axonal además de promover la formación de nuevas sinapsis.
- Promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales.
- Juega un papel protagonista en procesos de muerte neuronal y degeneración.

2.7.1. Tipos de Receptores de Glutamato

Los numerosos y diversos efectos promovidos por la acción del glutamato tiene su explicación en la gran variedad de estructuras moleculares de los receptores que son activados tras su liberación en una terminación sináptica. Éstos han sido clasificados según características farmacológicas y electrofisiológicas en dos tipos (Watkins 1981):

1. Receptores Ionotrópicos: forman un canal iónico activado por ligando y su activación desencadena la apertura del poro y el consiguiente incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana neuronal a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Atendiendo a sus propiedades farmacológicas (ligando selectivo que los activa) los receptores ionotrópicos pueden subdividirse en:
 - i. Receptores AMPA. Son activados por α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4-propionato.
 - ii. Receptores Kainato. Presentan sensibilidad selectiva al ácido kaínico
 - iii. Receptores NMDA. Se activan por N-metil-D-aspartato.

2. Receptores metabotrópicos (mGluR): Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G cuya activación promueve la señalización por segundos mensajeros intracelulares (AMPc , IP_3 , Ca^{2+} ...) y la regulación de la actividad de diversas proteínas por fosforilación de las mismas. Hasta la actualidad se han caracterizado 8 subtipos de mGluR, que se engloban en tres grupos funcionales (Kendall 1993; Nakanishi y col. 1994) acorde a su homología de secuencia de aminoácidos, farmacología y vía de transducción de señales. Estos son:
 - i. mGluR del grupo I (1/5). Aumentan la hidrólisis de fosfoinositósidos.
 - ii. mGluR del grupo II (2/3). Inhiben la formación de AMPc .
 - iii. mGluR del grupo III (4/6/7/8). Inhiben la formación de AMPc .

Figura 10: Representación esquemática de una sinapsis glutamatérgica. Se representan tanto las terminaciones presinápticas como la postsináptica, ambas acompañadas de procesos gliales que participan directamente en la eliminación del glutamato de la hendidura sináptica, con el objeto de finalizar la señalización mediada por el glutamato liberado. Así pues este glutamato será recaptado por un transportador (EAAT) y transaminado a glutamina que se intercambia por un antiportador de cistina (XC); una vez liberado al medio extracelular es recogido por la neurona que lo convierte de nuevo en el neurotransmisor fisiológico glutamato por medio de la acción de la glutaminasa. El glutamato se carga en las vesículas que se disponen a ser liberadas cuando el estímulo apropiado alcanza la terminación (potencial de acción). Una vez liberado se une a los receptores postsinápticos (ionotrópicos y metabotrópicos) que determinan la señalización de la neurona postsináptica. Modificado de (Niciu y col. 2012)

En el presente trabajo hemos estudiado la respuesta neuronal ante un estímulo de CS. Al contacto de esta molécula con la superficie de la célula se produce una corriente

postsináptica Na^+ -dependiente que fue caracterizada y se correspondió al tipo AMPA/Kainato (ambos subtipos están implicados). Además, gracias a la monitorización del calcio citosólico en co- cultivos neurona-glia encontramos que la respuesta producida por el CS estaba en parte también mediada por la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I.

Pasaremos ahora a explicar más en profundidad las características moleculares, farmacológicas y fisiológicas de los receptores de glutamato que son relevantes para la interpretación de los resultados de esta Tesis Doctoral.

2.7.2. Estructura molecular de los receptores de glutamato

Los **receptores ionotrópicos** para glutamato son estructuras modulares formadas por el ensamblaje de distintas o las mismas subunidades moleculares cada una de las cuales contiene un dominio N-terminal un dominio de unión al agonista (S1S2), 3 dominios transmembrana (TM1 – TM3) con un bucle intracelular y un extremo C-terminal. En su extremo amino terminal (N-terminal) localizado en la parte extracelular se une el ligando endógeno, mientras que la región carboxi terminal (C- terminal) localizada en el citoplasma que interacciona con dominios PDZ de las proteínas postsinápticas que controlan la localización de los receptores en membrana. En una sinapsis modelo se acepta que los receptores NMDA y AMPA se localizan en la terminación postsináptica mientras que los de Kainato se sitúan tanto pre como postsinápticamente (Engelman y col. 2004). A nivel postsináptico, los receptores ionotrópicos y metabotrópicos presentan una distribución y localización diferenciada, de manera que los receptores ionotrópicos se sitúan preferentemente frente a los sitios de liberación (PSD del inglés PostSynaptic Densities) mientras que los metabotrópicos se concentran principalmente en la región perisináptica y extrasináptica.

Por otra parte los **receptores metabotrópicos** están formados por una única subunidad que presenta 7 dominios transmembrana (M1-M7). La secuencia de aminoácidos que la componen presenta bastante homología entre los miembros del mismo grupo ($\approx 70\%$ homología y 45% entre distintos grupos (Conn y col. 1997), pero carecen de similitud respecto a otros receptores acoplados a proteínas G por lo que, desde el punto de vista genético-evolutivo se les considera una familia de receptores independiente, clasificada

como familia C o 3 (Bockaert y col. 1999). La zona de unión a glutamato se localiza en la región N-terminal (O'Hara y col. 1993; Takahashi y col. 1993). Según el modelo propuesto por O'hara la unión del agonista provocaría el cierre de dos dominios globulares con una región central que hace de bisagra en torno al ligando, pasando el receptor de configuración “abierta” a una conformación “cerrada”. Esta misma región presenta además 4 sitios de glicosilación así como 19 residuos de cisteína altamente conservados, que estarían implicados en la conformación tridimensional al formar puentes disulfuro entre ellos y permitir la dimerización de receptores tipo 1 y 5 (Romano y col. 1995; Kunishima y col. 2000; Romano y col. 2001). Respecto al extremo C-terminal, la región más variable de la estructura, parece ser que es la responsable de la localización subcelular de los mGluRs (Stowell y col. 1999), además de presentar sitios de interacción con otras proteínas que regulan las propiedades funcionales del receptor, como PICK1 (Boudin y col. 2000; Dev y col. 2000) y calmodulina (Minakami y col. 1997; Nakajima y col. 1999) así como sitios de fosforilación para la proteína cinasa A (Cai y col. 2001)(Cai 2001) y para la proteína cinasa C (Gereau y col. 1998; Airas y col. 2001).

2.7.3. Receptores AMPA

Recibe el nombre de su principal agonista, el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolilpropiónico. Estos receptores median la mayor parte de la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC de vertebrados. Se caracterizan por tanto, por tener una rápida activación y una rápida desensibilización (Bettler y col. 1995; Seeburg 1997; Michaelis 1998).

El receptor se forma de la combinación de cuatro tipos de subunidades (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4) para dar lugar a una estructura tetramérica que conforma un canal iónico permeable principalmente a Na^+ y K^+ , aunque los subtipos que no contienen GluR2 también son permeables a Ca^{2+} . Esta subunidad sufre un proceso de edición postranscripcional en el ARNm que provoca un cambio en la secuencia de un solo aminoácido (glutamina por arginina, por eso llamado sitio Q/R) (Bettler y Mülle 1995; Ozawa y col. 1998) que confiere al receptor impermeabilidad al catión Ca. Se

sabe que en el cerebro adulto todo el GluR2 presente se encuentra editado aunque no así en el desarrollo embrionario.

Este receptor presenta además una particularidad adicional y es que antes de traducir la proteína, el ARNm que la codifica es capaz de sufrir un proceso de ajuste génico (del inglés “splicing”) por el que se forman dos variantes: *flip* y *flop* de las subunidades que conforman el receptor viéndose modificada únicamente la parte que se encuentra entre los dominios transmembrana 3 y 4. Cada variante le confiere propiedades cinéticas distintas y cambios en la susceptibilidad a la desensibilización del receptor.

Tanto los receptores de AMPA como los de Kainato presentan activación cruzada por sus respectivos ligando, es decir, el kainato es capaz de activar los receptores AMPA aunque con menor afinidad que la del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolilpropiónico y la del ligando endógeno glutamato (Patneau y col. 1993)

2.7.4. Receptores de Kainato

Al igual que en el caso anterior, el nombre de este receptor procede de su principal agonista, el ácido kaínico. Su papel funcional es poco conocido y su participación en la transmisión sináptica es objeto de debate (Lerma 1997; Rodríguez-Moreno y col. 1998).

Son receptores tetaméricos que forman un canal iónico permeable fundamentalmente a Na y a K aunque algunos subtipos también son permeables a Ca^{2+} . Se forman por la combinación de cinco tipos de subunidades (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2) con tamaños comprendidos entre 93 y 109 KDa.

De forma análoga a la subunidad GluR2 del receptor de AMPA, las subunidades GluR5 y GluR6 sufren un proceso de edición postranscripcional que provoca un cambio de una Glutamina por una Arginina que en este caso no afecta a la permeabilidad al Ca sino a las propiedades rectificadoras del canal. COMPLETAR MEJOR

El papel fisiológico de los receptores de Kainato es menos conocido, aunque se sospecha que podrían estar implicados, a nivel presináptico en la modulación de la transmisión GABAérgica.

2.7.5. Receptor de NMDA

El agonista selectivo que da nombre a este receptor es el N-metil-D-aspartato. La cinética de activación del receptor se caracteriza por poseer una lenta activación y desensibilización. Esto se debe a que en condiciones fisiológicas de reposo la célula presenta un potencial de membrana de unos -60 mV y en estas condiciones el canal se encuentra bloqueado por una molécula de Mg^{2+} . Cuando la célula se despolariza, generalmente tras la activación de los receptores AMPA/Kainato, esta catión es liberado al medio extracelular y el canal pasa a ser completamente funcional.

Es el receptor NMDA el que presenta mayor afinidad por el neurotransmisor fisiológico (EC_{50} 1 μ M) aunque puede ser activado por otros aminoácido dicarboxílicos de cadena corta como el aspartato. Se han identificado 3 familias de subunidades que pueden conformar un receptor funcional: NR1, NR2A-D y NR3A-B. Mientras que la subunidad NR1 se expresa ubícuaamente por todo el tejido nervioso y es imprescindible para la vida (los ratones con ablación génica para NR1 mueren poco después del nacimiento), las subunidades NR2 y NR3 son más específicas de ciertas regiones del SNC y su expresión se encuentra regulada durante las distintas etapas del desarrollo (Monyer y col. 1994).

El ión Zn^{2+} es un importante modulador alostérico que puede ser coliberado en la hendidura sináptica de neuronas glutamatérgicas. Además la subunidad NR2B posee un sitio de unión a hidrogeniones (H^+); este sitio se corresponde con el sitio de unión a poliaminas. A pH fisiológico, la presencia de H^+ disminuye la frecuencia de apertura del canal, sin embargo la unión de moléculas de espermina o espermidina (poliaminas) previene el bloqueo del canal por H^+ (Traynelis y col. 1995). Este mecanismo podría modular la actividad del receptor NMDA en el contexto de distintas situaciones neurofisiológicas como un aumento de la demanda energética por estimulación/actividad excesiva, hipoxia o acidosis. Otro mecanismo de autorregulación negativa del receptor es la inactivación de la subunidad NR1 por la calmodulina dependiente de Ca^{2+} , lo que provoca una disminución en el tiempo y la probabilidad de apertura del canal (Ehlers y col. 1996). Además, la activación de la fosfatasa calcineurina promovida por la calmodulina tras una señal de Ca^{2+} , inhibe la actividad del receptor a través de la defosforilación de sitios concretos de la proteína (Tong y col. 1995)

2.7.6. Receptores metabotrópicos

Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión glutamatérgica estaba mediada únicamente por receptores ionotrópicos. Sin embargo, en 1985, Sladeczek y colaboradores demostraron la presencia de receptores de glutamato insensibles a AMPA, Kainato y NMDA que estimulaban la formación de inositol trifosfato a través de la fosfolipasa C en cultivos neuronales de estriado (Sladeczek y col. 1985). Poco después se observaron efectos similares en rodajas de hipocampo (Nicoletti y col. 1986) y en cultivos de astrocitos. Estos hallazgos llevaron en 1991 a la clonación del primer receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1) (Houamed y col. 1991; Masu y col. 1991) y poco tiempo después, al del resto de los mGluRs (Tanabe y col. 1992; Nakajima y col. 1993; Saugstad y col. 1994; Flor y col. 1995; Saugstad y col. 1997).

Figura 11: Representación de la estructura de los receptores metabotrópicos de glutamato. La activación de este receptor dispara distintas cascadas de señalización intracelular dependiendo del subgrupo al que pertenezcan: o bien activan PLC y señalizan por los segundos mensajeros IP3 y DAG (mGluR grupo I) o inhiben la Adenilato Ciclasa disminuyendo los niveles de AMPc (mGluR grupo II y III). Modificada de http://chrisparsons.de/Chris/images/GPCR_General.jpg

Como ya hemos adelantado, los mGluRs se dividen en 3 grupos:

Los receptores del **grupo I** estimulan la actividad de fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinositósidos, promoviendo la formación de diacilglicerol e IP3 (Manzoni y col. 1990; Schoepp y col. 1990), con la subsiguiente activación de la PKC y liberación de Ca^{2+} desde el retículo, respectivamente. Este grupo está integrado por los receptores mGluR1 y mGluR5, que a su vez presentan variantes de procesamiento alternativo 1 a-d (Pin y col. 1992; Mary y col. 1997), y 5 a-b (Minakami y col. 1995) . Su expresión está patente en diversas regiones cerebrales, en el hipocampo concretamente, mGluR1 aparece en giro dentado y en CA3 (Fotuhi y col. 1994), estando ausente en CA1 donde únicamente se detecta mGluR5 (Lujan y col. 1996). En cuanto a su localización subcelular, los mGluRs del grupo I se expresan tanto a nivel postsináptico como presináptico;

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La MEC del sistema nervioso central representa entre el 15 y el 20% del volumen total del tejido y participa directamente en la formación y estabilización de los contactos sinápticos y en la guía axonal entre otras muchas funciones. Por otro lado, el glucosaminoglicano condroitín sulfato es el más representado de los GAGs en el SNC; su presencia en estructuras como la red perineuronal y en otros proteoglicanos de la MECn (matriz extracelular neural) hacen de esta molécula un interesante protagonista de cualquier trabajo de investigación en el campo de la neurociencia.

De ahí que en la presente tesis doctoral el objetivo principal de la investigación sea

- ✓ **determinar la acción del CS en procesos de neurotransmisión y definir las dianas implicadas en tal efecto**

Para ello hemos utilizado los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata como sistema celular sujeto a estudio y las técnicas de *patch clamp* y de monitorización del calcio citosólico por fluorescencia para dar respuesta a las preguntas planteadas.

Para la consecución de este objetivo principal nos proponemos satisfacer objetivos parciales más concretos, lo cual nos servirá para ir resolviendo cuestiones más fácilmente abordables, cuyo análisis integral nos dará una visión general a fin de poder emitir unas conclusiones satisfactorias.

- 1) **Definir el efecto del CS sobre las corrientes postsinápticas espontáneas.** Mediante el estudio de las CPEs podremos caracterizar el efecto global del CS sobre la neurotransmisión ya que en este fenómeno confluyen numerosos procesos fisiológicos sobre los cuales el CS pudiera ejercer su efecto.
- 2) **Localizar la zona de actuación de CS a nivel sináptico.** La acción ejercida por el CS podría localizarse bien a nivel de la neurona presináptica o de la postsináptica.
- 3) **Averiguar qué tipos de receptores están implicados en la acción ejercida por el CS.** Realizaremos un estudio farmacológico con distintos antagonistas selectivos para receptores de neurotransmisores con el objeto de identificar aquéllos cuya activación es requerida para observar los efectos producidos por el CS.

- 4) **Indagar en los mecanismos efectores promovidos por la activación de los receptores activados por el CS.** Estudiaremos la señalización de calcio citosólica provocada por el CS así como la procedencia del catión. El estudio de estas rutas ayudará a una mejor comprensión del mecanismo de acción del CS.

- 5) **Evaluar el efecto del CS sobre algunos parámetros de viabilidad celular y la relación del mismo con fenómenos de excitotoxicidad por glutamato.** La utilización del neurotransmisor endógeno arrojará luz sobre el efecto del CS sobre estos receptores.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo de neuronas de hipocampo de embriones de rata.

Todos los experimentos realizados durante este trabajo de investigación se han llevado a cabo empleando neuronas de hipocampo disecadas de embriones de rata con 18 días de gestación.

Para la realización de los experimentos se siguieron estrictamente las directrices marcadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la *Universidad Autónoma de Madrid* para el cuidado y la utilización de animales de investigación; directrices que están en conformidad con las marcadas por la Directiva del Parlamento Europeo del 22 de Septiembre de 2010 (2010/63/EU) y con el Real Decreto Español del 10 de Octubre de 2005 (RD 1201/2005).

Las ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague-Dawley fueron mantenidas en una habitación limpia de estabulación con comida y bebida *ad libitum*, y con un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas. En estas condiciones se procedía al cruce de hembras en estado estro con machos reproductores de la misma cepa. La determinación del primer día de gestación se realizó mediante la presencia de tapón vaginal. En el día 18 de gestación se sacrificaron las hembras por decapitación y se extrajeron los embriones mediante cesárea. El número de embriones por cesárea fue de 13 a 17.

Una vez extraídos los embriones, se sumergieron en un tampón fosfato salino (PBS) frío (4°C y sobre hielo) con una composición (en mM): 137 NaCl; 2,7 KCl; 11,6 NaH₂PO₄; 1,47 KH₂PO₄, (pH 7,4 ajustado con NaOH). Se procedió a la decapitación de los animales y la extracción de la masa cefálica tras la separación del hueso en formación mediante el uso de dos pinzas curvas Schreiber (Fridingen, Alemania). Con la ayuda de un estereomicroscopio Leica 6S E (Wetzlar, Alemania) provisto de lámpara de iluminación de luz fría, se separaron los dos hemisferios cerebrales por la cisura interhemisférica y se disecaron los hipocampos en medio PBS frío suplementado con 1mg/ml de albumina de suero bovino (BSA) y glucosa 10 mM.

Una vez disecados los hipocampos se procedió a su digestión enzimática en PBS suplementado (BSA, Glucosa) con 0,5 mg/ml de papaína de *Papaya latex* y 0,25 mg/ml de deoxirribonucleasa I de páncreas bovino (DNAsa). Tras 20 minutos de digestión enzimática a 37°C, se reemplazó la disolución enzimática por medio Neurobasal suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y al que se había añadido con anterioridad 5 ml/l de una mezcla de penicilina/estreptomicina (10000 u/ml, 10000 µg/ml respectivamente), 1 ml/l de gentamicina (50 µg/ml) y 60 mg/ml de L-glutamina.

En este medio se realizó la digestión mecánica del tejido mediante una pipeta Pasteur de vidrio de 150 mm, Normax (Marinha Grande, Portugal), con la punta flameada y con la precaución de no introducir burbujas en el proceso. De esta forma conseguimos una suspensión celular completamente disgregada y con el mayor porcentaje de membranas y células completas.

La suspensión celular resultante se centrifugó durante 4 minutos a 800 r.p.m. (120xg) en una centrífuga TQTECH modelo Unicen 20 (Albacete, España) y tras retirar el sobrenadante, se resuspendió en un medio Neurobasal 0,5% FBS y 2% B27 (suplemento libre de suero para crecimiento y viabilidad de larga duración de neuronas de hipocampo). Se contaron las células de la suspensión en la cámara de Neubauer (0,0025 mm²) y se realizaron los cálculos oportunos para sembrar el número de células adecuada sobre cubreobjetos de cristal de 25 y 15 mm de diámetro dispuestos en placas de cultivo de 6 y 24 pocillos, respectivamente, Con este protocolo experimental se obtienen un total de entre 4 y 5 millones de células.

Los cubreobjetos de vidrio habían sido tratados previamente con una disolución de poli-D-lisina (0,1 mg/ml) cubriendo completamente su superficie (al menos 2h a 37 °C). Tras un par de lavados con agua estéril y secado por evaporación fueron incubados con una solución de extracto de lamina basal comercial MaxGel (Sigma Aldrich-Alemania) que facilitaba la adhesión celular y promovían la emisión de neuritas (Figura XX). Para los experimentos de calcio en poblaciones se procedía al mismo tratamiento sobre las placas de 48 pocillos.

Las diferentes densidades de siembra fueron:

- Cultivo de alta densidad para experimentos de viabilidad celular: 120 000 células/ml; A esta densidad se realizaron los experimentos de calcio en poblaciones.
- Cultivo de baja densidad: 70 000 células/ml; 500 µl por pocillo. A esta densidad de siembra se realizaron los registros de electrofisiología.

Una vez sembradas, las células se mantuvieron en una estufa de cultivo Heal Force modelo HF151UV (Sanghai, China), en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37°C y saturada de humedad. Cada 5-7 días se procedía al reemplazo de la mitad del medio de cultivo por medio Neurobasal 2% B27 fresco. En estas condiciones, la supervivencia celular es de más de 21 días, aunque los experimentos fueron realizados en cultivos de

entre los 9 y 13 días de cultivo *in vitro* que cumplieran los siguientes criterios (ver figura 11):

- 1) Adhesión al sustrato.
- 2) Diámetro del soma de 15-30 μm .
- 3) Presencia de extensiones dendríticas.
- 4) Ausencia de vacuolas intracelulares.
- 5) Cuerpos celulares birrefringentes, con los límites plasmalemales oscuros.

Es importante destacar que puesto que los cultivos de neuronas de hipocampo son de larga duración y son susceptibles de contaminación, el manejo de las células disgregadas y los cambios de medio realizados, se realizaron con material estéril y en el interior de una campana de flujo laminar horizontal Indelab modelo idl96h (Pamplona, España).

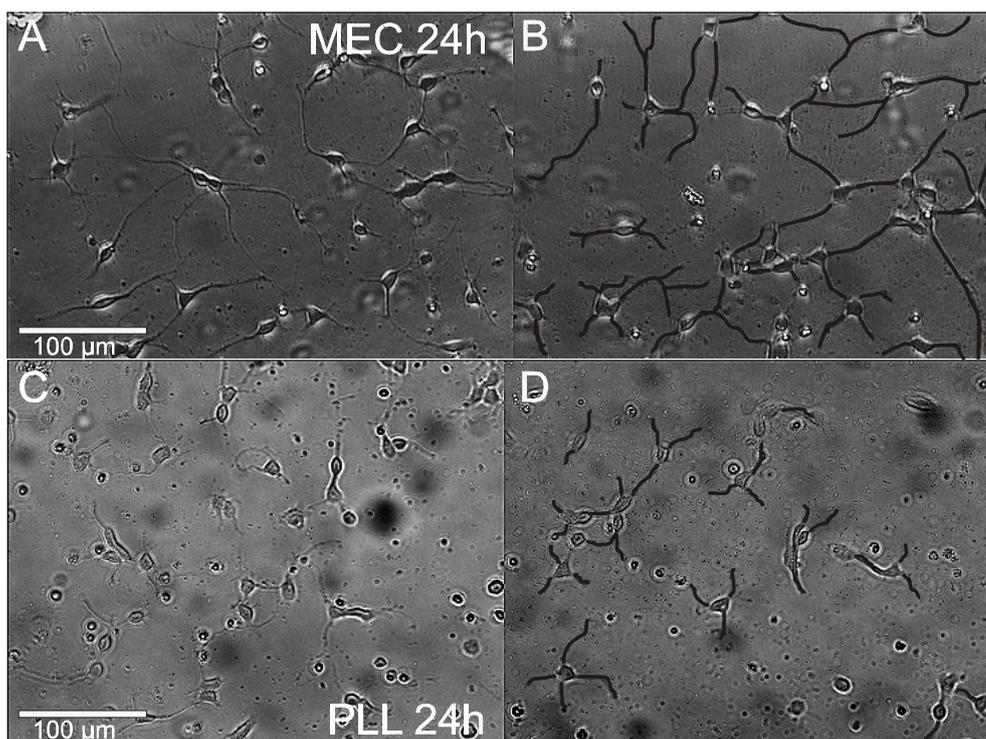


Figura 11. *Micrografías de cultivos de neuronas embrionarias de hipocampo de rata. A y B,* Cultivos de células hipocámpales sobre un sustrato con componentes de la MEC (MaxGel. SigmaAldrich Ref: E0282). *C y D,* Las mismas células sembradas sobre el sustrato habitual de polilisina. Todas las imágenes fueron tomadas a las 24 horas tras la siembra. En las imágenes B y D se remarcan las prolongaciones neuronales con el fin de resaltar la diferencia producida por el sustrato utilizado.

4.4. La técnica de Patch clamp

El proceso histórico hasta el desarrollo de la técnica de *patch clamp* comenzó con el reconocimiento científico de la presencia de fenómenos eléctricos como parte de la fisiología animal. Desde que Luigi Galvani, a finales del siglo XVIII, demostrase la propagación del potencial de acción y propusiese la teoría de la excitación eléctrica (Galvani 1791; Piccolino 1998), esta técnica ha ido perfeccionándose con el desarrollo de microelectrodos y micropipetas (con extremos de 2 a 5 μm) con los que Alan Hodgkin y Andrew Huxley a mediados del siglo XX, pudieron elaborar la teoría iónica para la excitación de membranas (Hodgkin y col. 1939). Sin embargo, el mayor avance en cuanto al conocimiento de la comunicación entre células excitables ha sido el desarrollo de la técnica de *patch clamp* por Erwin Neher y Bert Sakmann tal y como la conocemos hoy día (Hamill y col. 1981).

La capacidad de esta técnica de aumentar tantísimo el ratio señal/ruido eléctrico, permitió el estudio directo del flujo de corriente a través de un solo canal iónico, abriendo paso a la electrofisiología moderna para el estudio de los mecanismos de transducción de las señales eléctricas mediante el análisis cinético de los flujos iónicos a través de las membranas celulares.

La técnica de *patch clamp* se basa en la distribución asimétrica de iones a ambos lados de cualquier membrana de una célula viva: ello establece una diferencia de potencial (V_m) entre ambos compartimentos intra y extracelular. Esta característica es debida a la función de las bombas iónicas insertadas en la membrana y a las características de impermeabilidad selectiva a distintos iones de la misma.

Aplicando la ley de Ohm podemos comprender las distintas modalidades de la técnica. La referida ley, describe la relación:

$$I = V / R$$

donde I es la intensidad de la corriente medida en amperios (A); V es el voltaje medido en voltios (V) y R es la resistencia medida en ohmios (Ω). En nuestro sistema la resistencia es constante, por tanto, en la modalidad de fijación de voltaje podemos medir la corriente a través de la membrana y por el contrario, la modalidad de fijación de corriente permite la medida de los cambios en el voltaje.

En sí misma, la técnica de *patch clamp* es una variación de la técnica de fijación de voltaje y consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño parche de membrana. De este modo, si en respuesta a un determinado estímulo se produce un

trasiego de cargas a través de los diferentes canales y/o receptores presentes en el parche de membrana, la corriente que se necesita inyectar para mantener el V_m fijado sería equivalente al movimiento de cargas a través del parche de membrana.

Esta técnica emplea un único electrodo que simultanea a elevada frecuencia el registro de voltaje (con el objeto de mantenerlo fijo) y el registro de corriente (la inyectada por el electrodo en la célula para mantener fijo V_m). La ventaja que ofrece esta técnica, frente a la de fijación de voltaje por doble electrodo (Cole 1949; marmont 1949 Hodgkin et al 1952), posibilita acceder a células de un tamaño considerablemente menor, en las que sería imposible introducir dos electrodos, además presenta una buena relación señal/ruido lo que permite discriminar corrientes microscópicas del orden de pA.

El proceso para la correcta ejecución de esta técnica comienza con la formación de un sello de alta resistencia entre el electrodo de registro y la membrana celular. Para ello, hacemos uso de unas pipetas de borosilicato estiradas al fuego y rellenas de una solución específica, en cuyo interior hacemos introducir el electrodo de registro (en este momento, cuando la pipeta toca la solución del baño la resistencia eléctrica se encuentra entre 2-5 M Ω). Entonces, la acercamos a la membrana de la célula hasta tocarla (10-50 M Ω de resistencia) que es cuando, ejerciendo una pequeña presión negativa hacemos aumentar la resistencia del orden de 1000 veces hasta alcanzar los 10-100 G Ω . Estos sellos son conocidos como gigasellos, que reducen el ruido y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, permitiendo únicamente que las corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medición de corriente, que se cierra con la presencia de un electrodo de referencia que está en contacto con el líquido extracelular. De este modo se consigue fijar el potencial de membrana en el

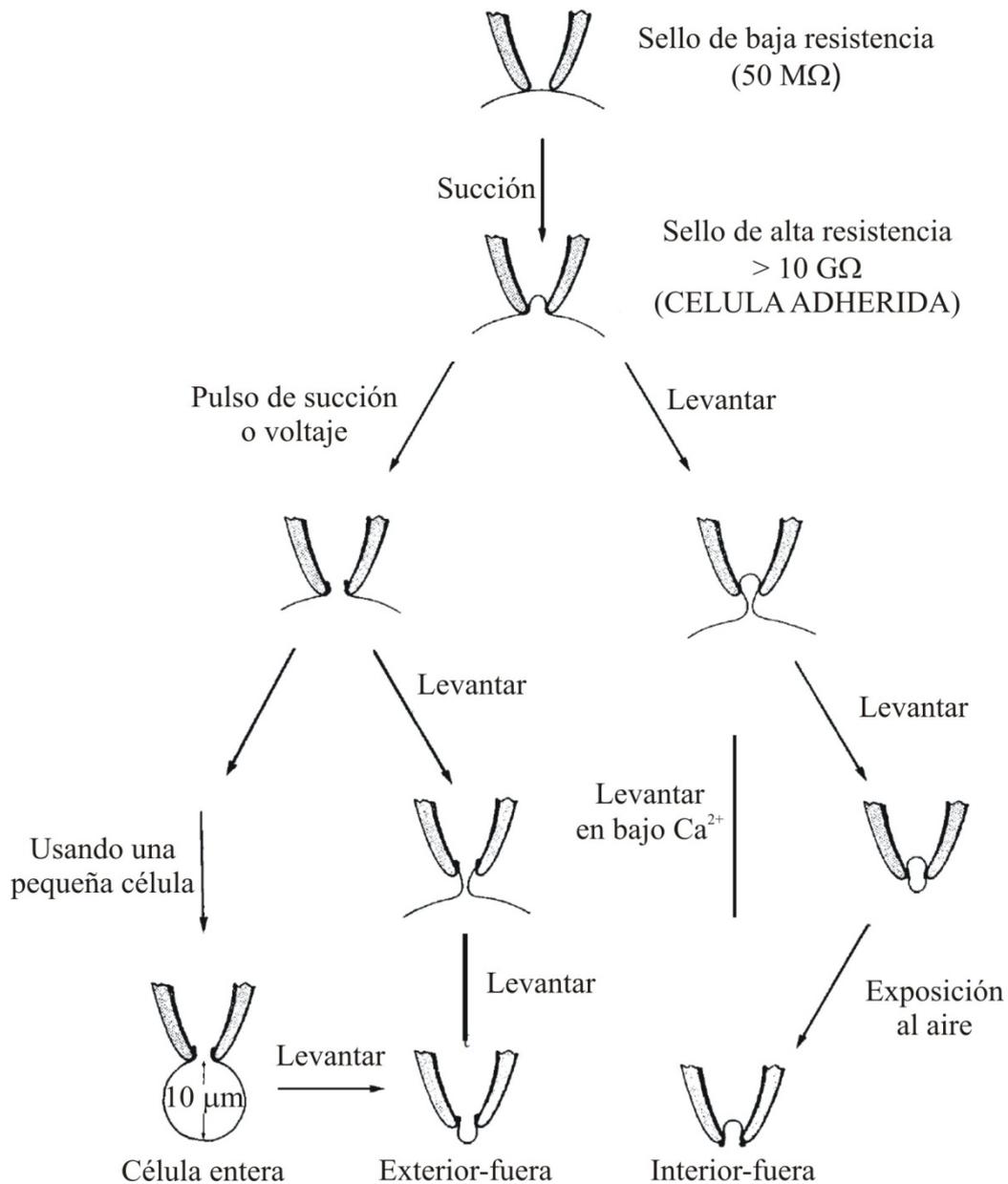


Figura 12. Representación esquemática de los procedimientos que conducen a las configuraciones de registro. Las cuatro configuraciones de registro son: célula adherida, registro de célula entera, parche exterior-fuera y parche interior-fuera. Modificada de Hamill et al., 1981.

parche de membrana, consiguiéndose así la configuración base de la técnica de *patch clamp*, la célula adherida.

La particularidad de los gigasellos conseguidos con esta técnica es que son muy estables desde un punto de vista mecánico. Esta peculiaridad permite la manipulación de los mismos y por tanto la obtención de las diferentes configuraciones que esta técnica

admite: parche *in situ* o célula adherida, célula entera, parche escindido exterior-fuera y parche escindido interior-fuera (ver figura 14).

En la elaboración de los experimentos de esta tesis, la configuración de la técnica de *patch clamp* usada ha sido la de célula entera y una modificación de la misma que se denomina parche perforado (Horn y col. 1988).

Partiendo de la configuración de célula adherida aplicamos una pequeña succión o presión negativa al interior de la pipeta que puede provocar la ruptura del parche de membrana que hay bajo los bordes de la pipeta, produciéndose la comunicación del ambiente intracelular con el contenido de la pipeta. Al ser el contenido de la pipeta un volumen mucho mayor que el del citoplasma, permite al investigador controlar la composición iónica tanto del exterior celular (líquido de perfusión), como la del interior, por lo que se pueden diseñar los protocolos específicos para la lectura de actividad del sistema deseado. Sin embargo, esta gran ventaja es a su vez la principal limitación de esta configuración, puesto que se produce un lavado de componentes intracelulares, que puede conllevar un lavado de la señal obtenida o una pérdida de componentes moduladores y segundos mensajeros.

Para evitar este inconveniente existe una variación de la configuración de célula entera que se denomina “parche perforado” (Horn y Marty 1988). En esta modalidad se evita el lavado de componentes citoplasmáticos, por lo que se puede realizar estudios de modulación postsináptica por segundos mensajeros y la obtención de registros duraderos (hasta 1 hora). Para conseguir esta configuración es necesario añadir en el líquido de la pipeta un antifúngico (anfotericina B en nuestro caso), llegar a la situación de célula adherida y esperar que el antifúngico forme poros en la membrana, permeables a iones monovalentes e impermeables a iones multivalentes y a moléculas no electrolíticas, lo que posibilita el acceso eléctrico y el control o bien del voltaje o de corriente al igual que en la configuración de célula entera. Por este mismo motivo, el investigador no puede controlar la composición del lado intracelular del circuito en esta configuración.

4.2.1. Registros electrofisiológicos

Todos los registros obtenidos tanto en la configuración de fijación de voltaje como en la de fijación de corriente han sido realizados con la variante de “parche

peforado”, aunque los registros de corrientes también han sido reproducidos en la configuración de célula entera.

En el momento de llevar a cabo los experimentos se colocó el cubreobjetos en una cámara de fabricación casera desarrollada por Segainvex (Madrid, España); esta cámara se situaba en un microscopio invertido (NIKON TMD) con 3 objetivos intercambiables 10x, 20x y 40x. Todo esto descansaba sobre una mesa antivibratoria TMC series 63-500 que ofrecía una superficie de trabajo libre de vibraciones. Estos sistemas actúan como filtros, amortiguando un alto porcentaje de la amplitud de aquellas vibraciones que llegan al sistema, con una eficacia de aislamiento de las vibraciones de 5 Hz de un 85 % en la vertical y de un 90 % en la horizontal. Nuestro equipo de patch-clamp se encontraba a su vez en el interior de una jaula de Faraday de fabricación casera realizada por Segainvex; esta caja metálica protege de los campos eléctricos estáticos, en el interior de ésta no hay campos eléctricos ya que ninguna carga puede atravesarla, protegiendo a nuestros dispositivos de cargas eléctricas exteriores y de la interferencia del ruido eléctrico en el registro.

Una vez localizada la célula bajo el objetivo de 40X se situó el sistema de perfusión que consta de una pipeta en la que confluyen 5 vías reguladas por gravedad e intercambiadas por un sistema de electroválvulas solenoides excluyentes (The Lee Company, Westbrook, CT, USA) operadas manualmente a través de un controlador (Segainvex, Madrid, España). La distancia sobre la célula a estudio fue aproximadamente de 100 μm y la velocidad aproximada de flujo fue de 1 ml/min, estimándose el total recambio de disoluciones experimentales en 50 ms.

Con este sistema se bañaba la célula con tampón salino Tyrode compuesto (en mM) de : 137 NaCl, 1 MgCl₂, 5.3 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES y 10 D-glucosa (pH ajustado a 7,4 con NaOH). Los fármacos eran preparados también en este mismo tampón. Los experimentos fueron realizados a una temperatura de 22-24°C.

Por otro lado, la pipeta de *patch* se montó sobre el cabezal de un preamplificador de *patch clamp* EPC-10 (HEKA Electronic, Lambrecht, Alemania). Esta pipeta se fabricó a partir de capilares de borosilicato, modelo Kilmax-51 (Kimble Kontes, México). Con la ayuda de un estirador vertical Narishige, modelo PC-10 (Tokio, Japón), se afilaron los capilares en dos pasos, puliéndose posteriormente la punta con ayuda de una microforja Narishige, modelo MF-830 (Tokio, Japón). Con este protocolo conseguimos que la punta de los capilares tuviese un diámetro aproximado de una micra (1 μm). Una vez rellenados de la disolución intracelular adecuada para cada

grupo experimental (véase en detalle a continuación), estos capilares o pipetas alcanzaron una resistencia entre 3-4 M Ω .

El posicionamiento del sistema de perfusión así como el de la pipeta de registro se controlaron mediante el uso de micromanipuladores hidráulicos Narishige (Tokio, Japón).

En cuanto al sistema de adquisición de datos para los registros de transmisión sináptica y corrientes iónicas por un lado y registros de potencial de membrana y potenciales de acción por otro, se utilizó el software de HEKA Elektronik PULSE (HEKA Electronic, Lambrecht, Alemania). Este software permite cancelar los transientes capacitativos y compensar electrónicamente la resistencia en serie. Los datos experimentales se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se filtraron a 1-2 kHz. Los registros con una corriente de fuga superior a 50 pA o con una resistencia de acceso superior a 20 M Ω fueron descartados.

4.3. Técnicas de Fluorescencia

4.3.1. Inmunocitoquímica del cocultivo de neuronas/glía de hipocampo

Para la caracterización celular se emplearon cultivos de 10 días de edad sobre cubres recubiertos con polilisina y extracto de lamina basal tal y como describimos en el apartado 1 de esta sección. La fijación se realizó sustituyendo el medio de cultivo por 1 ml de paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 minutos. Seguidamente se permeabilizaron las células con tritón al 0,1% en PBS durante 15 minutos y se siguió con el bloqueo inespecífico de los antígenos usando suero de cabra al 4% en PBS durante 2 horas. Se incubaron las células durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios procedentes de la casa comercial SigmaAldrich para la proteína asociada a microtúbulo (MAP, por sus siglas en inglés) que identifica neuronas al igual que la proteína NeuN (Neurofilamento). Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:500. Para la identificación de astrocitos se utilizó la tinción contra la proteína glial ácida fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés). Además se visualizó la red perineuronal en nuestra preparación in vitro usando un anticuerpo contra CS a una dilución de 1:500 también. Tras este tratamiento los anticuerpos secundarios conjugados con una fluoróforo (Alexa Fluor, Molecular Probes) y a una dilución 1:1000 en PBS se

incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto, los cubres se montaron sobre portaobjetos de cristal con una gota (5 μ l) de una solución al 50% PBS-glicerol. Se realizaron además los pertinentes controles negativos incubando la preparación exclusivamente con el anticuerpo secundario.

4.3.2. Medida de la concentración citosólica de Ca^{2+} : Sondas fluo4 AM y fura 2 AM

Las sondas fluorescentes sensibles al Ca^{2+} son fluoróforos que pueden unirse de forma selectiva y reversible al catión Ca^{2+} , como resultado de lo cual varían sus propiedades ópticas y cambian su espectro de excitación o de emisión o bien la intensidad de la señal de fluorescencia.

El fenómeno de fluorescencia se produce cuando un electrón en un orbital de un átomo absorbe toda la energía de una determinada longitud de onda, saltando a otros orbitales de mayor energía. Es una situación inestable, y el electrón vuelve rápidamente a su orbital emitiendo la mayor parte de la energía que ha absorbido en forma de fluorescencia pero siempre de menor energía (mayor longitud de onda) que la que utilizó para escapar de su orbital. Aprovechando este fenómeno, se han desarrollado los diferentes fluorocromos o fluoróforos. Para utilizarlos necesitamos una lámpara fuente que emita luz ultravioleta y luz visible. Para excitar el fluoróforo necesitamos un filtro de excitación que seleccione la longitud de onda específica para cada entidad molecular fluorescente.

Los fluorocromos se organizan en diversas familias atendiendo a su naturaleza proteica (proteínas fluorescentes: GFP (verde), YFP (amarillo) y RFP (rojo)) o no proteica, que son fluoróforos orgánicos pertenecientes a las siguientes familias químicas importantes: 1) Derivados de xanteno (fluoresceína, rodamina); 2) Derivados de cianina (indocarbocianina, oxacarbocianina); 3) Derivados de naftaleno (prodan, dansilo); 4) Derivados de cumarina; 5) Derivados de oxadiazol; 6) Derivados de pireno; 7) Derivados de oxacina (rojo nilo, oxacina170); 8) Derivados de acridina (proflavina, naranja de acridina); 9) Derivados de arilmetilo (auramina, verde malaquita); 10) Derivados de tetrapirrol (porfina, bilirrubina).

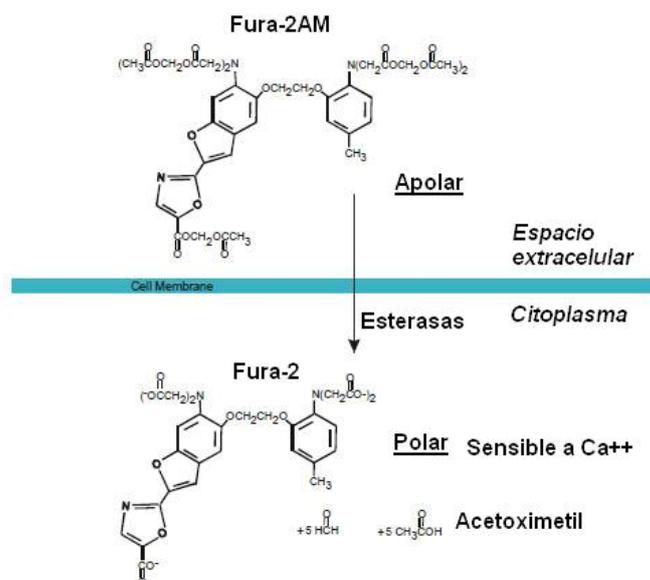


Figura 13. Esquema de la estructura del fluoróforo fura-2-acetoximetil éster (fura-2AM) y de cómo éste atraviesa la membrana celular. La sonda fura-2AM es un derivado permeable a la membrana plasmática del indicador de calcio ratiométrico fura-2. Cuando se añade a las células, el fura-2AM es capaz de atravesar la membrana celular ya que los grupos carboxilo de esta molécula se modificaron por un grupo acetoximetil-éster perdieron así la carga negativa que les impediría atravesarla; una vez en el citoplasma, los grupos acetoximetilo se eliminan mediante esterasas celulares. La eliminación de los ésteres de acetoximetilo regenera fura-2 que se une a iones de calcio libre intracelular.

En la presente tesis doctoral hemos utilizado 2 sondas de fluorescencia: la sonda Fluo4 AM y la sonda ratiométrica Fura 2 AM. Además nos hemos servido de una proteína trasfectada en nuestro cultivo para monitorizar la concentración de Ca²⁺ del retículo: este es el camaleón reticular D1.

4.3.3. Medida de calcio en poblaciones con la sonda Fluo4 AM

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos negras a una alta densidad. Tras retirar el medio se incubaron con 50 µl de medio neurobasal en presencia

de la 4 μM de la sonda fluorescente. Tras este periodo se lavaron los pocillos con solución salina Krebs-Hepes (composición en mM: NaCl 144; KCl 5.9; MgCl_2 1,2; glucosa 11; Hepes 10; pH 7,4).y se añadían 175 μl de los compuestos disueltos en el mismo tampón. El sistema de medida de fluorescencia consistía en un equipo Fluostar acoplado a un ordenador. La longitud de onda a la que se excitaba la sonda era de 488 nm y se midió la emisión a 522 nm. La frecuencia de adquisición de datos varió de 0,5 a 5 Hz.

Este equipo nos permite inyectar una solución de estímulo en cada pocillo. Tras la puesta a punto del protocolo se decidió inyectar un volumen de 25 μl de la solución de estímulo 8X (8 veces concentrada) así al diluir ese volumen en los 175 μl del pocillo la concentración final era la deseada 1X. Como blancos de estímulo se utilizaron células sin cargar con la sonda.

4.3.4. Medida de calcio en célula única con la sonda fura 2AM

Las células fueron incubadas durante 1 h a 37 °C en medio Neurobasal que contenía la sonda de calcio fura-2AM a la concentración de 10 μM . Después de este periodo de incubación, los cubres de vidrio que contenían las células fueron montados sobre una cámara, y las células fueron perfundidas de forma continua con una solución de Tyrode compuesta de (en mM): 137 NaCl, 1 MgCl_2 , 5.3 KCl, 2 CaCl_2 , 10 HEPES y 10 glucosa, pH 7.3 ajustado con NaOH 1 M. El equipo que hemos utilizado para realizar los registros de fluorescencia estaba compuesto de un microscopio de luz invertida Leica DMI 4000 B (Leica Microsystems; Barcelona, Spain) equipado con un objetivo de aceite de inmersión (Leica 40X Plan Apo; apertura numérica 1.25).

Una vez que las células fueron colocadas sobre el microscopio, fueron continuamente bañadas por medio de un sistema de perfusión rápida con cinco vías de entrada y una única vía común de salida compuesta por un tubo Tygon® R3603 de 0.28 mm de diámetro cuya boca de salida se aproximaba a una distancia de entre 100-200 μm de las células. Las células fueron perfundidas con la solución de Tyrode o los distintos estímulos a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; con la ayuda de un controlador de electroválvulas controlábamos la salida de flujo de cada una de las 5 vías que utilizábamos para nuestros experimentos.

La sonda ratiométrica fura-2AM fue excitada alternativamente a 340 ± 10 nm y 387 ± 10 nm usando una lámpara de xenón Küber CODIX (Leica). La fluorescencia emitida fue recogida a través de un filtro de emisión de 540 ± 20 nm y medida con un dispositivo de cámara digital acoplado a un contador de intensidad de carga (controlador de cámara Hamamatsu C10600 orca R2; Japan). Las imágenes de fluorescencia fueron generadas a intervalos de 1 s, almacenadas digitalmente y analizadas utilizando un software LAS AF (Leica; Barcelona, Spain).

4.3.5. Medida de la concentración de calcio en el retículo con el camaleón D1

Para la realización de estos experimentos se transfectaron las células con el plásmido que contiene en un casete de expresión que codifica para la proteína camaleón D1. Tras 7 días en cultivo se añadieron 2 μ g de ADNc del plásmido que fue un generoso regalo del Dr. Roger Tsien. Tras este tratamiento se le cambió el medio a las células y se esperó 48 horas para su óptima expresión y la realización de los experimentos. A ese tiempo, se tomaron los cubres con las células y se colocaron en una camarita de perfusión sobre el objetivo 40X (NA: 0,9) de un microscopio de fluorescencia invertido (BX51WIF, Olympus). Para la medida de intensidades de la señal de fluorescencia se excitó la proteína a 440 nm y se midió la emisión a 512 y 480 nm. La rueda de filtros (440DF20), los filtros dicróicos (455DRLP) y los filtros de emisión (480DF30 y 535DF25) se adquirieron en Omega Optical and Chroma Technologies (Brattleboro, VT, USA). Las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD (Sony). La sincronización de la cámara y la adquisición de datos brutos se realizaron con el software Cell R de Olympus (versión 2.6). El cociente de fluorescencia 512/480 se calculó y normalizó con el software MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EE.UU). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C).

4.4. Disoluciones

4.4.1. Disoluciones extracelulares empleadas

La disolución experimental de trabajo fue la anteriormente descrita como tampón Tyrode: en mM, 137 NaCl, 1 MgCl₂, 5.3 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES y 10 D-glucosa , pH ajustado a 7,4 con NaOH.

A esta disolución se le aplicaron diversas modificaciones dependiendo del diseño experimental sujeto a estudio pero compartiendo la misma base química.

Para la caracterización iónica de las corrientes provocadas por CS se procedió a la sustitución de los 137 mM de NaCl por 274 mM N-metil-D glucamina. Para los experimentos de digestión del CS con la enzima condroitinasa ABC se utilizó un tampón tyrode con las siguientes modificaciones: 87 mM NaCl, 50mM Acetato de sodio y sin KCl. El CS a 10 mM fue incubado durante distintos tiempos con ChaseABC a 37 °C a 50 mU/ml.

Para el discernimiento de la procedencia de la señal provocada por CS se añadió tetrodotoxina (TTX), (Tocris, Bristol, Inglaterra) a una concentración de 1 μM. Esta toxina, procedente del hígado del pez globo (*Takifugu sp.*) bloquea los canales de Na⁺ inhibiendo la propagación de potenciales de acción y por ende la comunicación sináptica en el cultivo permitiendo únicamente la liberación estocástica de neurotransmisor.

4.4.2. Disoluciones intracelulares empleadas en la elaboración de los experimentos.

La técnica de *patch clamp* permite al investigador controlar la composición iónica del interior celular. Se han utilizado distintas disoluciones intracelulares en la evaluación de ciertos grupos experimentales que a continuación se detallan.

En todos los registros realizados para medición de los cambios en el potencial de membrana y de las corrientes provocados por CS en la misma célula se utilizó la siguiente disolución intracelular (en mM): 135 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA 5 Mg-ATP y 0,3 Na-GTP (pH ajustado a 7,3 con KOH) en configuración de parche perforado. El agente permeabilizante usado fue la anfotericina B en una concentración de 50-100 μg/ml (Watsky y col. 1991). La anfotericina B fue disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 mg/ml y almacenada en pequeñas

alícuotas a -20°C . La concentración final de DMSO no sobrepasaba el 1%. Esta disolución intracelular se preparaba nueva cada dos horas para asegurarnos del perfecto funcionamiento del antifúngico, además para facilitar el sello se tomaba la precaución de sumergir la punta de la pipeta en solución fresca sin anfotericina antes de proceder al rellenado con la disolución con anfotericina. Los registros efectuados en esta configuración comenzaron cuando la resistencia de acceso al interior celular fue menor de $15\text{ M}\Omega$, lo cual suele ocurrir tras 10-15 minutos de haber efectuado el gigasello.

Para los registros de aislamiento de las corrientes GABAérgicas la solución intracelular que se utilizó contenía 0 mM de Cl^- : 160 Cs -metanosulfonato, 10 EGTA , 5 Mg-ATP , $0,3\text{ Na-GTP}$, 10 HEPES ajustado a $\text{pH } 7,3$ con CsOH .

4.5. Compuestos químicos

Los componentes químicos utilizados en este trabajo de investigación se obtuvieron de diferentes casas comerciales:

- Sigma-Aldrich (Madrid, España): BSA, papaína, deoxirribonucleasa I, poli-D-lisina, MaxGel, L-glutamina, bicuculina, CNQX, AP-5, MK-801, U73122, U-73343, anfotericina B, y todos los compuestos utilizados para la realización de las diferentes disoluciones.
- GIBCO-Invitrogen (Barcelona, España): DMEM, penicilina/estreptomicina, gentamicina, neurobasal y B27.
- Tocris (Bristol, Inglaterra): TTX, GYKY53655, Kainato, AMPA, LYxxxx, YMxxx, MTEP
- Paa (Pasching, Austria): FBS.

4.6. Análisis estadístico y cálculos matemáticos

Los datos representados se expresan como la media \pm el error estándar de la media (E.S.M.) del número de células reseñado (n). Estas células provienen de al menos 3 cultivos diferentes ($N > 3$). Antes de realizar cualquier análisis se estudió la distribución de los datos y su ajuste a una distribución normal mediante la realización del test de Kolmogorov-Smirnov y el test de homogeneidad de varianzas aplicando un

test de Levene. Si la distribución era normal y el número de grupos experimentales más de dos se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de un un test *post hoc* Newman-Keuls. Si las varianzas no eran homogéneas y los datos no se ajustaban a una distribución normal, se emplearon los siguientes test no paramétricos: Test de Mann-Whitney para comparar dos grupos y test de Kruskal- Wallis para comparar más de dos grupos seguido de un *post-hoc* apropiado para averiguar entre qué grupos se encuentran las diferencia y que está indicado en el apartado correspondiente. En todos los casos se estableció que existían diferencias estadísticas significativas cuando el valor de P en estos test era inferior a 0,05 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). El análisis de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.0.

RESULTADOS

Efecto de la aplicación de condroitín sulfato sobre las corrientes postsinápticas espontáneas y el disparo de potenciales de acción en neuronas de hipocampo en cultivo

Una neurona en cultivo recibe constantemente estímulos de otras neuronas que conectan con ella. En los cultivos de neuronas de hipocampo de rata, estas señales se traducen como excitaciones (señales glutamatérgicas) o inhibiciones (transmisión GABAérgica) que, dependiendo del modo de la técnica de *patch clamp* utilizado para su registro, desencadenarán diferentes respuestas. En el caso de los registros efectuados en el modo fijación de voltaje, estudiamos las corrientes postsinápticas (CP) que se corresponden tanto a corrientes postsinápticas de naturaleza glutamatérgica o excitadora (EPSCs) o de naturaleza GABAérgica o inhibitoras (IPSCs). En nuestro caso, estas corrientes fueron de entrada, debido a los potenciales de equilibrio de los iones implicados y la solución intracelular empleada.

En el modo fijación de corriente, la sumación de las señales excitadoras e inhibitoras variará el potencial de membrana (V_m) de la célula registrada, produciendo un potencial de acción (PA) si esta sumación eleva el V_m por encima del umbral de disparo.

Históricamente en nuestro laboratorio, se han estudiado los mecanismos subyacentes a la neurotransmisión fijando el voltaje celular por debajo del potencial libre en reposo del tipo celular a estudio. En el caso concreto del estudio de la transmisión sináptica en células de hipocampo de rata en cultivo, los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación se realizaron fijando el voltaje de estas células a -80 mV.

Usando la configuración de “parche perforado” en el modo de fijación de voltaje, exploramos en 6 neuronas el efecto de la perfusión de condroitín sulfato (figura 1). Casi de forma instantánea, al aplicar CS a 1 μ M, observamos que la frecuencia de disparo de CP aumentó un 30% mientras que la amplitud de las mismas se redujo alrededor del 60% ($p < 0.001$ frente a la situación control). Curiosamente, el efecto de la aplicación de CS sobre neuronas con baja actividad basal producía el disparo de CP tal y cómo se observa en el panel E de la figura 14.

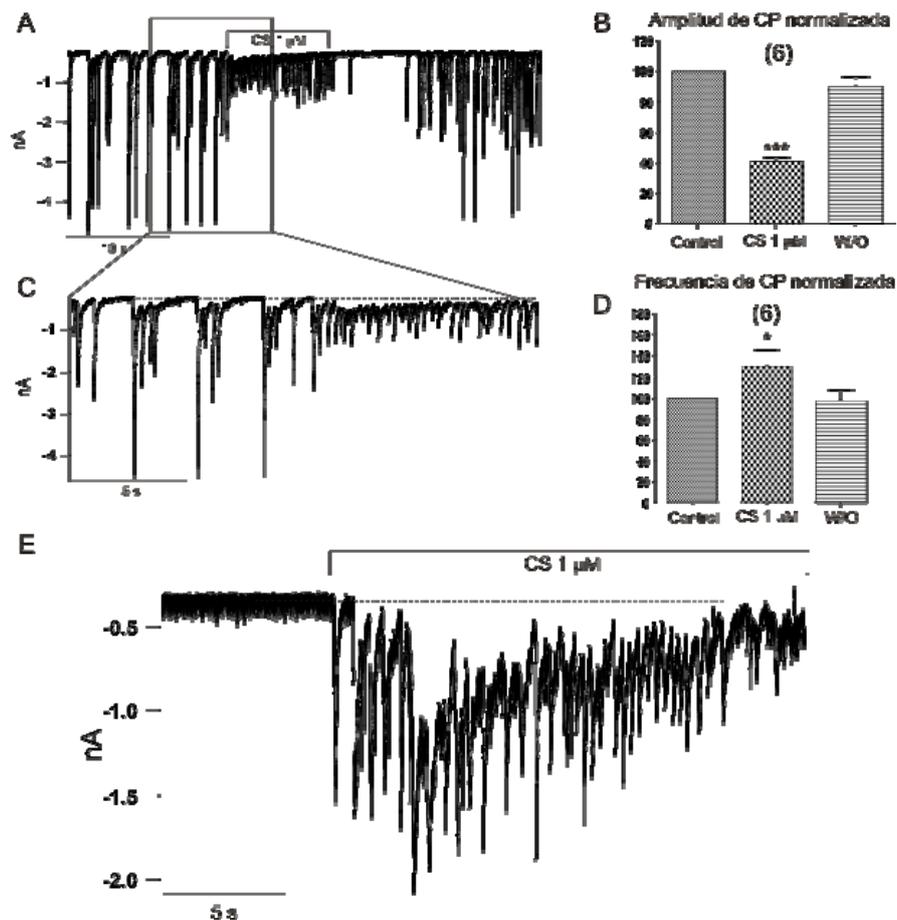


Figura 14. Aumento de la excitabilidad celular por la aplicación de condroitín sulfato. **A.** Corrientes postsinápticas en una célula modelo. **C.** Visión ampliada de la región seleccionada en el panel A donde se observa el efecto de la perfusión de condroitín sulfato a 1 μM . **B.** Representación de las corrientes postsinápticas normalizadas y **D** la frecuencia de las mismas. En E se muestra un ejemplo de una célula en la que la perfusión de condroitín sulfato a 1 μM promueve el disparo de corrientes postsinápticas *per se*. Los datos representan la media \pm E.S.M. (n:6). *** $p < 0.001$ vs. control, en el panel B, * $p < 0.05$ vs. control, en el panel D.

Para medir el efecto del CS sobre el potencial de membrana usamos la misma configuración de *patch clamp* pero en modo de fijación de corriente. Las células en reposo estudiadas presentaron un valor de potencial de membrana de -63 ± 9 mV (media \pm E.S.M.), el umbral de disparo de los potenciales estaba alrededor de -30 mV y estos tenían un sobretiro que alcanzaba los 0 mV. Sobre estas condiciones control se procedió a la aplicación de distintas concentraciones de CS desde 1 a 30 μM (figura 15).

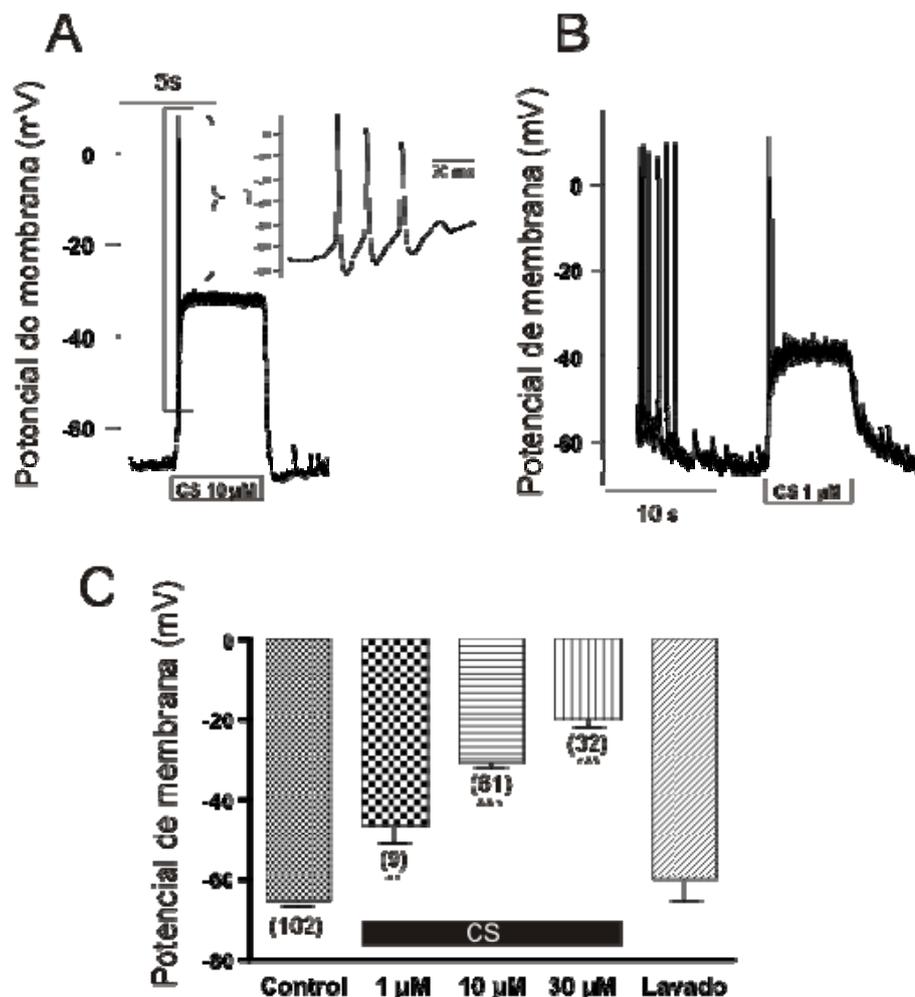


Figura 15. Efecto de la aplicación de condroitín sulfato sobre el potencial de membrana en neuronas de hipocampo. **A.** Despolarización provocada por la aplicación de condroitín sulfato a 10 μM; inserto, región ampliada de los potenciales de acción provocados al inicio de la despolarización. **B.** Efecto de la perfusión de condroitín sulfato a 1 μM; nótese la menor magnitud de la despolarización provocada. **C.** Representación de los datos de la despolarización una vez estabilizada en la fase de la meseta (1-2 s tras el estímulo) Los datos representan la media ± E.S.M. (n:102). ***p<0.001 vs. control, en el panel B, **p<0.01 respecto al valor basal del potencial de membrana en reposo.

Pudimos observar que el condroitín sulfato produjo despolarización celular y el disparo de una salva de potenciales de acción, en todas las células sometidas al protocolo experimental en forma concentración-dependiente. Este efecto fue reversible ya que al perfundir la célula con la solución control, el potencial de membrana recuperó sus valores basales.

La aplicación de condroitín sulfato sobre neuronas de hipocampo en cultivo produce una corriente iónica de forma dependiente de la concentración, del tiempo y del voltaje

Tras observar la fuerte despolarización provocada por la perfusión de condroitín sulfato a concentraciones por encima de 1 μM , quisimos saber si ésta era provocada por la acción de una corriente iónica bien de entrada de cargas positivas o de salida de cargas negativas. Usando la metodología utilizada para los registros de CP (parche perforado y V_m de -80 mV) y registrando en células de 8 a 10 días de edad en cultivo, perfundimos distintas concentraciones de CS.

Pocos milisegundos después de la aplicación de CS a 10 μM observamos una corriente que mostraba dependencia directa con la concentración de CS utilizada, alcanzando su máxima intensidad a 100 μM , que correspondió con una corriente de 958 ± 78 pA (media \pm E.S.M.) de amplitud.

Con el fin de caracterizar la actividad de un fármaco y su potencia, se realizan estudios farmacológicos cuya finalidad es determinar el parámetro de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) que se define como la concentración a la que se alcanza la mitad del efecto máximo; ya que la curva sigmoidea que describe la relación entre la concentración de agonista y la magnitud del efecto es cuasi recta entre CE_{20} y CE_{80} y el punto medio de esta recta es el de menor error estadístico, es éste el valor que define con más precisión la potencia del compuesto para producir un efecto. Para nuestro caso, el CS mostró una CE_{50} de 10,9 μM (figura 16, A y B).

Además, el efecto fue dependiente de la duración del estímulo, siendo patente la corriente provocada por CS desde los 100 milisegundos de tiempo de aplicación del estímulo aunque su magnitud no fue la máxima hasta alcanzar un segundo de tiempo de aplicación. Por ello, en los experimentos siguientes se establecieron tiempos de aplicación de CS por encima de este umbral (figura 16, C).

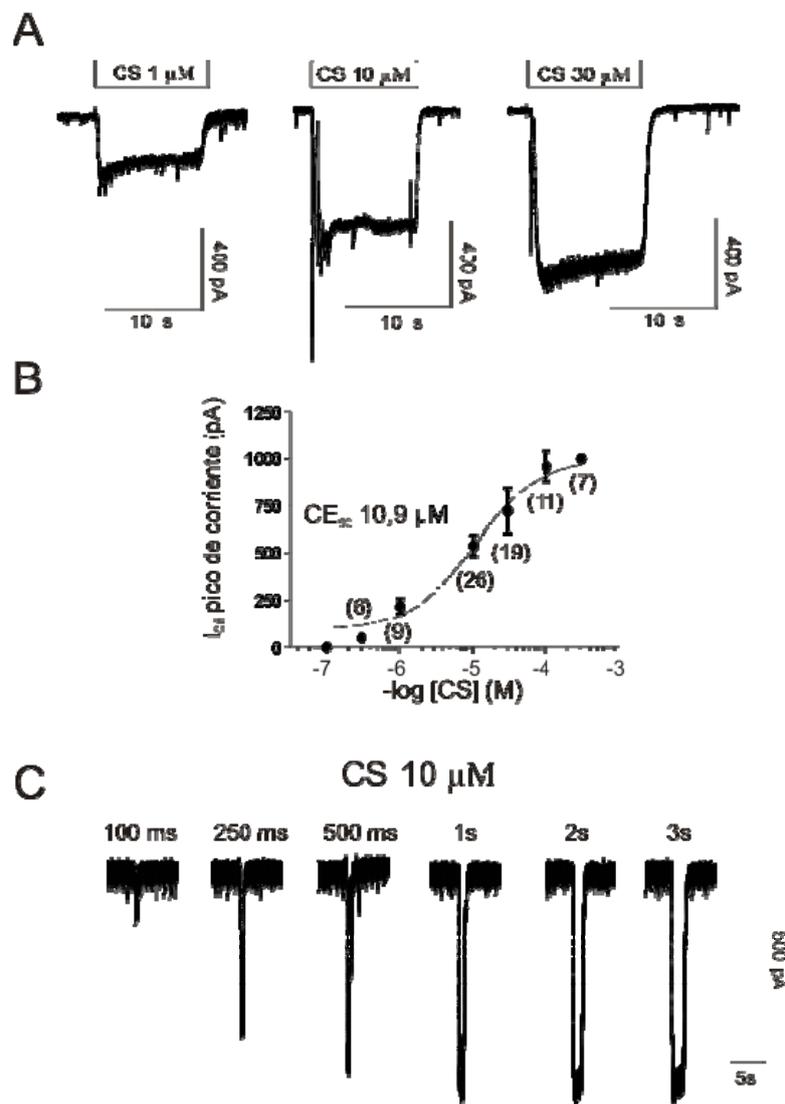


Figura 16. Corriente provocada por la aplicación de condroitín sulfato. **A.** Trazos originales ejemplo de la corriente producida por la aplicación de condroitín sulfato. **B.** Curva dosis-respuesta de la intensidad de la corriente medida tras un segundo de aplicación del CS; el cálculo de la concentración efectiva 50 (EC₅₀) dio como resultado 10,9 μM . **C.** Ejemplo de trazos originales obtenidos en la misma células sometida a distintos tiempos de aplicación de condroitín sulfato.

Una vez caracterizada la influencia del tiempo de aplicación y determinada la CE₅₀ quisimos saber cómo se comportaba esta corriente en función del voltaje de fijación de la célula con el que realizamos los experimentos de la figura 16.

Así pues, medimos la corriente producida por CS a distintos voltajes de fijación en un rango que fue desde -80 mV hasta $+80 \text{ mV}$. Como se observa en la figura 17, la amplitud máxima de la corriente se obtuvo a un potencial de -80 mV ; el potencial de reversión (potencial al que la amplitud neta de corriente es 0) fue de -14 mV a partir del cual la corriente pasaba a ser de salida (probablemente de iones de K^+).

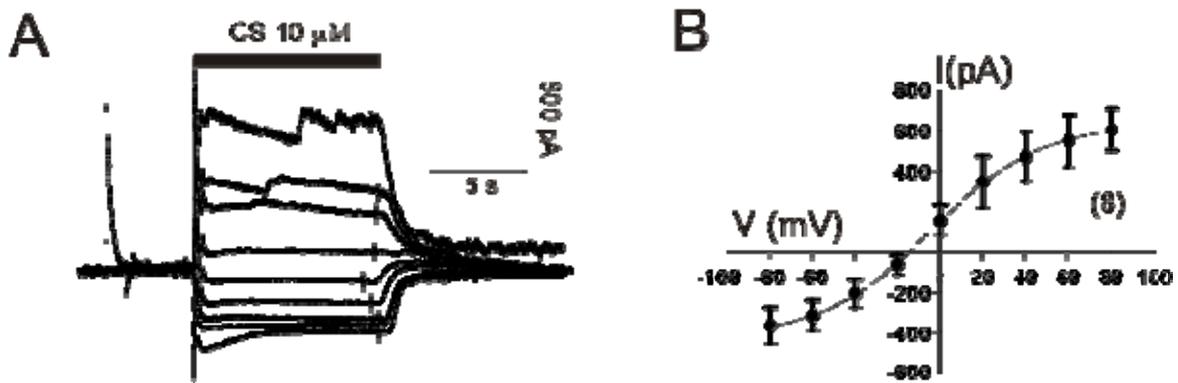


Figura 17. Dependencia de voltaje para la corriente de condroitín sulfato. **A.** Trazados originales ejemplo de la corriente producida por la aplicación de condroitín sulfato a distintos voltajes de fijación en la misma célula. **B.** Representación de los valores netos de la intensidad de corriente provocada por la aplicación de condroitín sulfato en las distintas células sometidas al mismo protocolo experimental: relación intensidad/voltaje.

La corriente provocada por condroitín sulfato en neuronas de hipocampo se debe a un aumento en la permeabilidad y flujo de cationes de Na^+ de manera predominante

En el siguiente grupo de experimentos nos propusimos clarificar el ión responsable de la corriente provocada por CS. Así pues, y preparando una solución isoosmótica sustituyendo los miliosmoles correspondientes de NaCl por N-metil-D-glucamina, procedimos al registro de la corriente tanto en tampón Tyrode “normal” como en el tampón “modificado libre de Na^+ ” (para conocer más en detalle la composición de ambas soluciones remitimos al lector al apartado 4.5.1. de materiales y métodos). El resultado de este experimento se muestra en la figura 5. En ésta se puede comprobar que la aplicación de CS en el tampón “libre de Na^+ ” resulta en un $77 \pm 6,4\%$ (media \pm E.S.M.) de bloqueo medido en el pico de la corriente, aunque en el panel de la figura se representan los valores absolutos de la amplitud de esta corriente (figura 18, B). Tras lavar la solución libre de sodio y dar un pulso nuevamente en solución control, la corriente volvió a ser de la misma amplitud que la del primer pulso (P1).

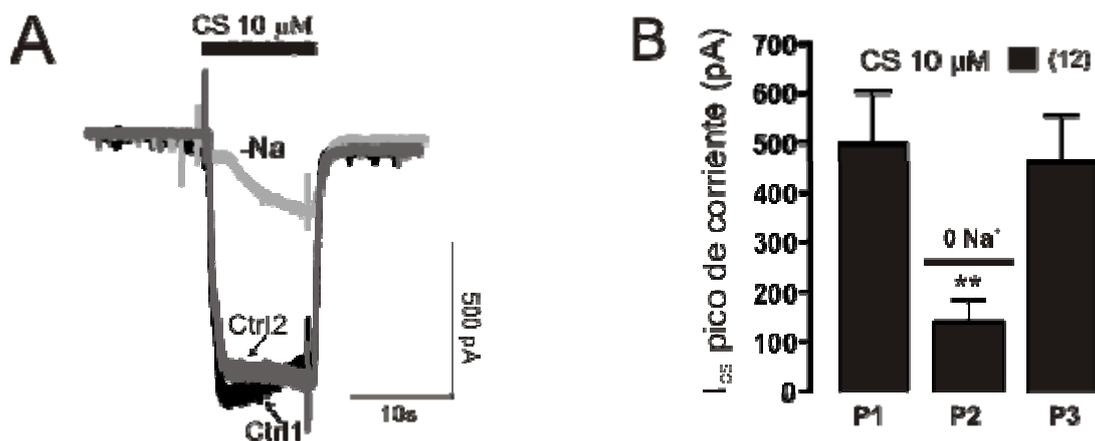


Figura 18. Dependencia de iónica para la corriente de condroitín sulfato. **A.** Trazos originales ejemplo de la corriente producida por la aplicación de condroitín sulfato en distintas soluciones extracelulares: con y sin Na⁺. **B.** Representación de los valores absolutos de la intensidad de corriente provocada por la aplicación de condroitín sulfato en las distintas condiciones experimentales. n= 12 células, **p<0.01 versus control.

Otros glucosaminoglicanos como el ácido hialurónico o la heparina no producen los efectos observados con la aplicación de condroitín sulfato

El condroitín sulfato pertenece a una familia de moléculas de alto peso molecular llamada glucosaminoglicanos. Como explicamos concienzudamente en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, estas moléculas se componen de repeticiones en tándem de distintas unidades disacáridicas. La diferencia entre los distintos GAG reside en la presencia de una o las dos unidades sacarídicas distintas que al final se puede traducir en la distinta posición de los grupos hidroxilo de los 6 carbonos que conforman la hexosamina, por ejemplo.

Así, el AH y el CS se diferencian en la hexosamina del disacárido unidad (el AH presenta N-acetil-glucosamina mientras que el CS tiene una N-acetil-galactosamina), ya que el ácido idurónico es el mismo; en este caso el glucurónico. Además, otra diferencia importante es la presencia de los grupos sulfato que se encuentran en cada disacárido, así, en el AH no existen mientras que el CS utilizado (*Bioibérica S.A*) es una mezcla de CS (tamaño molecular medio 13,5 KDa) con un 62% sulfatado en posición 4, 32% sulfatado en posición 6 y un 6% de los disacáridos sin grupo sulfato.

Por los motivos anteriores quisimos realizar los controles con moléculas de estructura y tamaño parecidos. Así, en los siguientes experimentos sometimos a las neuronas a una aplicación de AH y heparina con la intención de comprobar su efecto

sobre las CP y ver si eran capaces de generar una corriente de características similares a las producidas por CS.

Pudimos observar que en la misma célula, distintas concentraciones de AH (desde $\mu\text{g/ml}$ hasta 3,36 mg/ml) no ejercían ningún efecto (figura 19 paneles A y B) mientras que el CS a $10 \mu\text{M}$ ($135 \mu\text{g/ml}$) provocaba la corriente esperada (figura 19, C). Por otro lado, en otro grupo de células la perfusión de heparina a 1 mg/ml no produjo tampoco ningún efecto. En el ejemplo que se representa en la figura 19 (D-F) se perfundió tanto CS como glutamato para comprobar que la célula respondía a los agonistas, tal y como se esperaba.

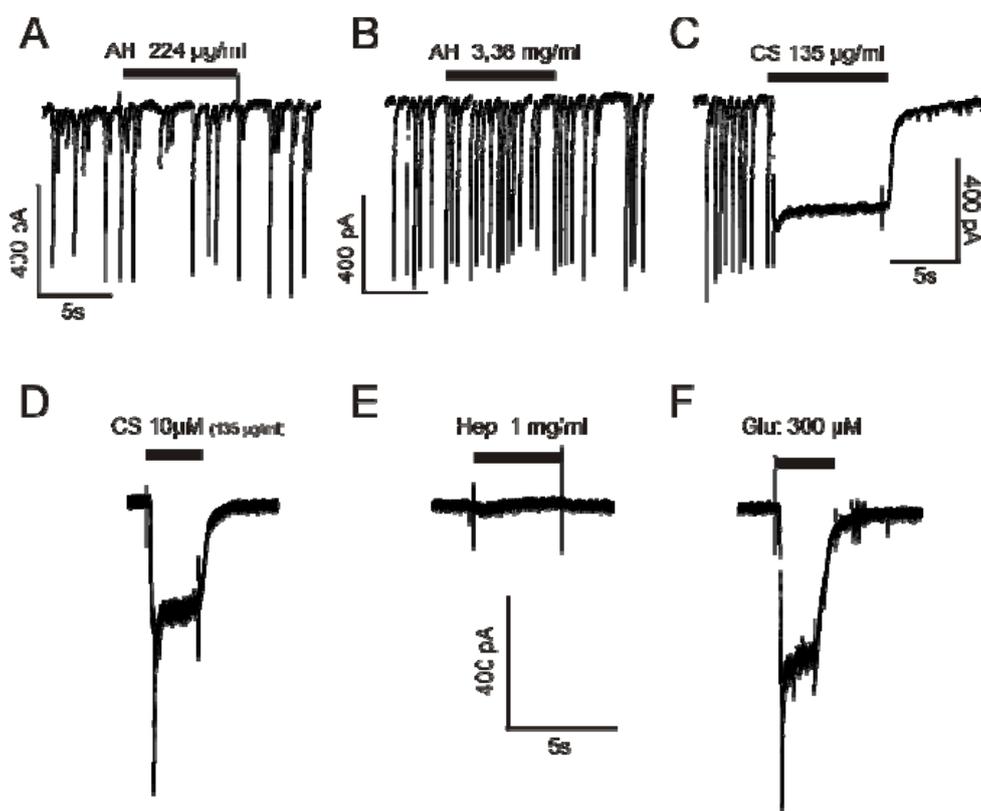


Figura 19. Efecto de distintos glucosaminoglicanos sobre las corrientes espontáneas en neuronas fijadas a -80 mV . La misma célula se sometió a distintas concentraciones de ácido hialurónico: desde valores similares a la EC_{50} (A) para el CS (C) hasta concentraciones 15 veces superiores (B). En otro grupo de células se comprobó que tampoco otro glucosaminoglicano como la heparina fue capaz de evocar corriente en la neurona bajo registro (E). Esta célula sí respondía tanto a CS (D) como a glutamato (F).

La corriente y la despolarización provocadas por la aplicación de condroitín sulfato se previenen si el polisacárido se rompe específicamente con la enzima condroitinasa ABC

Con el objeto de consolidar la hipótesis de que era realmente la molécula de CS la responsable de inducir la despolarización celular por la generación de una corriente iónica y que tal efecto dependía de la estructura de la propia molécula, diseñamos un experimento en el que digerimos enzimáticamente durante 24 horas una solución 10 mM de CS.

Para ello nos valimos de la enzima Condroitinasa ABC que se extrae de la bacteria *Proteus vulgaris* y cataliza la rotura de los enlaces (1-4)- β -D-hexosaminil y (1-3)- β -D-glucuronosil o (1-3)- α -L-iduronosil; es decir, actúa sobre condroitín 4 sulfato, condroitín 6 sulfato y dermatán sulfato. Para la realización del experimento, se prepararon dos soluciones madre de CS 10 mM en un solución Tyrode modificada que contenía 50 mM de acetato sódico como activador enzimático y un pH de 8. A una de ellas se añadió 50 mU/ml de la enzima y se incubó a 37 °C durante 24 horas. La otra alícuota fue la que se utilizó como control en este experimento. Tras este tiempo ambas preparaciones se mantuvieron a -20 °C hasta el día del experimento.

En una neurona fijada a -80 mV la aplicación de 10 μ M de CS provocó la corriente esperada de amplitud y cinética similar a la observada en experimentos anteriores. Sin embargo, el CS procedente del vial sometido durante las 24 horas a la acción de la condroitinasa ABC provocó una corriente reducida en un 62 ± 8 % respecto a su control (figura 20, A y B). De forma análoga, en el registro de potencial de membrana se observó que, en 9 células, el CS digerido no fue capaz de provocar despolarización estadísticamente significativa como sí fue observada para el CS control de este experimento (figura 20, C y D). En los dos grupos de experimentos la p resultó ser <0.001 frente a la situación control.

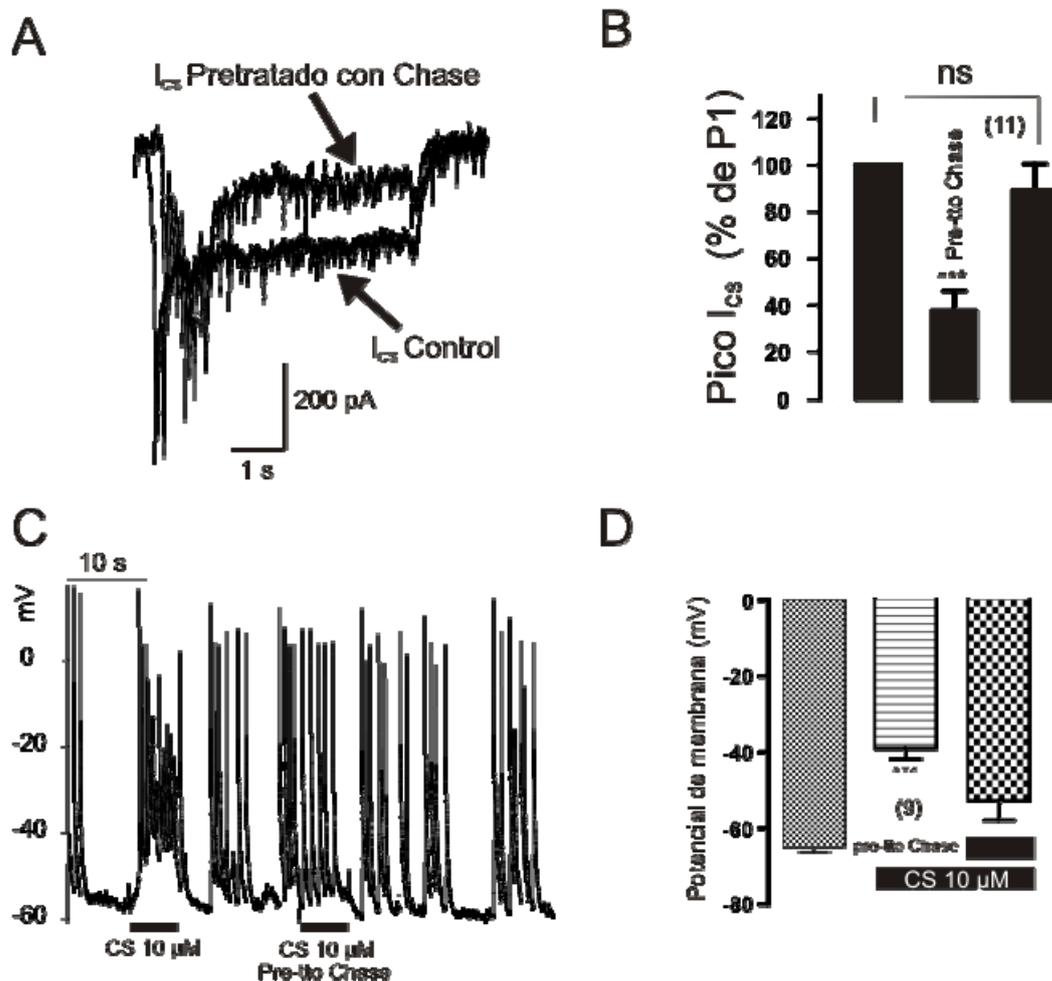


Figura 20. Efecto de la digestión enzimática de condroitín sulfato con la enzima condroitinasa ABC. En neuronas con el potencial fijado a -80 mV se realizó el registro de la corriente provocada por condroitín sulfato digerido con la enzima condroitinasa ABC y su respectivo control. En el panel A se representan trazos ejemplo de las corrientes evocadas por condroitín sulfato. En B se muestra el diagrama de barras de la amplitud de las corrientes obtenidas de 11 células. En otro grupo de células se comprobó que el condroitín sulfato control provocaba la despolarización esperada mientras que el que había sido degradado por la enzima apenas elevó el potencial de membrana basal. En C se representa un registro ejemplo de una célula sometida a las mismas concentraciones de condroitín sulfato digerido y sin digerir. El panel D se resumen los valores obtenidos de 9 células sometidas al mismo protocolo experimental. *** $p < 0.001$ respecto al valor basal del potencial de membrana en reposo. *** $p < 0.001$ vs. control, en el panel B.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la reacción de $1 \mu\text{mol}$ de sustrato para producir $1 \mu\text{mol}$ de producto por minuto. En nuestro vial de $1 \text{ ml } 10^{-2} \text{ M}$ de CS tenemos $10 \mu\text{moles}$ de sustrato que fueron sometidos a 50 mU de actividad enzimática es decir; durante 24 horas la enzima catalizó la rotura de los enlaces glicosídicos a razón de 50 nmoles/min o lo que es lo mismo, era capaz de procesar $10 \mu\text{moles}$ de sustrato cada 200 min. En total calculamos que la enzima fue capaz de realizar, durante el tiempo de reacción total, alrededor de 7

rondas de rotura en cada molécula de CS. Si el peso molecular medio de un disacárido de CS es 600 Da y la molécula tenía un peso molecular de 13,5 KDa, estimamos que la longitud media de nuestra molécula era de 20 disacáridos. Por lo que en teoría, cada una de ellas, tras el tratamiento con condroitinasa ABC quedó en una longitud media de 13 disacáridos. Quizás por este hecho, el producto de la digestión enzimática fue aún capaz de provocar una pequeña corriente y una pequeña despolarización.

La corriente provocada por la aplicación de CS no se obtuvo en un protocolo experimental de disección de corrientes GABAérgicas

En el pasado, en nuestro laboratorio, el método para el estudio individual de cada una de las corrientes bien de tipo glutamatérgico o bien GABAérgicas se apoyaba en la farmacología, es decir, se usaban distintos antagonistas de los receptores de neurotransmisores para aislar las corrientes de interés.

En el caso concreto de los objetivos de esta tesis, para el estudio de la naturaleza de la corriente inducida por CS nos servimos de una metodología puesta a punto en nuestro laboratorio para la disección electrofisiológica de las corrientes GABAérgicas sin necesidad de añadir a la disolución extracelular bloqueantes de los receptores glutamatérgicos (Gonzalez y col. 2011) que podrían interaccionar de forma inespecífica e inducir una interpretación errónea de los resultados. Además, está documentado que el uso de antagonistas GABAérgicos y glutamatérgicos puede interferir postsinápticamente sobre ciertos receptores colinérgicos (Arnaiz-Cot y col. 2008). Así pues, basándonos en la literatura (Barker y col. 1988; Alkondon y col. 1999) y en experimentos realizados por otros compañeros del laboratorio, decidimos fijar el V_m de la célula a estudio a 0 mV y usar una disolución intracelular de 10 mM de cloruros (ver en materiales y métodos). Bajo estas condiciones, con una concentración de cloruros extracelular estándar (150 mM del Tyrode) sólo se registran corrientes GABAérgicas de salida puesto que 0 mV es un valor cercano al potencial de reversión de las corrientes glutamatérgicas.

Tal y cómo se observa en la figura 21 la aplicación tanto de los agonistas prototípicos de las corrientes que llevan su nombre, glutamato a 100 μ M y GABA a 50 μ M como la aplicación de CS, evocaron corrientes de entrada en una neurona con el V_m fijado a -80 (figura 21, panel A). Sin embargo cuando fijábamos el V_m en la misma

célula a 0 mV, perdíamos prácticamente la respuesta tanto a glutamato como a CS y únicamente manteníamos la señal provocada por la perfusión de GABA (figura 21, panel B).

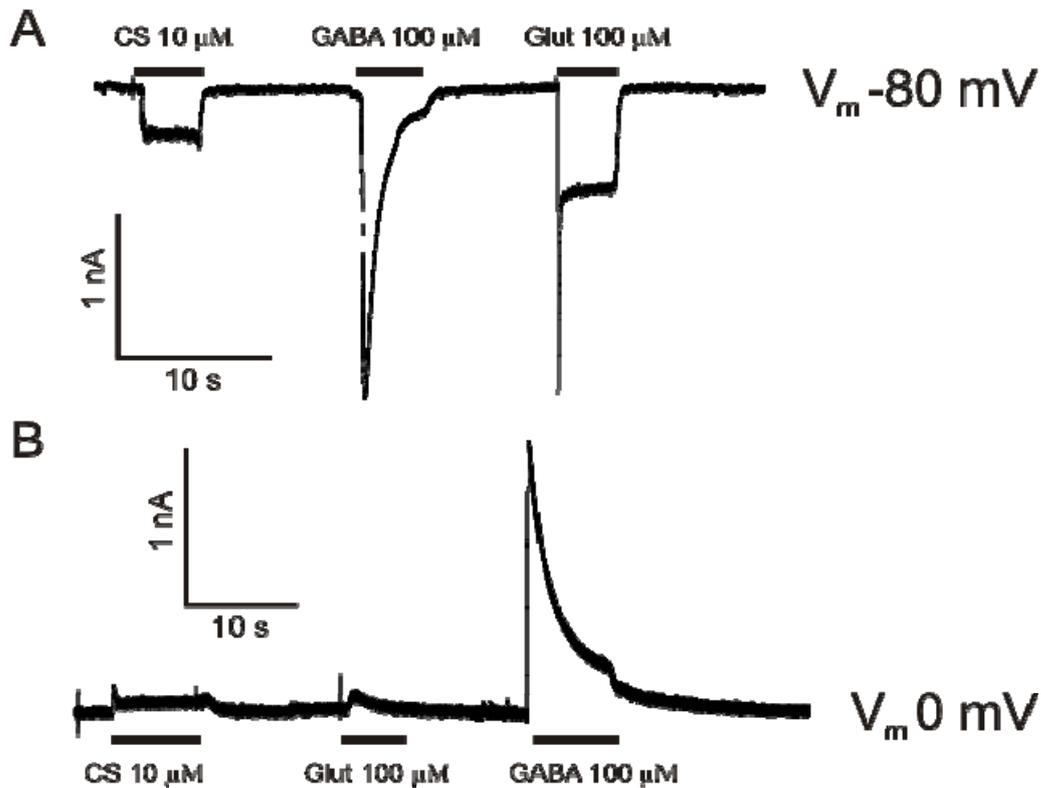


Figura 21. Las corrientes de glutamato y CS no se observan en una neurona con el potencial fijado a 0 mV y baja concentración intracelular de cloruros. La misma célula se sometió a distintos estímulos. A -80 mV (A) la aplicación tanto de CS como de glutamato y GABA evocaron corrientes de entrada. Sin embargo esta respuesta a CS y a glutamato se perdió cuando el potencial de membrana se fijó a 0 mV (B); no ocurrió así con la aplicación del agonista GABA.

Este resultado indicaba que la corriente I_{CS} era de naturaleza glutamatérgica pues al potencial de fijación próximo al potencial de reversión de la corriente de glutamato, también perdíamos la respuesta a CS. Las corrientes de glutamato pueden ser generadas por la activación de los receptores tipo AMPA, kainato o los de tipo NMDA. Así pues, nos propusimos estudiar con más detalle las corrientes generadas por la activación de estos receptores.

La cinética de la corriente provocada por CS se asemeja a la provocada por agonistas glutamatérgicos. Además los bloqueadores inespecíficos de las corrientes AMPA/kainato bloquean la corriente provocada por CS

Para abordar este objetivo nos valimos de bloqueantes de los receptores glutamatérgicos; concretamente, utilizamos CNQX (40 μ M), antagonista no selectivo de los receptores AMPA y kainato, y MK-801 (10 μ M), bloqueante selectivo de los receptores NMDA. Ambos se añadieron a la disolución extracelular Tyrode y se preadministraron (al menos durante 30 s) y coadministraron junto con la concentración de 10 μ M de CS.

Es decir, el protocolo de administración de fármacos en este grupo de experimentos consistió en aplicar un primer pulso de 5 s de CS a 10 μ M (P1), para caracterizar la respuesta celular control, un segundo pulso igualmente de 5 s de CS coaplicado con los bloqueantes glutamatérgicos (P2) que previamente habían sido administrados durante 30 s y un tercer pulso (P3), también 5 s, de CS para corroborar que se recuperan las características originales del registro (figura 22).

La aplicación de AMPA a 30 μ M y kainato a 100 μ M sobre una neurona con el potencial de membrana fijado a -80 mV provocó una corriente iónica que no se inactivó durante todo el tiempo de aplicación del estímulo (figura 22, B y C). La cinética de la corriente evocada por estos agonistas se asemejó a la que provocó la aplicación de CS (figura 9, A). Sobre la base de estos resultados nos pareció necesario probar si la respuesta a CS se veía bloqueada por la preaplicación de antagonistas de los receptores AMPA/Kainato. Los resultados de este experimento se muestran en los paneles D-G de la figura 9. Como se observa en los trazos originales (figura 22, D y F) la presencia en la preparación de CNQX o NBQX bloqueó la corriente generada por CS en un $96\pm 0,7\%$ y $97\pm 1,3\%$, respectivamente. Una vez retirados los antagonistas, la respuesta se recuperó totalmente, no encontrándose diferencias significativas entre ésta y la primera respuesta control.

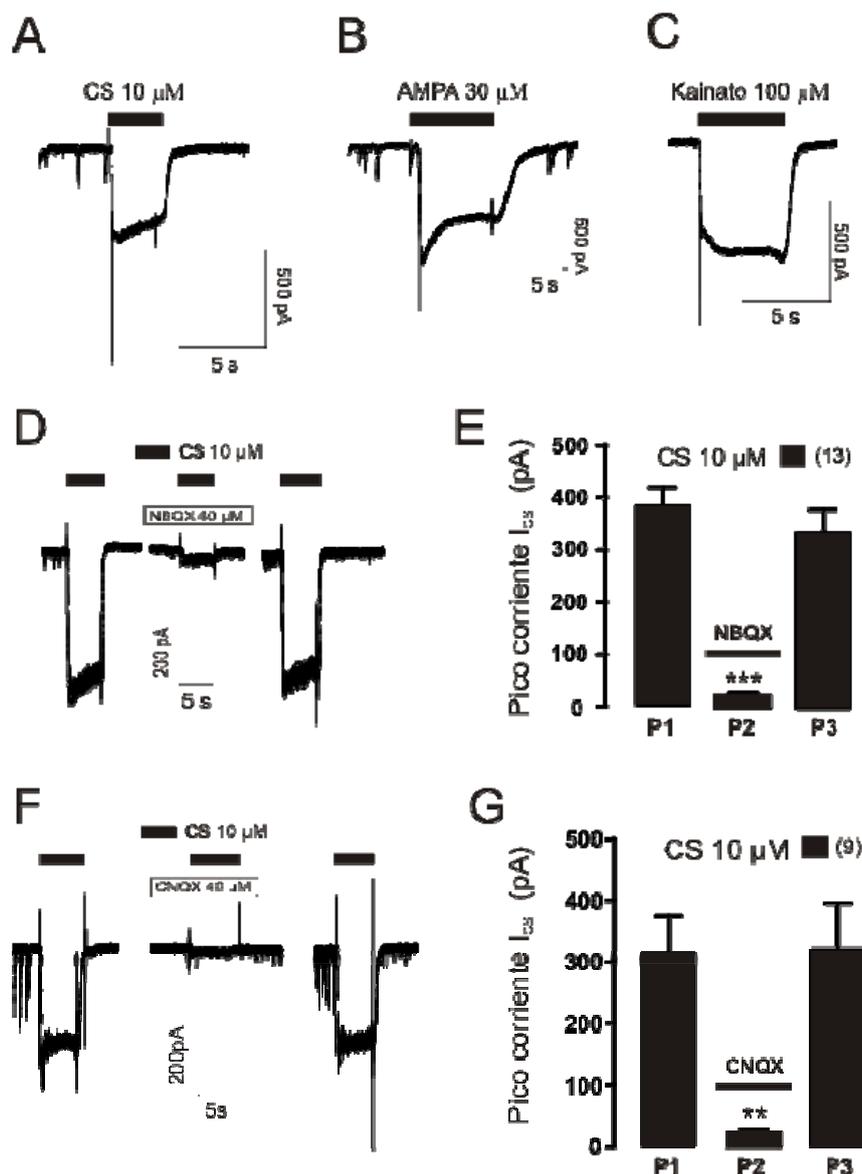


Figura 22. Efecto de los antagonistas no-NMDA sobre la corriente evocada por CS. A-C. Registros de las corrientes provocadas por la aplicación de distintos agonistas de los receptores AMPA y kainato. También se representa el trazo de la corriente provocada por la aplicación de CS. D. Registros ejemplo del protocolo experimental llevado a cabo para determinar el efecto del antagonista CNQX o NBQX (F) sobre la corriente provocada por CS. En E y G se representa la media \pm E.S.M. del conjunto de datos obtenidos de 13 y 9 células respectivamente. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto al valor de la intensidad de corriente control.

De forma análoga decidimos medir también el efecto de estos antagonistas en la monitorización del potencial de membrana neuronal. Así, pudimos comprobar que la despolarización provocada por la aplicación de CS bloqueó en un $79 \pm 5,9\%$ y $93 \pm 2,4\%$ por NBQX y CNQX respectivamente (figura 23, panel C). Para entender el protocolo experimental seguido, representamos registros originales de cada tipo de experimento en los paneles A y B de la figura 10. En ellos se observa que la despolarización se bloquea de forma contundente, por la presencia en la preparación de los antagonistas para los receptores de glutamato de los subtipos AMPA/kainato (figura 23, panel C).

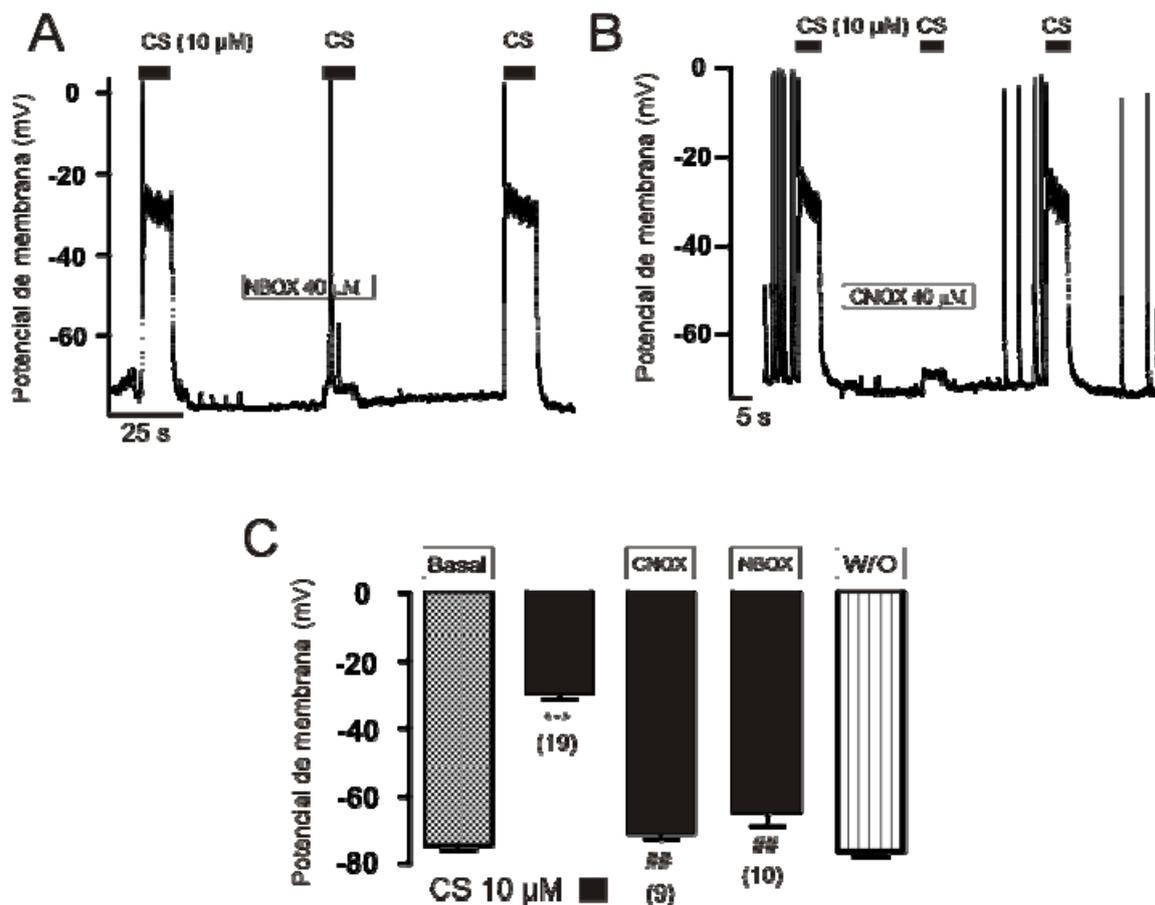


Figura 23. Efecto de los antagonistas no-NMDA sobre la despolarización inducida por CS. **A y B.** Registros de la monitorización del potencial de membrana de un experimento en el que se dan 3 pulsos de CS el segundo de ellos en presencia de distintos antagonistas de los receptores AMPA y kainato. En **C**, se muestra el diagrama de barras de los datos crudos obtenidos en distintas células. Se representa la media \pm E.S.M.; *** $p < 0.001$ respecto al valor de potencial de membrana en reposo; ## $p < 0.01$ respecto a la despolarización provocada por CS.

Los receptores NMDA no parecen estar mediando el efecto de CS

Los resultados obtenidos con los antagonistas de los receptores AMPA/kainato indican que la mayor parte del efecto del CS está mediado por la activación de receptores AMPA y kainato; sin embargo quisimos cerciorarnos del papel que jugaban los receptores de glutamato del subtipo NMDA en este efecto. Para ello, recurrimos a dos antagonistas de receptores NMDA: el MK-801 a 3 μ M y D-APV a 50 μ M. Cada bloqueante se utilizó frente a una concentración distinta de CS en un protocolo similar al llevado a cabo para los experimentos del apartado anterior (figura 22 y 23).

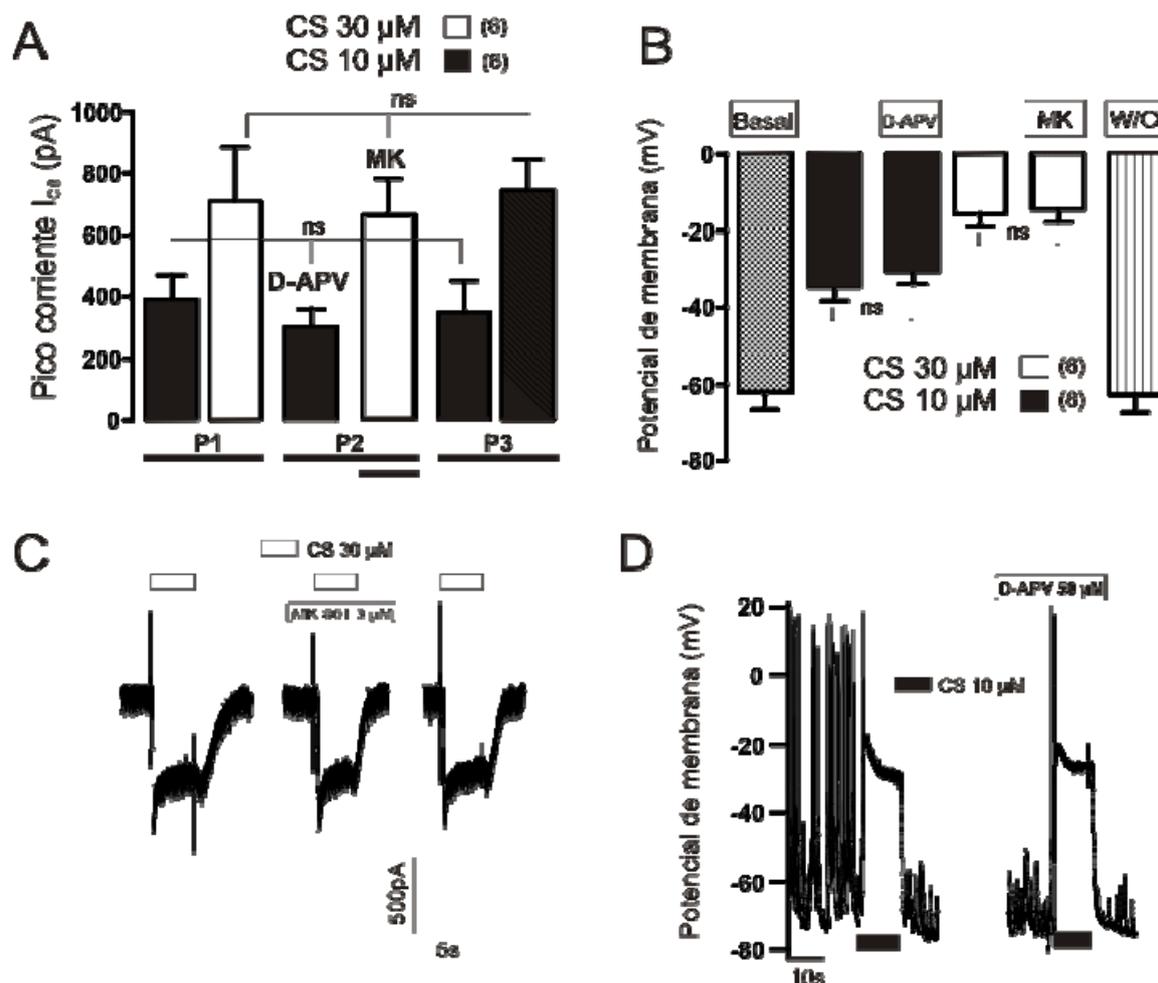


Figura 24. Efecto de los antagonistas NMDA sobre las corrientes y la despolarización inducidas por CS. **A y B.** Diagrama de barras que representan la intensidad de la corriente provocada por el CS a 10 y a 30 μM así como la despolarización que media esta corriente. Se representan además el efecto de 2 distintos antagonistas para el receptor de NMDA; a saber, el MK-801 y el D-APV en C y D se muestran ejemplos prototípicos de los experimentos realizados tanto en fijación de voltaje (C) como en fijación de corriente (D). El tratamiento no afectó de manera significativa a ninguna de las variables estudiadas.

Tal y como refleja la figura 24 la incubación con MK-801 y la aplicación del CS junto con el antagonista no influyó en la intensidad de la corriente provocada por 30 μM de CS (figura 24, A y C). El D-APV tampoco ejerció efecto significativo alguno sobre esta variable (figura 24, A). De manera adicional, estos experimentos se realizaron en el modo de fijación de corriente pero la pre-aplicación y co-estimulación, junto con el CS, de los antagonistas no fue capaz de prevenir la despolarización provocada por CS a 10 y 30 μM (figura 24, B y D).

Tanto el bloqueo selectivo de los receptores AMPA como su modulación alostérica afectaron a la corriente provocada por CS

Con el objeto de caracterizar la participación de los receptores AMPA en la corriente I_{CS} y la consiguiente despolarización, nos valimos del antagonista selectivo de los receptores AMPA; el GYKI-53655 es un antagonista no competitivo que presenta una alta especificidad para estos receptores (CI_{50} 0,9 μ M) frente a los de kainato sobre los que no ejerce ningún efecto hasta 100 μ M (Paternain y col. 1995).

En un protocolo de experimentación tipo sándwich, la aplicación en un primer pulso de CS a 10 μ M indujo la corriente prototípica. La perfusión de GYKI 1 minuto antes y también durante el estímulo de CS provocó una drástica reducción del tamaño de I_{CS} (figura 25, A). También se observó este efecto cuando se introducía el antagonista en medio de un pulso de CS (figura 25, panel B). El bloqueo de la corriente normalizada resultó ser de un $69 \pm 7,3\%$ (figura 25, panel C). Tanto en el primer protocolo como en el segundo se puede observar que el efecto del bloqueo de la corriente I_{CS} es totalmente reversible.

Por otro lado también se midió la despolarización provocada por la aplicación de CS siguiendo el mismo protocolo que el que se utilizó para medir I_{CS} . Pudimos comprobar que la despolarización provocada por la aplicación de CS se previno cuando precedíamos el pulso de CS de una incubación con el antagonista selectivo de los receptores AMPA (GYKI-53655) (figura 25, panel D). Además esta despolarización se bloqueó cuando, en medio de la aplicación de CS, incubábamos el antagonista GYKI (figura 25, E). Tras la retirada del antagonista del medio pudimos recuperar la respuesta control por completo. Tras realizar este experimento en distintas células pudimos cuantificar la despolarización en presencia del antagonista GYKI que resultó un $51 \pm 3,7\%$ menor que la despolarización control promovida por la aplicación de CS (figura 25, panel F).

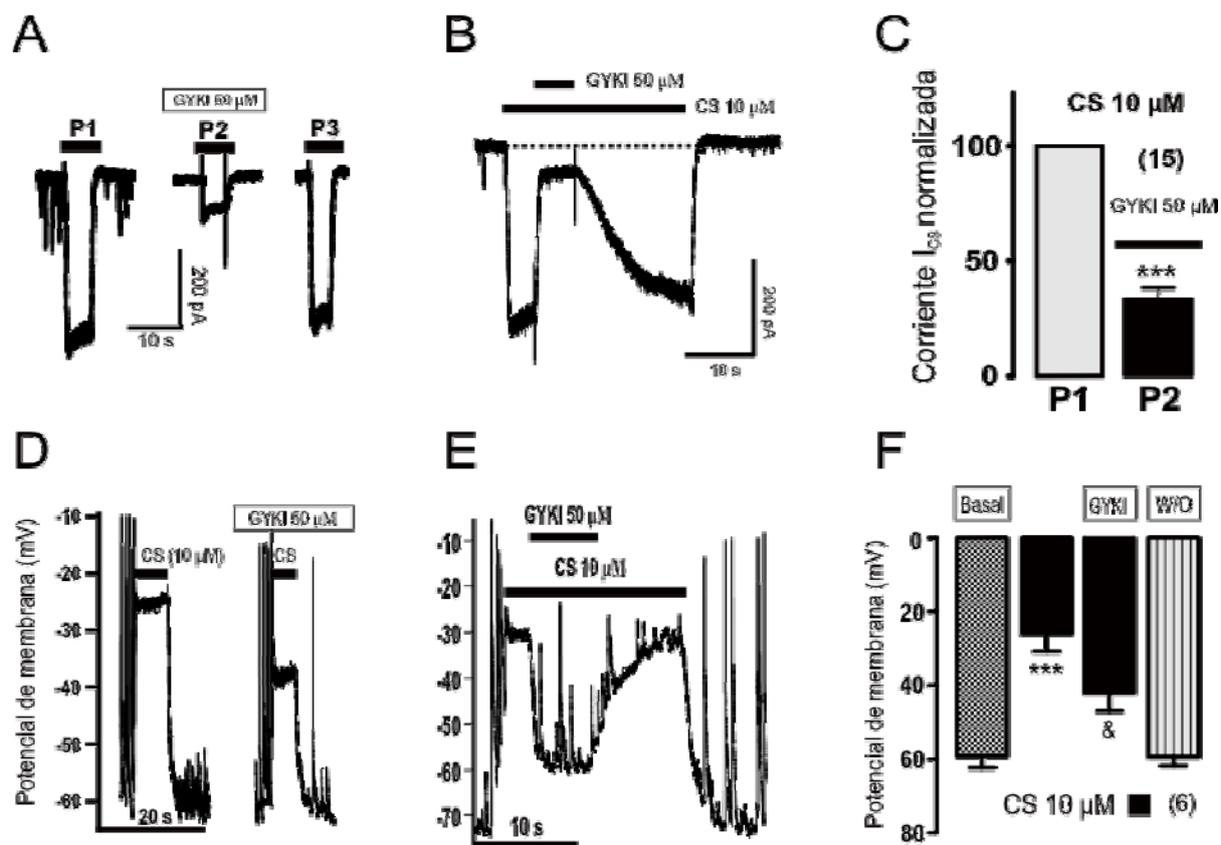


Figura 25. Efecto del antagonista selectivo AMPA; GYKI53655 sobre las corrientes y la despolarización inducidas por CS. **A y B.** Trazos representativos de dos protocolos distintos en los que se estudia el bloqueo de la corriente I_{CS} por GYKI. **C.** Diagrama de barras de la corriente normalizadas de CS en el pulso control P1 y en presencia de GYKI (P2) en 15 células. **D y E.** Ejemplos representativos de los mismos protocolos realizados en A y B, estudiados en fijación de corriente. **F.** Diagrama de barras del potencial de membrana en situación basal, en presencia de CS y CS en presencia del antagonista de los receptores AMPA. Los datos han sido representados como la media \pm E.S.M.; *** $p < 0.001$ respecto al valor basal de la corriente; *** $p < 0.001$ respecto al valor de potencial de membrana en reposo; & $p < 0.05$ respecto a la despolarización provocada por CS.

Al obtener estos valores de bloqueo, menores que los obtenidos con los antagonistas, no pudimos descartar la participación de los receptores de kainato en el efecto promovido por CS.

Llegados a este punto de nuestra investigación quisimos recabar una evidencia adicional, y nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Se modularía la I_{CS} por un modulador alostérico positivo de los receptores de AMPA? Para ello, nos valimos de otra herramienta farmacológica que creímos interesante utilizar para reforzar aún más los datos hasta ahora obtenidos; esta es la ciclotiazida, descrita por Partin en 1993 (Partin y col. 1993).

Cuando el CS y la ciclotiazida (CTZ) se aplicaron de forma conjunta, la corriente resultante fue casi tres veces mayor que la corriente control provocada por la aplicación de CS (figura 26, paneles A y C). Tal y como era de esperar, la corriente AMPA se moduló positivamente y su amplitud resultó ser algo más del doble de la obtenida con la aplicación del agonista únicamente (figura 26, paneles B y C).

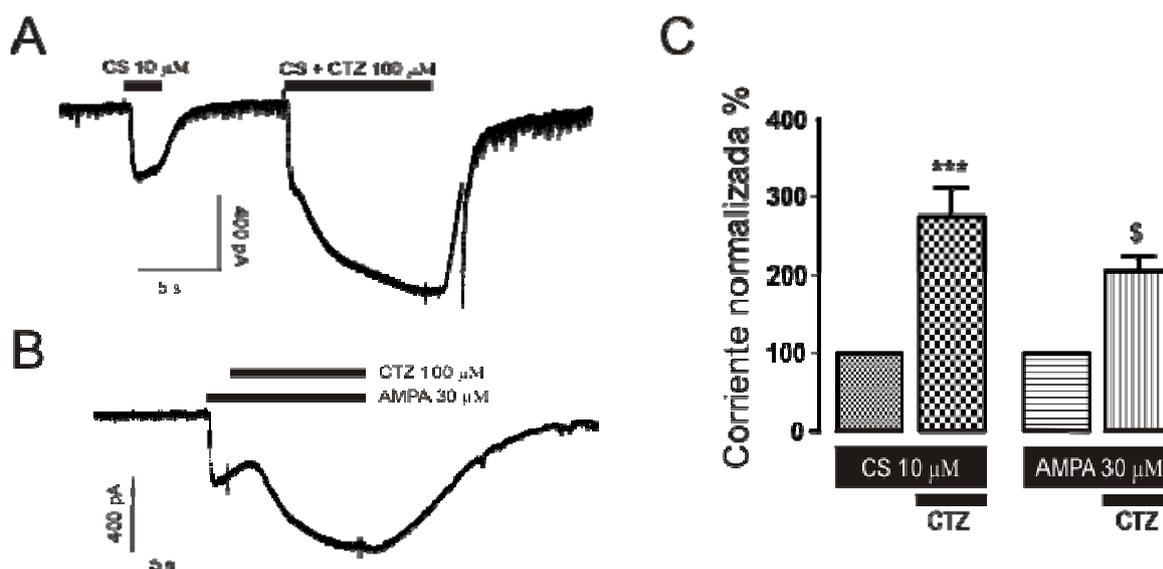


Figura 26. Efecto del modulador positivo de los receptores AMPA; ciclotiazida sobre las corrientes inducidas por CS. **A.** Trazo representativo de una célula a la que se le aplicó tanto un pulso de CS como un pulso de CS + ciclotiazida; la amplitud de esta segunda corriente resultó ser entre 2,5 y 3 veces mayor que la control. **B.** Control en el que la ciclotiazida potenció la corriente provocada por CS. **C.** Diagrama de barras de la intensidad de corriente I_{CS} e I_{AMPA} normalizadas. Potencial de membrana en situación basal, en presencia de CS y CS en presencia del antagonista de los receptores AMPA. Los datos han sido representados como la media \pm E.S.M.; *** $p < 0.001$ respecto al valor basal de la corriente (13 células); \$ $p < 0.05$ respecto a la corriente provocada por AMPA (7 células).

La aplicación de CS produce un incremento transitorio en la concentración citosólica de Ca^{2+} que fue bloqueado por el antagonista de AMPA: CNQX

En este punto de nuestra investigación teníamos caracterizado electrofisiológicamente la respuesta neuronal a la aplicación de CS. Sabemos que el CS está activando tanto receptores de AMPA como los de kainato. La activación de ambos receptores promueve la despolarización neuronal con la consiguiente apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). Además, ciertos subtipos de receptores AMPA son capaces de permeabilizar iones Ca^{2+} .

Por todo ello, consideramos de interés monitorizar la concentración de Ca^{2+} en el citosol y estudiar si la aplicación de CS promueve el transiente de Ca^{2+} esperado, por un

lado, y si son los mismos receptores descritos en los experimentos de electrofisiología los que mediarían esta respuesta, por otro.

Tras aplicar CS sobre esta preparación a distintas concentraciones, constatamos el incremento del catión Ca^{2+} en el citosol. La concentración efectiva 50 para este efecto fue de $6,65 \mu\text{M}$ (figura 27, panel A). Tal y como podemos observar en los paneles B y C de la figura 14, el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico en respuesta a la aplicación de CS a $10 \mu\text{M}$ durante 10 segundos fue prevenido en un $95,4 \pm 1,2 \%$ cuando el pulso venía precedido de la aplicación del antagonista CNQX (figura 27, C y D).

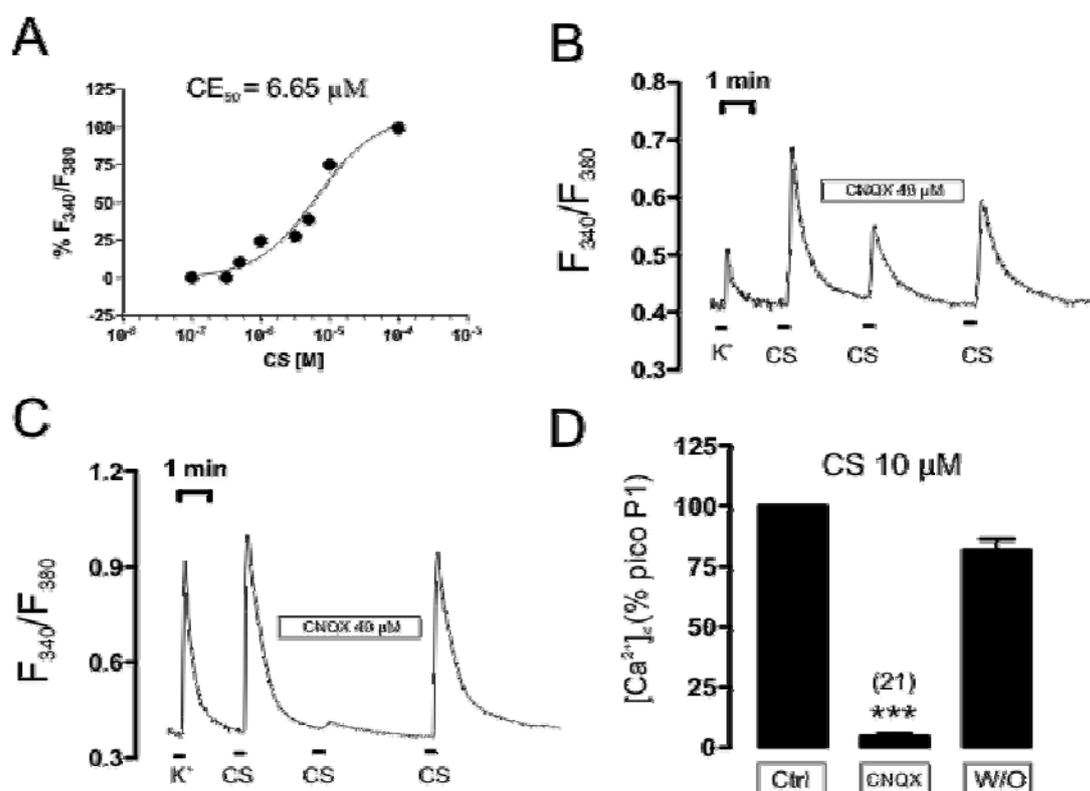


Figura 27. El CS promueve una elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} que se inhibió por la aplicación del antagonista CNQX. **A.** Curva CE_{50} del transiente de calcio citosólico promovido por la aplicación de CS en cultivos de células de hipocampo cargadas con la sonda Fura2-AM. **B y C.** Trazos representativos del incremento del ratio de fluorescencia de la sonda como consecuencia de una elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Se observa que en una población celular hay un bloqueo mayor; estos datos se representan en el diagrama de barras del panel **D**. Los datos han sido representados como la media \pm E.S.M.; *** $p < 0.001$ respecto al pico del pulso 1 (21 células).

En 4 de las 25 células estudiadas el bloqueo por CNQX resultó ser menor (panel B, figura 27) obteniéndose valores de inhibición del $56,28 \pm 2,29\%$ respecto al pulso P1 control. Este hecho nos intrigó y decidimos por ello estudiar en profundidad qué receptores, además de los AMPA y kainato, podían estar mediando esta respuesta.

En la preparación biológica de las células en cultivo podemos encontrar distintos tipos celulares, como se aprecia en la figura 28.

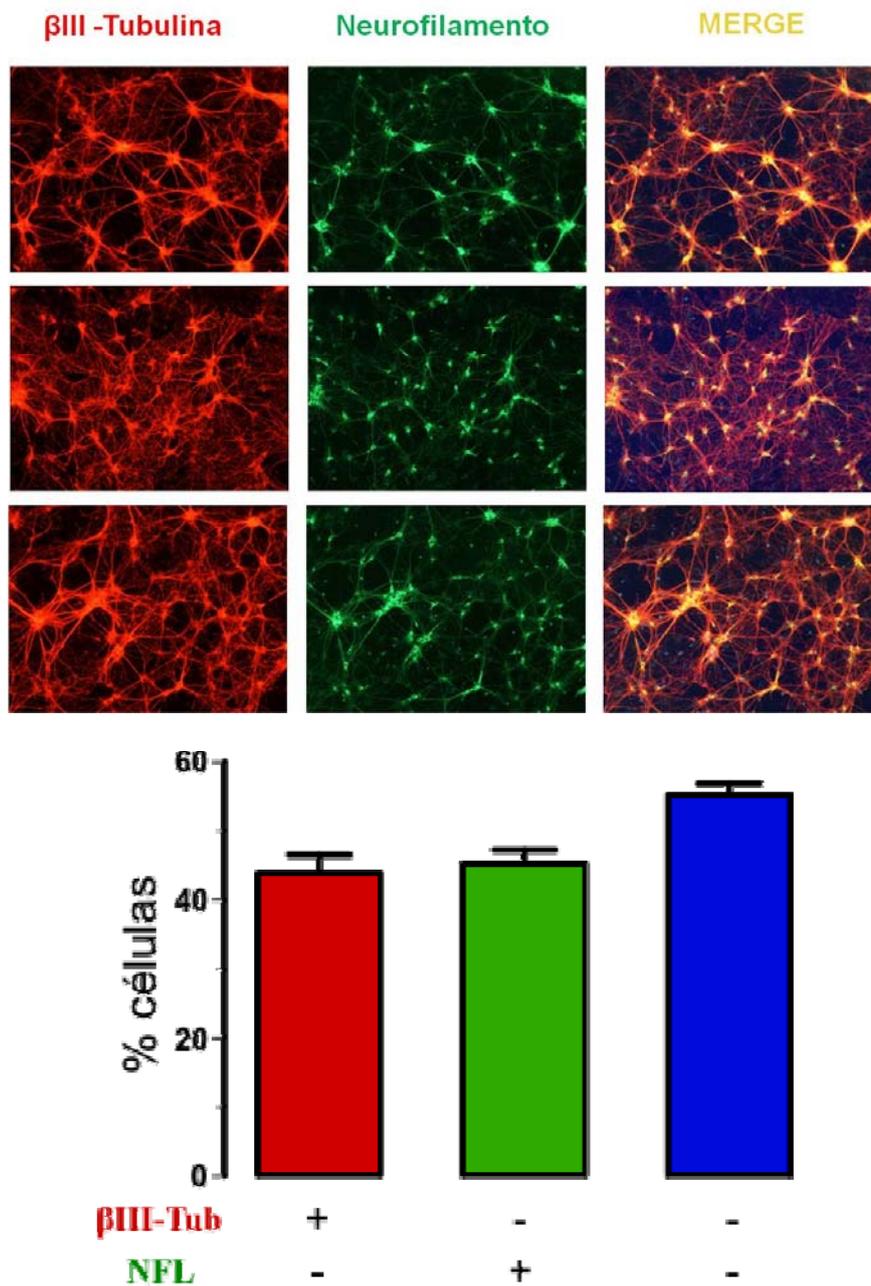


Figura 28. *Inmunohistoquímica del cultivo de células de hipocampo.* A. Se realizó el marcaje de neuronas por medio de dos anticuerpos específicos contra las proteínas β -III tubulina y neurofilamento. El porcentaje de neuronas en este cultivo se cuantificó por el marcaje positivo a cada uno de los anticuerpos y se determinó alrededor del 45% del total de núcleos teñidos con Hoeschst.

Como se aprecia en la inmunohistoquímica del cultivo para β III tubulina y Neu-N, en nuestras condiciones de cultivo encontramos alrededor de un 50 % de células positivas para MAP2 y Neu-N (podrían ser identificadas como neuronas) y el resto de

núcleos, marcados con Hoescht, se correspondería con la glía (tanto astrocitos como microglía).

Uno de los puntos de interés en esta línea de investigación es conocer cómo la estructura de CS y su composición, en concreto referente al patrón de sulfatación que presente la molécula, pudiera afectar a la especificidad de los receptores que el CS activa y la potencia con la que éste lo hace. Por este motivo, incluimos en la continuación de este estudio, dos tipos de CS comercialmente disponibles. Uno de ellos procede de tráquea bovina (TB) y el otro resulta de la extracción de cartílago de tiburón (Johnson y col.) (Sigma aldrich referencias 27042: condroitín-4-sulfato, sal de sodio y C4384: CS de cartílago de tiburón, sal de sodio). El hecho de utilizar ambos tipos de CS se fundamenta en el distinto perfil de sulfatación que presentan estos CS. Como ya se sabe (referencia), el perfil de grupos sulfatos presentes en distintas posiciones del disacárido que constituye el CS influye de manera determinante en su actividad biológica. Por ello, quisimos saber si este patrón diferencial de sulfatación afectaba tanto a las corrientes y despolarización promovidas por la aplicación de CS como a la señal de calcio citosólica que éste promovía. Pero antes de abordar este objetivo necesitábamos conocer el patrón 4/6 sulfato de los distintos CS ya caracterizados y los que pretendíamos estudiar.

Caracterización por resonancia magnética nuclear de la proporción de grupos sulfato en la posición 6 y 4 de dos tipos distintos de CS: procedente de tráquea bovina (tanto de SigmaAldrich como de Bioibérica S.A.) y de cartílago de tiburón.

El CS se caracteriza por ser una molécula extremadamente variable debido a la posibilidad de encontrarse grupos sulfato en las posiciones 2 y 3 del ácido glucurónico y en los carbonos 4 y 6 de la N-acetil-galactosamina (Sugahara y col. 2003). Por ello el CS, que siempre proviene de la extracción de distintos materiales biológicos, representa una familia heterogénea de polisacáridos con distintos patrones de sulfatación, distintos pesos moleculares y distintos grados de presencia de ácido idurónico en lugar de glucurónico. Estas variables dependen de la naturaleza del tejido empleado para su extracción, de la especie utilizada y de su estado de desarrollo (Kuettner 1992).

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica altamente resolutive para la determinación estructural de distintas estructuras químicas. Por ello, utilizamos esta técnica (RMN- ^1H) para determinar la relación de 4S/6S en distintos tipos de CS. Los espectros obtenidos se representan en la figura 29. En el panel A se observa casi la completa superposición de los espectros procedentes de los CS de tráquea bovina tanto el de Bioibérica como el de SigmaAldrich. Sin embargo cuando comparamos los CS de tráquea bovina y de cartílago de tiburón se observan cambios en la intensidad de los picos correspondientes a la sulfatación en posiciones 6 y 4 (figura 29, panel B).

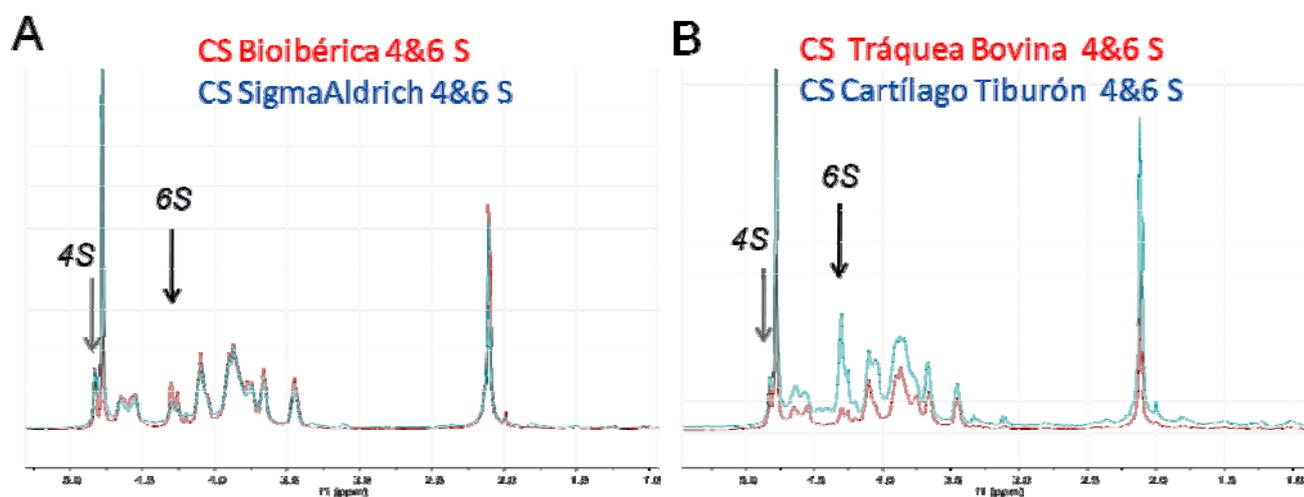


Figura 29. Resonancia de protón de tres tipos de CS. **A.** Por un lado, se comparó las señales de dos CS procedentes de purificación de extractos de tráquea bovina (Bioibérica S.A y SigmaAldrich), Y por otro, **B** se compararon los patrones de RMN de los CS de tráquea bovina y de cartílago de tiburón. En éstos se observa como la señal procedente de la sulfatación en posición 6 es mayor en el CS de cartílago de tiburón. Experimentos realizado en colaboración con el grupo de química de polisacáridos del CSIC (Alfonso Fernandez-Mayoralas y colaboradores).

Integrando las señales de 4.83, 4.30, 4.26, 4.20, 2.12 y 2.10 ppm, se pudo cuantificar la proporción de grupos sulfato en posición 4, 6 y aquellos disacáridos desulfatados. Los resultados de esta cuantificación se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de los distintos tipos de sulfatación encontrados en los CS estudiados

	CS TB Bioibérica	CS TB SigmaAldrich	CS CT SigmaAldrich
Sulfatación en C4	42%	48%	29%
Sulfatación en C6	39%	36%	53%
Desulfatado	19%	16%	17%

Caracterización electrofisiológica de dos tipos de condroitín sulfato

De manera análoga a los experimentos en fijación de corriente y fijación de voltaje realizados con el CS procedente de Bioibérica S.A, realizamos registros de medida de potencial de membrana y de corrientes tras la aplicación de los dos tipos de CS. El tamaño molecular medio para ambas moléculas era de 20 KDa por lo que las concentraciones utilizadas para los experimentos con uno u otro CS eran idénticas en términos de mg/ml.

Como podemos apreciar en la figura 30, la perfusión tanto de CS TB como de CS CT sobre una neurona produjo la activación de una corriente iónica (A, D) y la consiguiente despolarización de la célula (B, E).

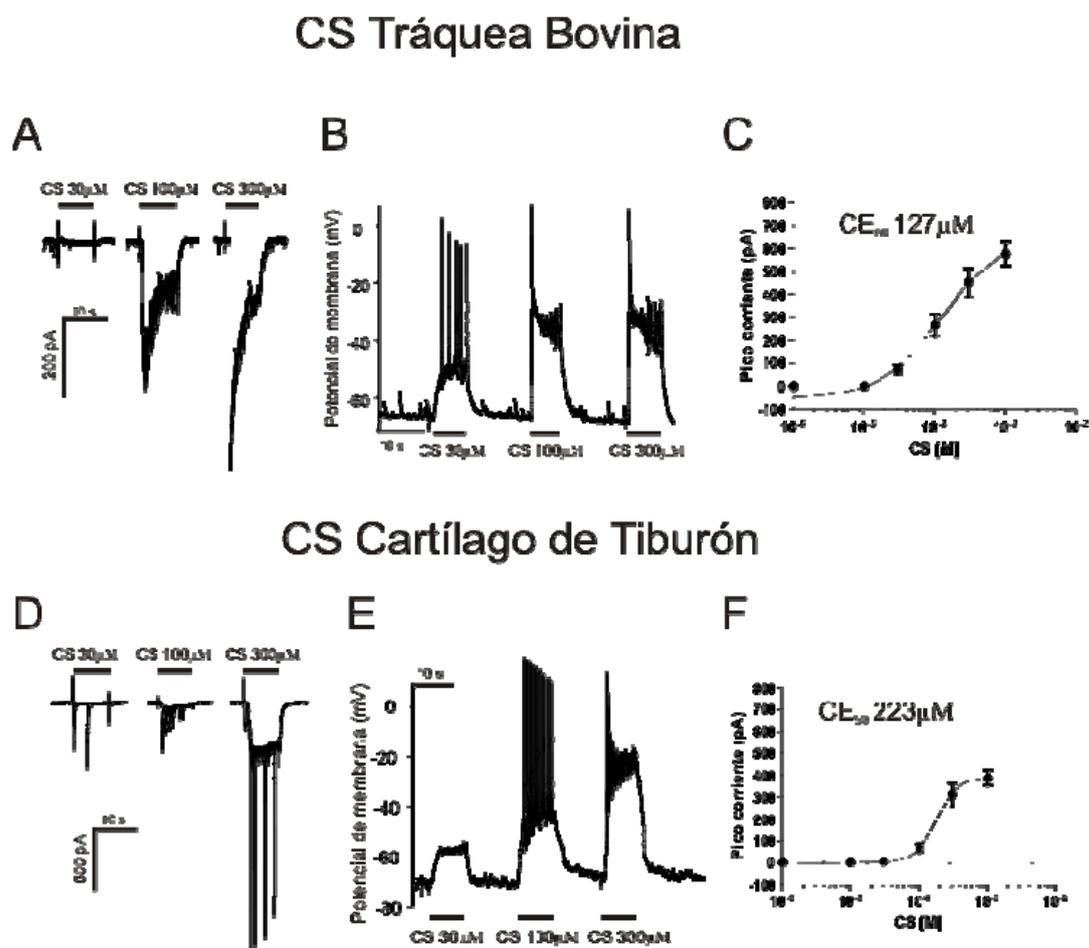


Figura 30. El CS de tráquea bovina y el de cartílago de tiburón inducen corrientes iónicas y despolarización en neuronas de hipocampo *in vitro*. **A** y **D**, experimentos en fijación de voltaje con CS TB y CS CT en los que se observa la activación de la corriente iónica mostrando unos valores de CE_{50} de 127 y 223 μM ; **C** y **F**. Además se representan unos trazados ejemplo de la despolarización promovida por la aplicación de distintas concentraciones de los dos tipos de CS; paneles **B** y **E**.

Observamos que la corriente y la despolarización promovidas por los CS son dependientes de la concentración y mostraron unos valores de EC_{50} del orden de las centenas micromolar; un orden superior el obtenido para el CS de Bioibérica (Figura 3). Este hecho podría encontrar su explicación en la variabilidad estructural inherente a la molécula, el tamaño de la misma o su peso molecular ya que como vimos en los resultados de análisis de RMN el patrón de sulfatación para CS de Bioibérica y CS TB son prácticamente idénticos (Tabla 1). Las diferencias encontradas en los valores de EC_{50} para el CS TB y el CS CT podrían ser atribuidas a las diferencias en el patrón de sulfatación ya que entre estos dos tipos de CS, el ratio 4S/6S es diferente.

El antagonista de receptores AMPA/kainato, CNQX, bloquea la corriente promovida por los dos tipos de CS

Con el objeto de confirmar que la corriente promovida por ambos tipos de CS (TB y CT) también era mediada por los receptores AMPA/Kainato, llevamos a cabo un protocolo experimental similar al de la Figura 22. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 31.

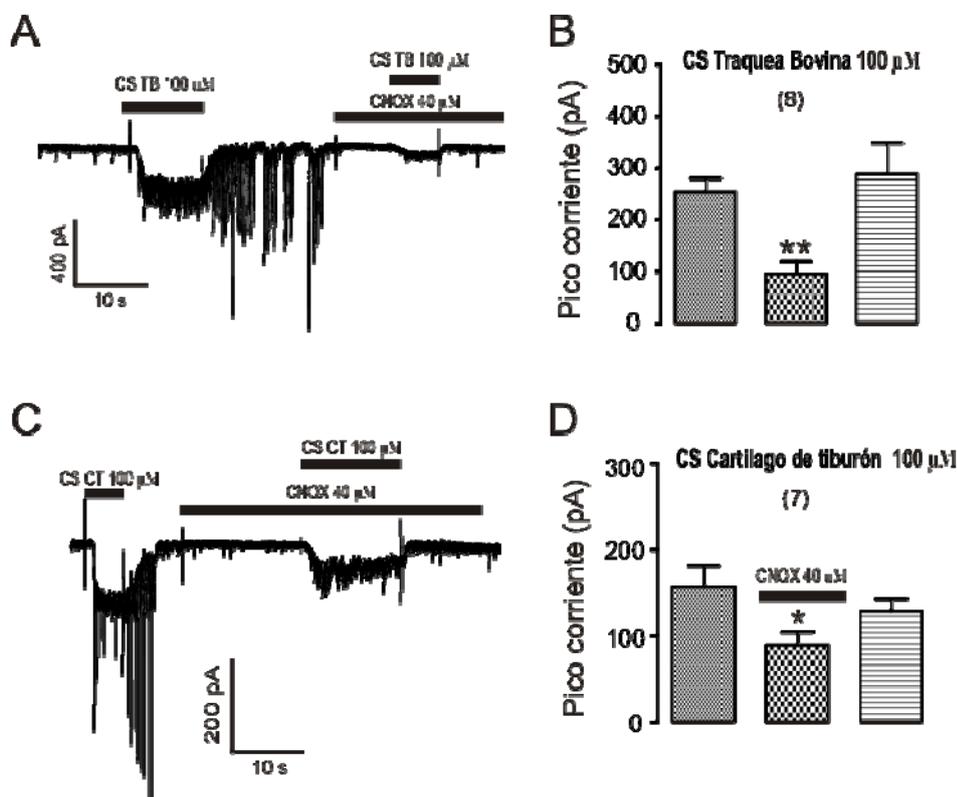


Figura 31. Las corrientes provocadas por CS CT y TB son bloqueadas por CNQX. A y C. Registros ejemplo del protocolo experimental seguido para determinar el efecto del antagonista CNQX sobre la corriente provocada por distintos CS. En B y D se representa la media \pm E.S.M. del conjunto de datos obtenidos de 7 y 8 células respectivamente. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ respecto al valor de la intensidad de la corriente control.

Tras someter a la célula a un primer pulso control, perfundimos el antagonista CNQX unos segundos antes de co-aplicar CNQX junto con el CS, en un segundo pulso. El resultado es el que se observa en los paneles A y C de la figura 31. Tras analizar los datos obtenidos en 8 y 7 células para el CS TB y el CS CT observamos que la corriente se reducía de 236 ± 37 pA a 98 ± 29 pA para el CS TB y de 162 ± 43 pA a 83 ± 19 pA para el CS CT (Figura 31, paneles B y D). En ambos casos pudimos comprobar cómo la respuesta inicial se veía recuperada tras la retirada del antagonista de la solución de baño.

Los distintos tipos de CS promueven señales de calcio citosólicas parecidas, aunque con distinta potencia, en poblaciones de células de hipocampo.

Con el objeto de dilucidar otros receptores que pudieran participar en la señal citosólica de calcio procedimos a realizar medidas de calcio citosólico con la sonda Fluo4-AM en poblaciones celulares. Al utilizar poblaciones celulares perseguimos estudiar la señal de calcio global producida por todos los tipos celulares que se presentan de manera fisiológica en cualquier tejido nervioso de un organismo. Pese a no poder discernir exactamente qué implicación tendría cada subtipo celular: neuronas, microglía, astrocitos y oligodendrocitos en la señal de calcio promovida por CS disponemos de un sistema celular, que aunque alejado de mantener las condiciones del tejido intacto, se aproximaría a la situación que encontramos fisiológicamente con la presencia de los posibles tipos celulares que son responsables de la síntesis de los PGCS y que en caso de rotura de la MEC van a estar en contacto con los productos de degradación de la misma, entre ellos el CS.

En el siguiente grupo de experimentos estudiamos la señal de calcio citosólica en poblaciones de células provocada por la inyección de distintas concentraciones de CS en los pocillos de una placa de 96. Para ello incubamos las células con 3-5 μ M de Fluo-4 AM durante 45 minutos. Tras este periodo, se coloca la placa en el Fluostar y se mide la emisión de fluorescencia a 510 nm tras excitar a 490 nm. El experimento termina con la determinación de la fluorescencia máxima, tras someter a las células a una solución con tritón al 5% y la determinación de la fluorescencia mínima quelando el calcio unido a la sonda con una solución de $MnCl_2$ a 1 M. Así pues los datos de fluorescencia se normalizan en cada pocillo y se representan como porcentaje de la fluorescencia máxima (valor obtenido en presencia de tritón al 5%).

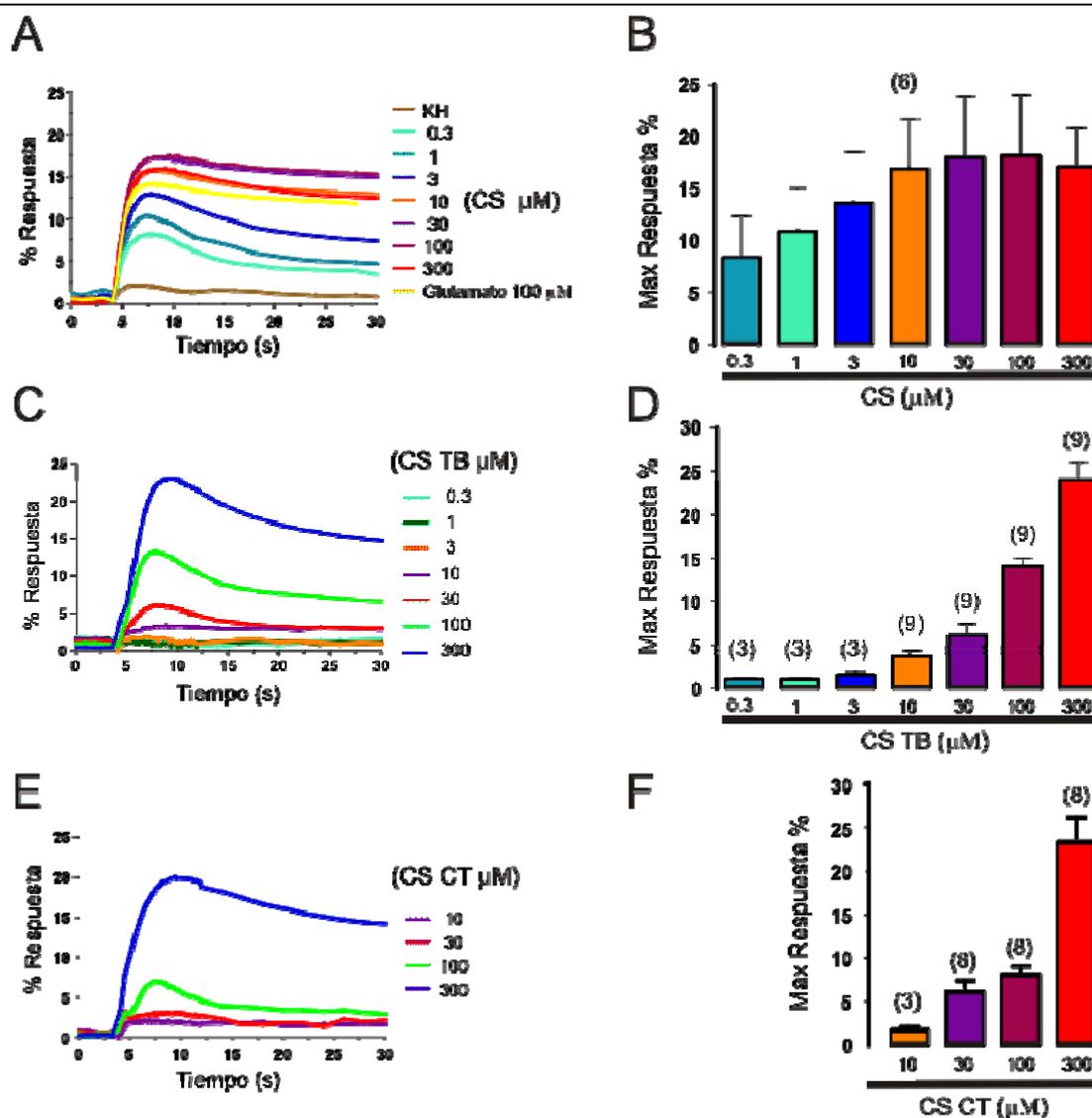


Figura 32. Señales de calcio citosólicas inducidas por distintos tipos de CS. En los paneles A, C y E se muestran los transientes de calcio citosólicos medios tras la estimulación con distintas concentraciones de CS de tráquea bovina de bioibérica (CS, panel A), CS de tráquea bovina de SigmaAldrich (CS TB, panel C) y de CS de cartilago de tiburón también de SigmaAldrich (CS CT, panel E). A la derecha se representan los valores (media \pm E.S.M. del número de experimentos que aparece entre paréntesis) de la máxima fluorescencia obtenida para cada concentración y tipo de CS (B, D y F)

Como podemos comprobar en la figura 19, el CS de Bioibérica promueve el incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) desde 300 nM alcanzando su máximo efecto a la concentración de 30 μM . La inyección de la solución salina, donde se preparaban las distintas concentraciones de CS, no produjo efecto alguno sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Figura 32, paneles A y B). Asimismo, la inyección de CS TB también elevó la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ siendo patente a partir de 30 μM alcanzando su máximo a la mayor concentración probada, 300 μM (Figura 32 paneles C y D). Por su parte, el CS CT también indujo la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, efecto que alcanzó la máxima magnitud a la

mayor concentración de CS CT probada, como se aprecia en la figura 19, en los paneles E y F.

El tratamiento con condroitinasa ABC del CS de tráquea bovina reduce el transiente de calcio promovido por éste.

Tal y como habíamos observado con el CS procedente de Bioibérica quisimos cerciorarnos de que la actividad del CS de tráquea bovina comercial también era susceptible a la digestión enzimática específica por medio de la Condroitinasa ABC.

El experimento se realizó tomando 3 viales de una solución (en este caso era tampón enzimático) de 10 mM de CS TB, a dos de ellos se añadieron 50 mU de ChaseABC y al otro se le añadió el mismo volumen de disolvente pero libre de enzima. Todos los viales se incubaron a 37 °C; a las 6 horas se guardó uno de los viales con Chase a -20 °C y tras 24 horas se hizo lo mismo con el vial control y el que tenía Chase. Partiendo de estas soluciones madre, se prepararon las soluciones de trabajo el mismo día del experimento ([CS] 100 μ M) y fueron las utilizadas como solución de estímulo para medir fluorescencia. Como se observa en la figura 20 el pretratamiento del CS con Chase ya desde las 6 horas reduce un $44 \pm 10,4\%$ la señal de fluorescencia máxima; la incubación durante 24 horas redujo la señal en un $59 \pm 9,5\%$ (Figura 33).

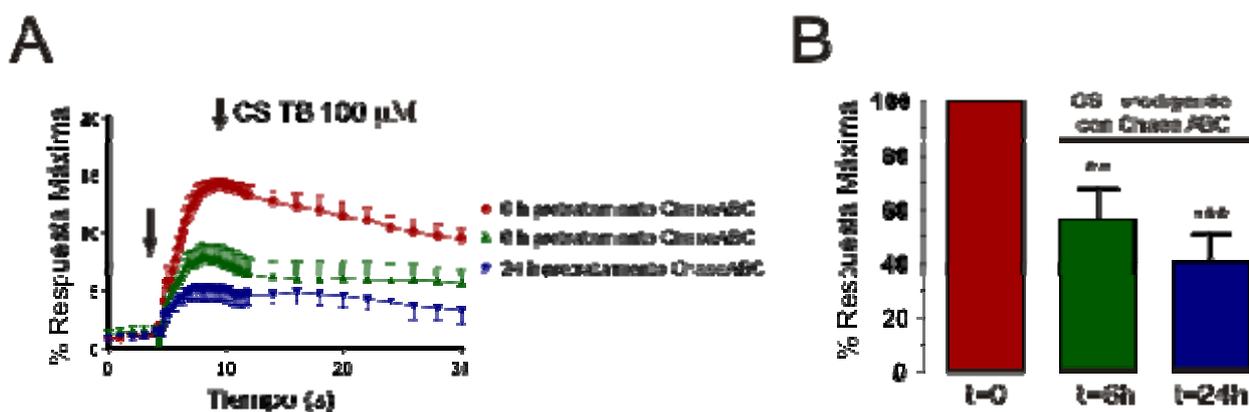


Figura 33. Efecto de la digestión enzimática del CS de tráquea bovina sobre las señales de calcio en poblaciones celulares. La señal citosólica de calcio se vio disminuida cuando digeríamos previamente el CS de forma específica con la enzima Condroitinasa y este efecto fue proporcional al tiempo de digestión utilizado (A y B).

Los antagonistas de los receptores de AMPA/kainato y de NMDA bloquean la señal de CS de tráquea bovina y de glutamato

Una vez caracterizados los distintos tipos de CS y habiendo corroborado la participación de los receptores AMPA/kainato en la despolarización y la corriente generadas, quisimos determinar de que forman participaban estos receptores en el transiente de calcio en poblaciones celulares. De forma paralela realizamos la misma caracterización de los antagonistas frente al agonista fisiológico glutamato a la concentración de 100 μM .

En esta preparación, la inyección de 100 μM de glutamato produjo la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ hasta un 25% tomando, como ya se ha explicado, como 100 % la señal de fluorescencia máxima de toda la sonda presente en la muestra (Figura 34, panel A, trazo azul).

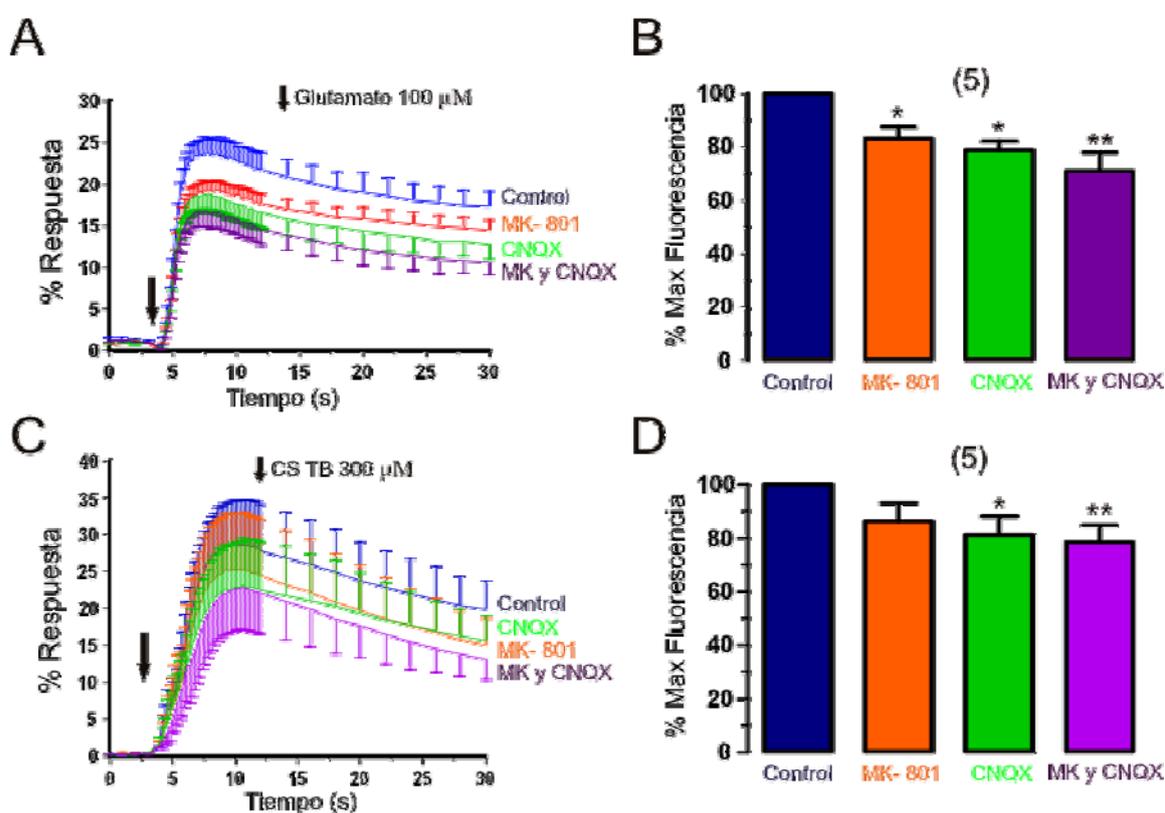


Figura 34. Efecto de los antagonistas de los receptores AMPA/Kainato y NMDA sobre las señales de Ca^{2+} citosólicas en poblaciones celulares tras la aplicación de CS TB y glutamato. A y C muestran los trazados originales de los transientes de calcio generados tras la aplicación de glutamato o CS. En B y D se representan en diagrama de barras los datos normalizados de 5 experimentos. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ respecto al valor de la intensidad de la señal fluorescencia en ausencia de antagonistas.

La presencia del antagonista de los receptores NMDA: MK-801 a 3 μ M, bloqueó la señal de fluorescencia máxima normalizada un $17 \pm 4,4$ % y el bloqueo de los receptores AMPA/kainato con CNQX a 40 μ M redujo esta señal en un $21 \pm 3,3$ %. De forma conjunta, ambos antagonistas bloquearon la fluorescencia máxima alcanzada tras la aplicación de glutamato en un $29 \pm 6,7\%$ (figura 34, paneles A y B).

Cuando se utilizó como estímulo el CS TB a 300 μ M, los antagonistas bloquearon el transiente de calcio, producido por éste, de forma parecida; mientras que el CNQX y los dos antagonistas en combinación bloquearon un $17 \pm 5,1\%$ y un $24 \pm 7,2$ % respectivamente, el MK-801 no bloqueó de forma significativa la señal de fluorescencia máxima siendo la reducción de un $15 \pm 6,6$ %.

Una vez más los resultados obtenidos apuntan a la participación de los receptores AMPA y kainato en la respuesta mediada por CS TB. Pero además, este experimento pone de manifiesto un hecho, al menos curioso, y es que gran parte del transiente de calcio obtenido en poblaciones de células de hipocampo, bien usando glutamato o CS TB como estímulos, no está mediado por receptores ionotrópicos (figura 34, trazados y columna púrpura) y que la familia de receptores acoplados a proteínas G o metabotrópicos estarían tomando un papel protagonista y/o mayoritario al menos, para el caso del agonista fisiológico de estos receptores, el glutamato. Siguiendo este razonamiento casi que la pregunta viene sola; ¿Estarían los receptores metabotrópicos participando también en la señal de calcio citosólica?. Si esto fuera así, una parte del transiente de calcio vendría de la liberación de depósitos intracelulares, del retículo endoplásmico (RE) principalmente. Por ello decimos caracterizar el efecto de la concentración de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_e$) en el incremento de calcio citosólico producido por CS.

Las señales de calcio promovidas por CS se ven afectadas por la concentración extracelular del catión que, tras el estímulo, permea hacia el citosol a través de canales de calcio dependientes de voltaje

La activación de receptores AMPA/kainato y también la aplicación de CS promueven la despolarización de la neurona (Figura 15) y por tanto la apertura de los CCDV. En las neuronas de hipocampo encontramos 2 tipos mayoritariamente, el Cav 1 (corriente tipo L) y el Cav 2 (corriente N, P/Q y R). En teoría, la aplicación de CS sobre

poblaciones de células de hipocampo, estaría promoviendo la activación de los mismos. Como las teorías carecen de significancia en ausencia de datos que la soporten, decidimos realizar los experimentos oportunos. Así, y como se observa en la figura 22, tanto los antagonistas de canal L (nifedipino, 3 μ M) y de N - P/Q (MVII-C, 2 μ M) como un bloqueante inespecífico de los CCDV, (cadmio, 100 μ M) redujeron el transiente de calcio citosólico promovido por CS TB (figura 35, A y B).

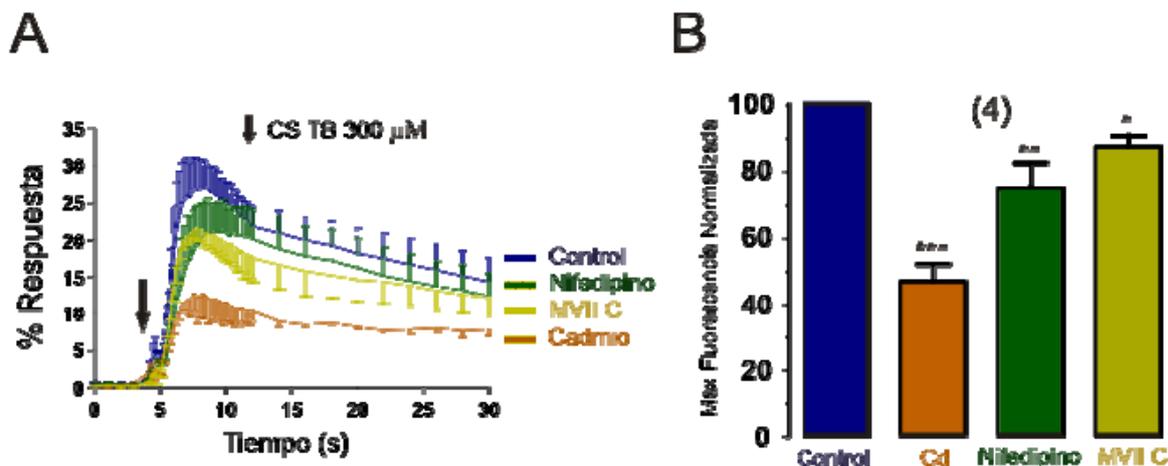


Figura 35. Efecto del bloqueo de los canales de calcio sobre el transiente de calcio promovido por la aplicación de CS TB. **A**, Trazados originales del transiente de calcio en presencia y ausencia de distintos antagonistas de los CCDV y diagrama de barras con los datos normalizados de la fluorescencia máxima, **B**. ***p<0.001, **p<0.01 y *p<0.05 respecto al valor de la intensidad de la señal fluorescencia en ausencia de antagonistas.

Con la certeza de la participación de los CCDV en el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ nos dispusimos a determinar, ahora sí, la influencia de la $[Ca^{2+}]_e$ en el transiente de $[Ca^{2+}]_c$.

En la figura 35 se representan los datos obtenidos tras realizar la medida de $[Ca^{2+}]_c$ en cuatro soluciones distintas con: 10, 2, 0 mM $[Ca^{2+}]_e$ y 0 mM $[Ca^{2+}]_e$ + EGTA a 1 mM, un quelante de Ca^{2+} que nos asegura la ausencia total del catión libre en la solución.

Los datos obtenidos se representan como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) ya que al ser imposible determinar el dato de fluorescencia máxima cuando la solución lleva EGTA, no se puede normalizar cada pocillo con respecto a la señal máxima. Así pues, y con el objeto de comparar los datos procedentes de cada tratamiento los datos de la figura 23 han sido todos representados como UAF.

Como se aprecia en los trazos originales de los paneles A y C (Figura 35) el incremento en 5 veces de la $[Ca^{2+}]_e$ hasta 10 mM provocó un ligero aumento en el pico de la $[Ca^{2+}]_c$ que se mantuvo durante los 30 s del periodo de registro tanto para el CS

TB como para el CS CT. Asimismo, la reducción o eliminación del catión del medio extracelular redujo el transiente de $[Ca^{2+}]_c$ pero no fue suficiente para abolirlo por completo (Figura 35, A y C). Cabe destacar que no parecen existir diferencias entre las soluciones 0 mM Ca^{2+} y 0 mM Ca^{2+} + EGTA; por lo que para el glutamato sólo se estudió la comparación 2 y 0 mM $[Ca^{2+}]_e$. El resultado fue el esperado y cualitativamente similar al obtenido con los estímulos de CS.

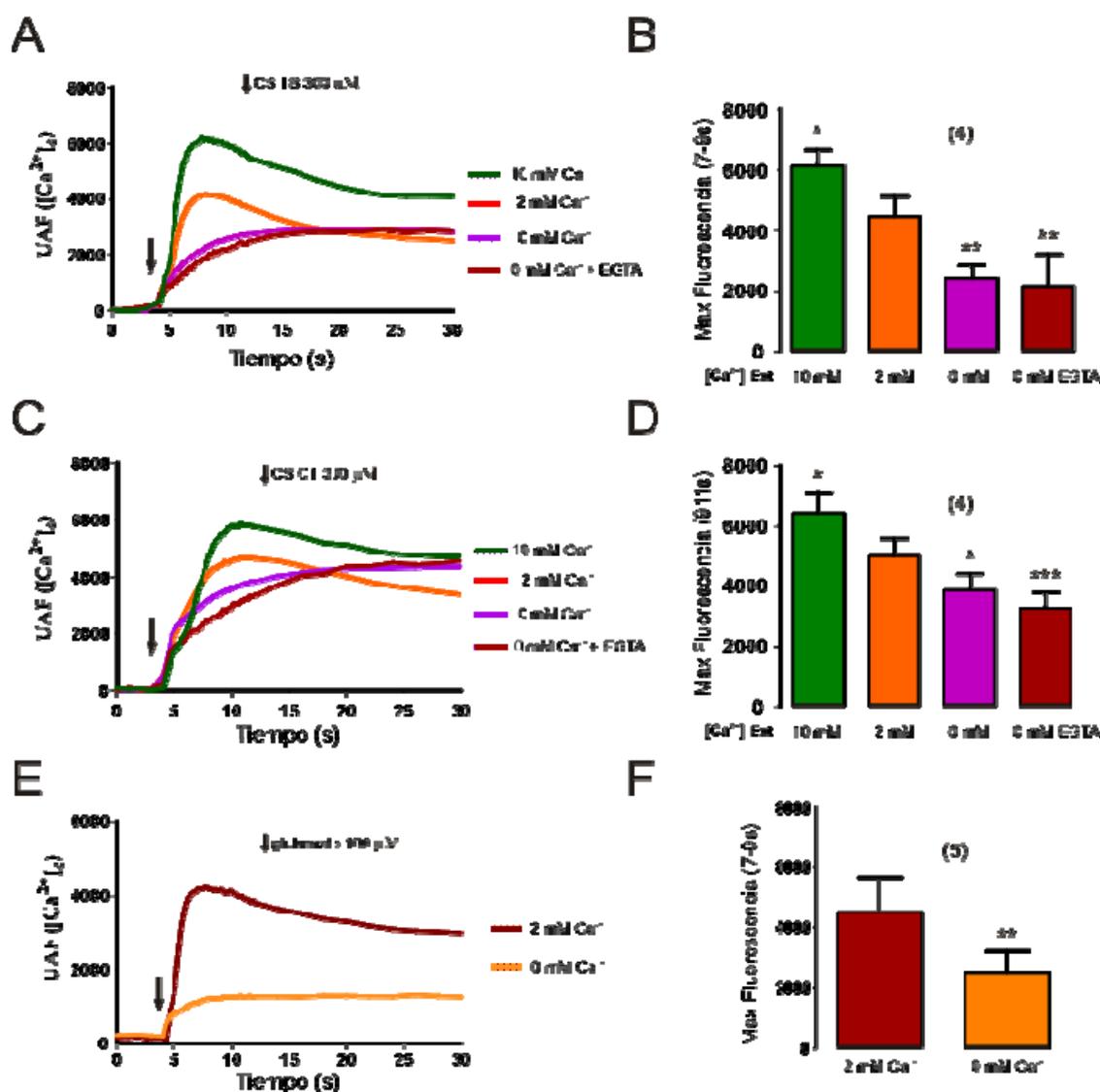


Figura 36. La concentración extracelular de Ca^{2+} afecta al transiente de calcio citosólico promovido por CS. A, C y E trazos originales del incremento de la fluorescencia tras los estímulos de CS TB, CS CT y glutamato respectivamente en presencia de distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular. En B, D y F se representan los datos de fluorescencia en los tiempos donde a 2 y 10 mM alcanza el pico de fluorescencia, procedentes de 4 y 5 experimentos. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ respecto al valor de la intensidad de la señal fluorescencia en 2 mM de Ca^{2+} .

Como se observa en la figura, tanto el CS como el glutamato, aún en ausencia de calcio extracelular, son capaces de promover una elevación de la $[Ca^{2+}]_c$; este efecto

invita a pensar que el CS de forma análoga al glutamato también estaría movilizando calcio desde depósitos intracelulares.

Los receptores metabotrópicos para glutamato participan en el transiente de calcio promovido por CS

En este punto de nuestra investigación, los resultados que estábamos obteniendo nos empujaban a clarificar la participación de los receptores metabotrópicos para glutamato (mGlu) en el efecto del CS. Para ello, nos valimos del antagonista LY341495 (LY) que a la concentración de 100 μM resulta inespecífico para el bloqueo de todos los receptores metabotrópicos (Grupos I, II y III) (Bortolotto y col. 1999). También usamos la combinación de MTEP e YM298198 (Wang y col.) a 200 nM cada uno como antagonistas selectivos de mGlu 5 y mGlu 1 (Grupo I) respectivamente. Éstos últimos, por medio de la activación de la fosfolipasa C (PLC) producen un incremento de los niveles de inositol trifosfato (IP_3) intracelulares y la activación de los receptores IP_3 del RE promoviendo la salida de Ca^{2+} desde la organela hacia el citosol.

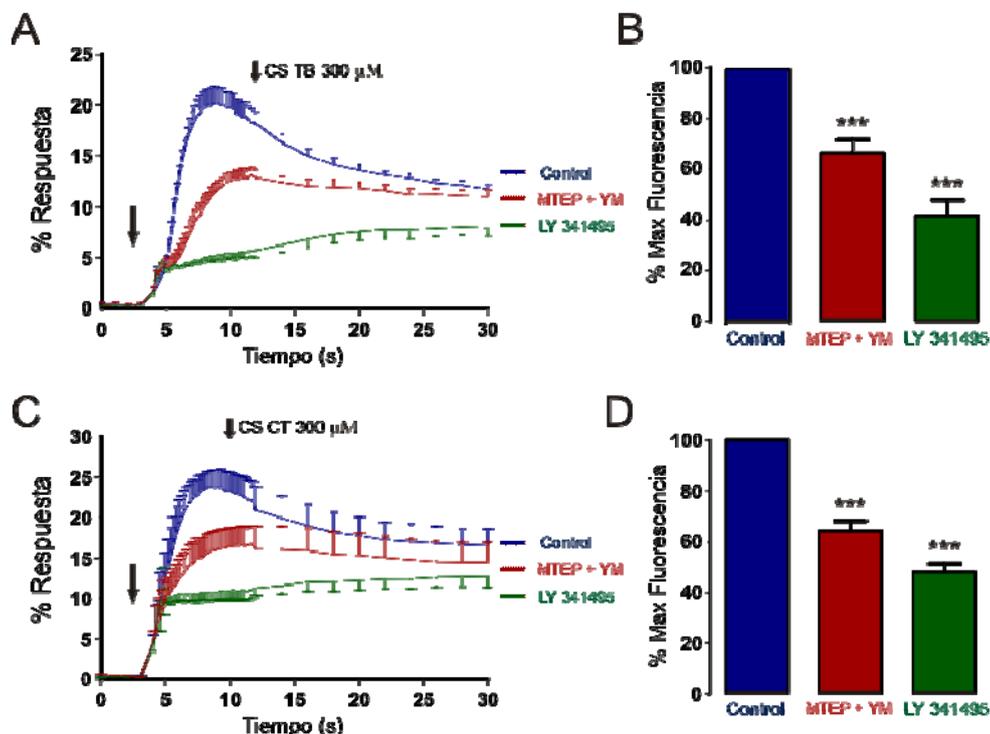


Figura 37. Efecto del bloqueo de los receptores metabotrópicos sobre el transiente de calcio generado por ambos tipos de CS. **A** y **B**: registros de la cinética del transiente de calcio citosólico en presencia de distintos antagonistas de los mGlu. En **B** y **D** se representan en diagrama de barras los datos normalizados del pico de fluorescencia de 6 experimentos independientes por triplicado. *** $p < 0.001$, respecto al valor de la intensidad del pico de fluorescencia en ausencia de fármacos.

En presencia de LY, la aplicación de CS TB a 300 μM produjo un transiente de calcio que se vio reducido un $59 \pm 6,2\%$ en su pico máximo. Cuando se incubaron las células con la mezcla de los antagonistas selectivos para los receptores mGlu del grupo I, MTEP e YM, la señal máxima de fluorescencia obtenida tras la aplicación de CS TB se redujo en un $34 \pm 5 \%$ (Figura 24, paneles A y B). Para el estímulo de CS CT los resultados obtenidos fueron semejantes; la incubación con LY redujo el pico de fluorescencia máximo promovido por CS CT en un $52 \pm 3,4\%$ y la mezcla de MTEP e YM un $46 \pm 4,3 \%$ (Figura 37, paneles C y D).

La diferencia en el bloqueo entre ambos tratamientos podría ser atribuido a que el compuesto LY además de bloquear todos los receptores metabotrópicos pudiera inhibir los receptores ionotrópicos. Para descartar esta posibilidad, estudiamos el efecto del antagonista usando el agonista fisiológico glutamato a 100 μM (figura 38, A y B).

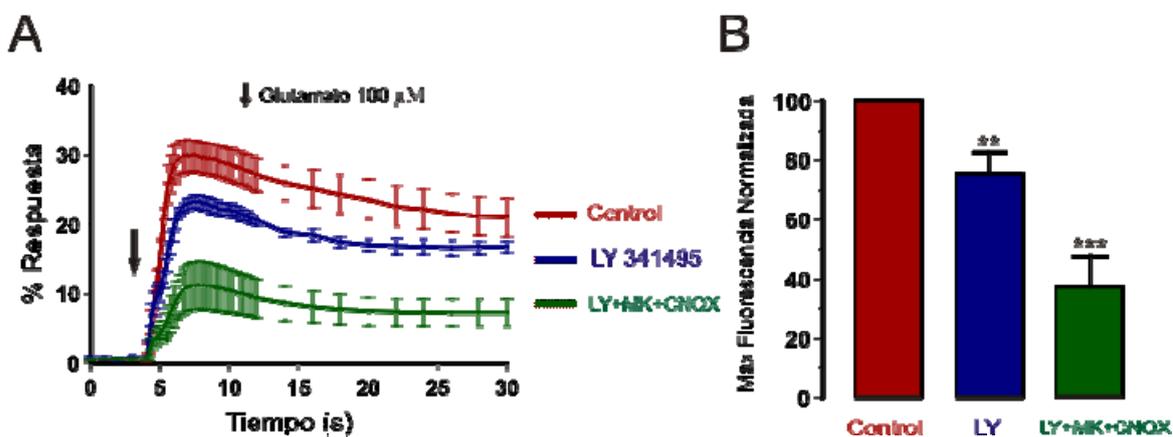


Figura 38. Efecto del bloqueo de los receptores metabotrópicos sobre el transiente de Ca^{2+} generado por glutamato con LY y su interacción con los receptores ionotrópicos. En **A**, se muestra el registro medio del incremento de fluorescencia tras el estímulo de glutamato, resultado de 5 experimentos por triplicado. En **B**, se muestran el conjunto de datos normalizados; entre el tratamiento con LY y el LY + MK + CNQX la p resultó ser $< 0,05$. $***p < 0,001$ y $**p < 0,01$ respecto al control.

Como se aprecia en la figura 24, la presencia del antagonistas de los receptores mGlu, LY, produjo un bloqueo de un $25 \pm 4\%$ en el pico de fluorescencia máximo generado por la aplicación de glutamato. Con el objeto de saber si este compuesto estaba bloqueando además los receptores ionotrópicos, medimos el transiente de Ca^{2+} en presencia de una mezcla de fármacos que incluía antagonistas selectivos para el receptor NMDA, el MK-801 a 10 μM , y para los receptores AMPA/kainato, el CNQX a 40 μM . En estas condiciones, el transiente de Ca^{2+} se vió bloqueado un $63 \pm 9,5 \%$. Este dato resultó ser diferente al bloqueo con sólo LY con una significancia estadística de $p < 0,05$.

Este dato, por tanto, nos proporciona cierta certeza de que el compuesto LY no está bloqueando los receptores ionotrópicos pues si fuera así, los antagonistas selectivos para ellos, MK y CNQX, no habrían ejercido un bloqueo adicional sobre la señal de fluorescencia.

La activación de la fosfolipasa C (PLC) está implicada en el incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} promovido por los dos tipos de CS

Todos los mGlu están acoplados a un sistema de proteínas G, a través de las cuales promueven la generación de segundos mensajeros, responsables a su vez, de mediar la respuesta intracelular. Mientras que los mGlu del grupo I se acoplan y activan la PLC, los del grupo II y III al activarse inhiben la adenilato ciclasa (AC).

Así pues y con el objetivo de recabar una evidencia adicional sobre la participación de esta ruta en la señal de Ca^{2+} citosólica producida por los dos tipos de CS, usamos el fármaco U73122 (U 122) a 20 μM , un bloqueante de la actividad enzimática de PLC. Su acción se produce impidiendo la unión de la subunidad αG_q a la PLC por lo que impide la ruptura del PIP_2 anclado a membrana y por consiguiente, inhibe la producción de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e IP_3 , es decir, impide la activación de PKC y el aumento de Ca^{2+} citosólico. Como control de especificidad, usamos el enantiómero inactivo U73343. Como se ve en la figura 39, la incubación del antagonista U122 bloqueó un $61 \pm 6,2 \%$ la señal promovida por CS TB (paneles A y B). Este mismo tratamiento frente al estímulo de CS CT produjo un bloqueo del $56 \pm 14 \%$ del pico de fluorescencia máxima. En los dos grupos de experimentos se puso la mezcla de antagonistas de los mGlu del grupo I para comparar el bloqueo con el U122. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas (paneles B y D).

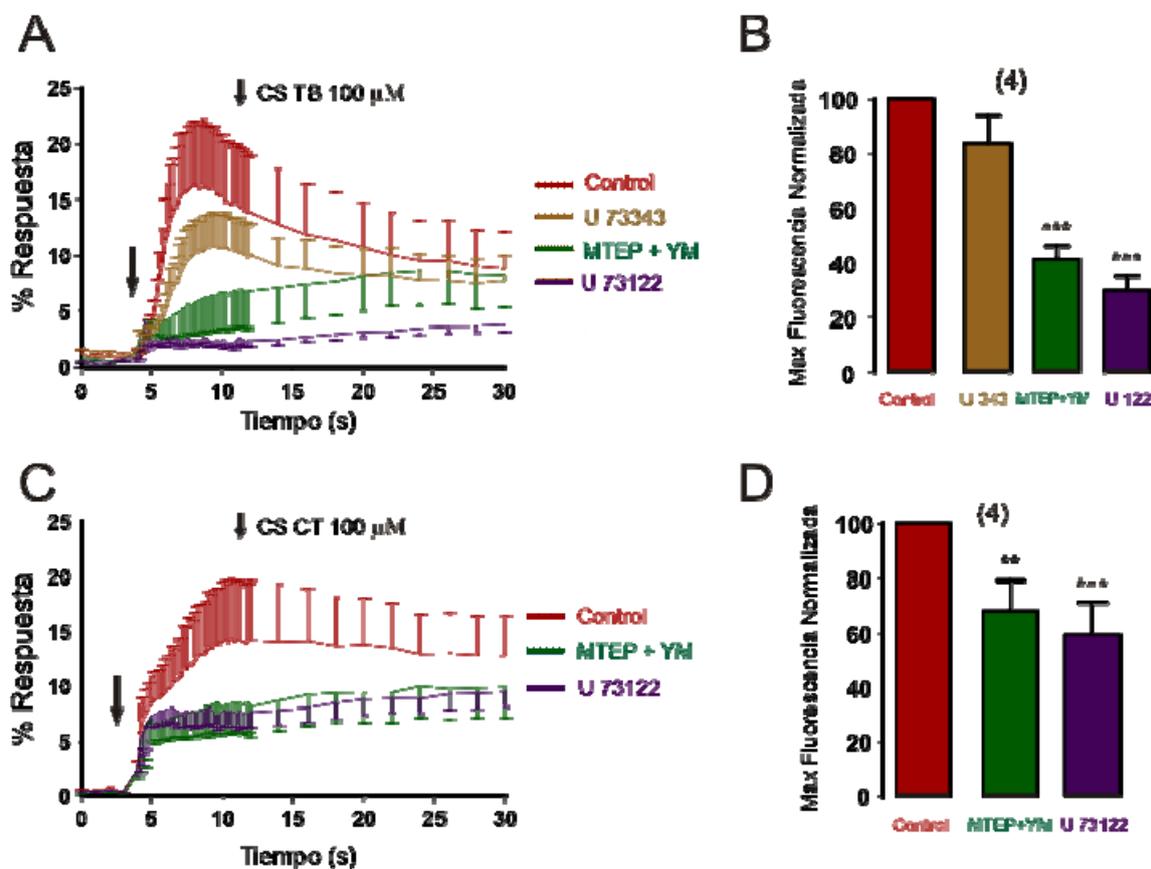


Figura 39. Efecto del bloqueo de la PLC sobre el transiente de Ca^{2+} promovido por CS. A y B cinéticas del transiente de Ca^{2+} en presencia y ausencia de los distintos tratamientos. C y D diagrama de barras que muestran los datos de 4 experimentos independientes por triplicado. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ respecto al valor de la intensidad del pico de fluorescencia en ausencia de fármacos (control).

El tratamiento de los cultivos celulares con glutamato durante 24 horas induce un aumento de la muerte celular.

Se sabe que una elevación de la concentración citosólica de calcio mantenida en el tiempo resulta citotóxica para la célula. En este sentido, niveles elevados de glutamato se ha relacionado con procesos de toxicidad en el SN. Por ello quisimos saber en nuestro sistema biológico cómo se afectaba la viabilidad celular tras exponer al cultivo a distintas concentraciones del neurotransmisor durante un periodo de 24.

Así pues, en el sometimos al cocultivo de neuronas y glía de hipocampo de 7 días a concentraciones crecientes de glutamato durante 24 horas. Tras este tiempo, medimos la liberación al medio extracelular de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Cuando la célula sufre un estímulo tóxico agudo (glutamato durante 24 h), las enzimas citosólicas, entre las que se encuentra la LDH, se liberan al medio de cultivo. La medición de la actividad de esta enzima se correlaciona con el daño producido.

Como se observa en la figura 40, el tratamiento del cultivo con concentraciones de glutamato, en un rango de entre 1 μ M y 10 mM, produce un incremento de la actividad LDH que depende de la concentración de glutamato utilizada. La representación del porcentaje de LDH liberada (tomando como medida de LDH total la obtenida tras la lisis de todas las células del pocillo) respecto al logaritmo de la concentración de glutamato utilizada nos da una curva dosis-respuesta. La concentración a la que se observa la mitad del efecto máximo es la dosis letal 50 (DL₅₀); concentración resultó ser de 32,96 μ M (figura 40, panel E).

Además probamos los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato; el MK-801 y el NBQX. Pudimos comprobar que solo el pretratamiento con el antagonista de los receptores NMDA es capaz de prevenir el incremento de LDH que se libera al medio tras la incubación con 100 μ M durante 24; por el contrario, el bloqueo de los receptores AMPA no ejerce tal efecto (figura 40, panel F).

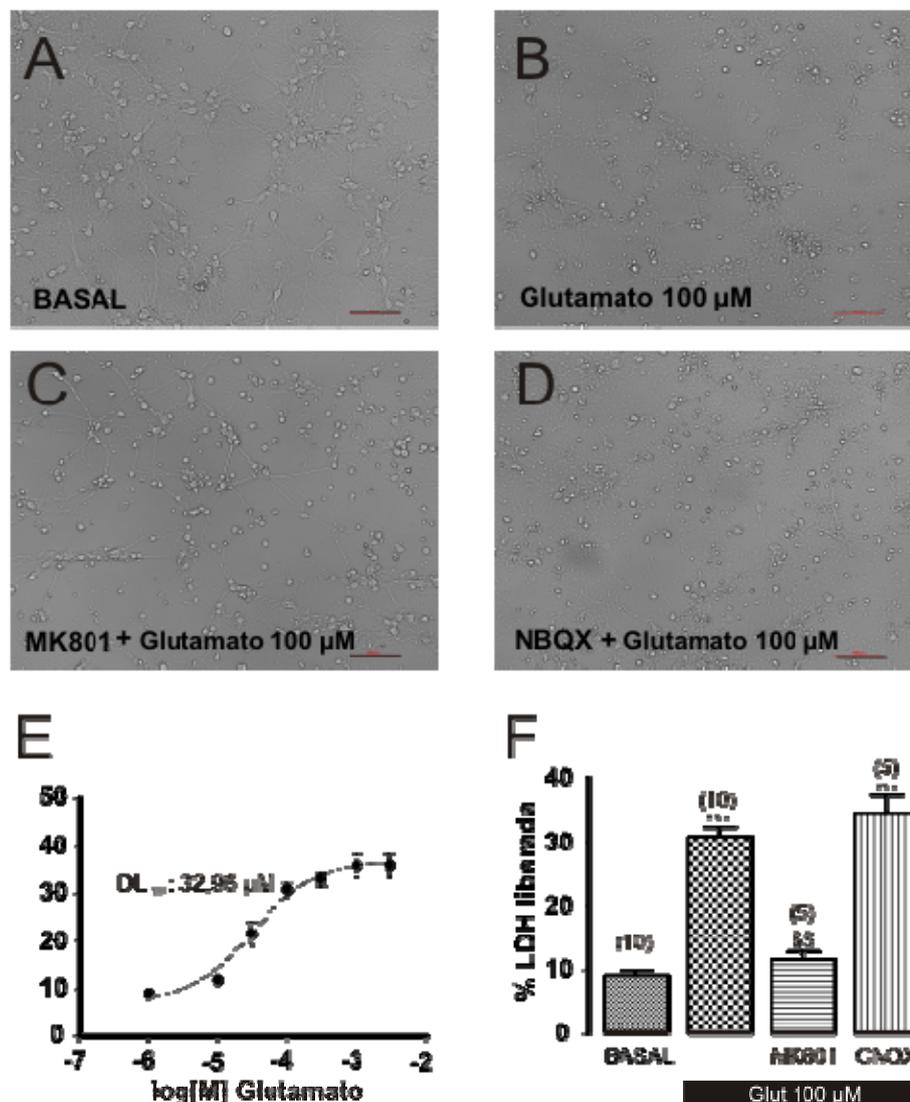


Figura 40. Medida de la actividad de la LDH extracelular en neuronas/glia tras el tratamiento con glutamato durante 24 horas. A, B, C y D; imágenes representativas de los cultivos en las distintas condiciones experimentales. E, curva dosis-respuesta de la LDH liberada tras 24 horas de incubación con distintas concentraciones de glutamato. F, efecto de los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato sobre la LDH liberada. *** $p < 0.001$, respecto al valor basal de la LDH en ausencia de glutamato. \$\$ $p < 0.01$, respecto al tratamiento con 100 μM de glutamato.

El tratamiento de los cultivos celulares con condroitín sulfato más glutamato disminuye la viabilidad celular cuando se aplican a concentraciones donde cada estímulo por separado no tienen efecto

Ya que hemos observado que el CS produce elevaciones del calcio citosólico con cinéticas parecidas a las producidas por el estímulo fisiológico, quisimos saber que ocurría con la viabilidad celular en estas condiciones y si existía alguna relación entre ambos estímulos.

En esta ocasión nos valimos de la técnica de la reducción de la MTT para determinar la viabilidad celular en nuestras condiciones experimentales. Cabe reseñar que aunque ambas medidas, MTT y LDH, infieren el número de células saludables, cada una se sustenta en un fundamento bioquímico diferente. Mientras que la LDH mide la cantidad de enzima que ha sido liberada por las células que por el estímulo tóxico han sufrido una rotura de la membrana plasmática, la MTT mide la actividad de las mitocondrias. Si hay menos células viables, el número de mitocondrias activas se reducirá en consecuencia y observaremos una disminución de la señal de MTT.

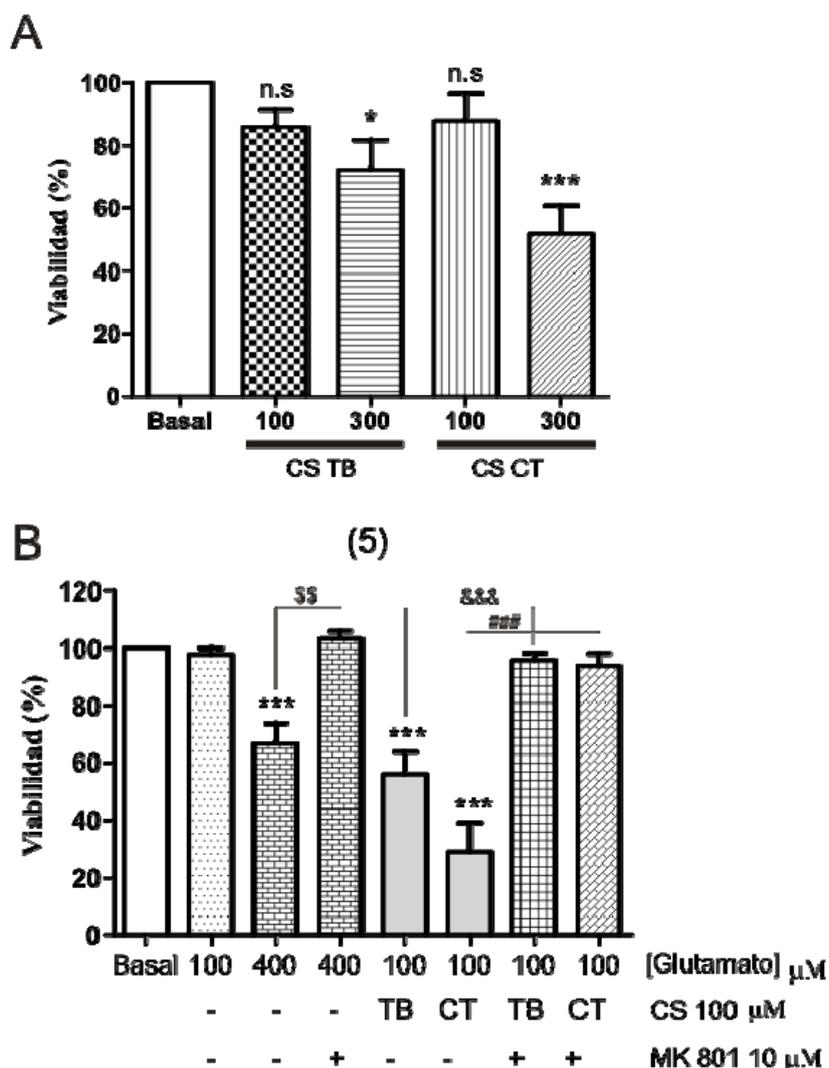


Figura 40. Medida de la señal de MTT en cultivos de neuronas/glia tras el tratamiento con condroitín sulfato y CS más glutamato durante 24 horas. **A**, medida de MTT tras la incubación de los cultivos con distintas concentraciones de CS TB y CS CT. **B**, efecto de la coincubación con concentraciones subefectivas de CS y glutamato. Además se representan los datos de la viabilidad celular cuando se sometían las células a una preincubación del MK-801 previa al tratamiento con CS más glutamato. *** $p < 0.001$, respecto al valor basal de MTT en ausencia de tratamiento \$\$ $p < 0.01$, respecto al tratamiento con 400 μM de glutamato, &&& $p < 0.001$ respecto al tratamiento de CS TB más glutamato, ### $p < 0.001$ respecto al tratamiento de CS CT más glutamato.

Como podemos observar en la figura 41, el tratamiento durante 24 con los distintos CS a 100 μ M no produjo efecto significativo sobre la señal de MTT. En cambio, el tratamiento con concentraciones de CS a 300 μ M redujo de manera significativa la viabilidad celular en nuestros cultivos (panel A, figura 41).

En el panel B de la misma figura se representan los datos de viabilidad celular tras la incubación de las células con distintos tratamientos durante 24 horas. Mientras que el glutamato no redujo de manera significativa la viabilidad celular, cuando se aplicaba conjuntamente con el CS TB o el CS CT, la señal de MTT se veía significativamente reducida. Este efecto se veía prevenido cuando se sometía a las células a una incubación de MK-801 previa a los tratamientos de co-incubación glutamato-CS (figura 41, panel B).

DISCUSIÓN

El trabajo en esta Tesis presentado reviste interés desde el punto de vista fisiológico ya que el CS está presente de forma natural en diferentes espacios extracelulares de una gran variedad de tejidos: cartilago, tejido conectivo, dermis... etc. Concretamente los CSPG tienen un papel importante en el SN ya que abundan en la MEC de este tejido no sólo formando parte estructural de las moléculas que forman la MEC sino mediando efectos concretos y específicos no atribuidos a otras moléculas. Además, los resultados obtenidos destacan por aportar nuevas dianas, hasta el momento desconocidas, sobre las que el CS endógeno podría estar mediando su actividad.

CS y cicatriz glial

El CS y los PGCS han sido moléculas muy estudiadas en el campo de la neurociencia debido, en parte, a la observación realizada por el grupo de Silver cuando descubrieron que tras una lesión en el SN, el tejido cicatricial ahí formado, presenta una gran cantidad de PGCS que resultan inhibidores para la regeneración axonal (Rudge y col. 1990). Esta sobreexpresión es consecuencia de la proliferación de astrocitos y células precursoras de oligodendrocitos que responden al estímulo dañino generando PGCS asociados al tejido cicatricial (Silver y Miller 2004). Esta regulación al alza de PGCS, es ya patente a las 24 horas después del daño y puede perdurar hasta varios meses en animales maduros (Jones y col. 2003). Curiosamente, la glía reactiva embrionaria no sintetiza ni secreta PGCS tras un daño (McKeon y col. 1991) y tampoco se encuentra este fenómeno en especies poiquilothermas (Reier 1979). Estas moléculas crean un gradiente que es máximo en el centro de la lesión y disminuye gradualmente hacia el área de penumbra.

Además de prevenir la regeneración, datos recientes apuntan al papel beneficioso de esta hiperproliferación de la astroglia para formar el tejido cicatricial y estabilizar el tejido tras el daño. El grupo de Sofroniew observó, por medio de un abordaje metodológico muy ingenioso, que la cicatriz glial sirve para restablecer la BHE previniendo una reacción inflamatoria exacerbada limitando por ende la degeneración celular (Faulkner y col. 2004; Busch y col. 2007) y eliminar los restos de células muertas. Como se comentó en el apartado de introducción, los PGCS son las moléculas predominantes en la cicatriz glial provocando una zona inhibitoria para la regeneración axonal. Cuando los axones en la vecindad de la lesión se enfrentan al

ambiente cicatricial forman unas estructuras, ya observadas por D. Ramón y Cajal, denominadas bulbos distróficos. Pese a lo inicialmente pensando, estas estructuras mantienen un potencial innato de regeneración hasta un año después de la lesión y son capaces de responder a factores tróficos, como el BDNF (Houle 1991). Hasta hace relativamente poco tiempo se desconocía la diana o el receptor por el cual el CS de los PGCS ejercía este efecto inhibitorio sobre la regeneración hoy día se sabe que el CS interacciona con el receptor de contactina-1 y el receptor tirosina fosfatasa sigma (RPTP σ) (Shen y col. 2009). Se ha visto que el CS-4,6S (CS-E) interacciona de forma específica con el receptor de contactina-1 promoviendo el crecimiento axonal, lo que sugiere, una vez más, que el patrón de sulfatación del GAG puede ser importante para los efectos específicos mediados por cada receptor. Por otro lado el RPTP σ estaría mediando una respuesta inhibitoria ya que el ratón con ablación del gen muestra un crecimiento axonal en presencia sustratos de CSPG (Shen y col. 2009).

Además, se sabe que el CS controla la disponibilidad de cationes (entre ellos Ca^{2+}) ya que el tratamiento enzimático que elimina los CS de los CSPGs aumenta la tasa de difusión de este catión (Hrabetova y col. 2009). Hasta donde conocemos, solo hay un artículo donde muestran que los CSPG, inmovilizados sobre cuentas producen un ligero aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en neuronas de ganglios paravertebrales; este efecto fue atribuido a las cadenas de CS del proteoglicano ya que tras el tratamiento de éstas con condroitinasa ABC abolía la respuesta (Snow y col. 1994). Está razonablemente aceptado que la movilidad del cono de crecimiento se encuentra íntimamente relacionada con elevaciones transitorias y locales de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ determinando en última instancia la extensión y la guía de los axones en crecimiento en procesos tan importante como el desarrollo o la plasticidad estructural (Gomez y col. 1999). Nuestro experimentos muestran de una forma más directa cómo el CS en solución y libre del núcleo proteico, tal y como se presenta en condiciones fisiológicas (formando los PGCS), provoca una elevación muy rápida de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se asemeja a la producida por un estímulo despolarizante 35 mM de K^+ o a la aplicación de un estímulo más fisiológico como glutamato a 100 μM .

También se ha visto que los CSPG son capaces de inducir la activación de protein cinasa C (PKC), que entre otras funciones, activa la familia de las pequeñas Rho GTPasas (RhoA/ROCK) cuyo bloqueo es capaz de abolir la inhibición del crecimiento axonal que producen lo CSPG (Dergham y col. 2002; Monnier y col. 2003). Además,

los CSPG inducen la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epithelial (EGFR) (Koprivica y col. 2005) de forma dependiente de Ca^{2+} , por lo que la inhibición farmacológica o genética de PKC o EGFR mitiga la inhibición del crecimiento y la activación de RhoA ejercida por los CSPG (Sivasankaran y col. 2004). Una vez más la entrada de calcio o la liberación de depósitos toma el protagonismo en el disparo de la cascada de señalización que desemboca con el efecto inhibitor de los CSPG. Por ello, sería conveniente estudiar si los transientes de calcio promovidos por CS y que se bloquean por los antagonistas de los receptores AMPA/kainato o los mGlu del grupo I, prevendrían la activación de estas rutas de señalización y cómo estas señales afectan a las proteínas del citoesqueleto que en última instancia van a mediar la respuesta de la célula ante señales promotoras o inhibitoras del crecimiento.

Los datos presentados en esta Tesis Doctoral demuestran que el CS, en cocultivos primarios de neuronas y glía, produce una corriente de entrada, de cationes Na^+ fundamentalmente, que provocan la despolarización celular y una elevación transitoria de la concentración de Ca^{2+} en el citosol. Estos efectos se deben fundamentalmente a la activación de receptores AMPA/kainato porque: (1) I_{CS} tiene una cinética similar a I_{AMPA} o $I_{kainato}$; (2) Los antagonistas no selectivos para AMPA/kainato como el CNQX y el NBQX bloquearon en gran medida la corriente y la despolarización promovida por la aplicación de CS; por el contrario los bloqueantes selectivos para los receptores NMDA, tales como MK801 o D-APV no modificaron tales efectos. Además, creemos que los receptores AMPA pueden jugar un papel protagonista en los efectos descritos para el CS ya que: (1) el antagonista selectivo para los receptores AMPA, GYKI 53655, inhibió el 79% de I_{CS} y (2) el modulador alostérico ciclotiazida aumentó la I_{CS} de forma, en cuanto a cinética y amplitud, similar a la potenciación ejercida sobre I_{AMPA} .

A la luz de estos resultados, la pregunta lógica que a cualquiera le puede sobrevenir es si en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas se podría encontrar la fracción de CS libre en el SN del sujeto (de forma similar a la que hemos utilizado en este trabajo) en contraposición de su estado más común de presentarse unido a una proteína central para formar el proteoglicano. El CS en su forma de proteoglicano está presente en una gran variedad de tejidos del sistema nervioso. Los CSPG se expresan tanto en el SN central como el periférico y en los estados embrionario, juvenil y adulto. La respuesta a esta pregunta viene de la mano de la enzima condroitinasa ABC, que, utilizada como tratamiento, ha demostrado eliminar o al menos, reducir la inhibición

asociada a los CSPG de la cicatriz glial (Zuo y col. 1998; Bradbury y col. 2002; Barritt y col. 2006), hecho que fue descrito por primera vez por el grupo de James Fawcett y MacMahon (Bradbury y col. 2002). Concretamente, la aplicación *in vivo* de la condroitinasa ABC aumenta la regeneración axonal de neuronas dopaminérgicas (Moon y col. 2002) y promueve la recuperación funcional tras un daño en la médula espinal (Moon y col. 2001; Bradbury y col. 2002). Es en este abordaje experimental donde podríamos encontrar las moléculas del CS liberadas de su núcleo proteico. Pero, y fisiológicamente, ¿qué estímulo liberaría los GAG del PGCS? Aparecen aquí las metaloproteasas de matriz (MMP), cuya reacción y función fisiológica es degradar los componentes de la MEC y que son esenciales para la formación de la cicatriz glial (Hsu y col. 2008). Centrándonos en los CSPG, las MMP-2 y MMP-3 son las únicas que podrían digerir los CS de los CSPG, cada una de ellas, individualmente pueden activar a MMP-9, que se expresa en los astrocitos reactivos y media la migración de los mismos hacia la zona dañada. Esta cascada de activación de MMP se encuentra sobreestimulada tras un daño traumático o un evento isquémico por ejemplo (Park y col. 2009). La actividad de esta familia de proteínas no sólo facilita la migración celular, sino que también ejerce una función positiva sobre la regeneración axonal, como se demuestra en varios artículos donde la MMP-2, localizada en el extremo de un axón en crecimiento facilita el exocrecimiento neurítico al degradar los CSPG (Zuo y col. 1998). Otra de las enzimas implicadas en el incremento de la regeneración axonal es la MMP-5, cuya expresión y actividad, reduce el efecto inhibitorio de los PGCS (Hayashita-Kinoh y col. 2001). Además, las MMP se encuentran expresadas en niveles significativos en regiones del SNC en etapas postnatales donde existe plasticidad estructural como el cerebelo (Vaillant y col. 1999; Hayashita-Kinoh y col. 2001). Otro hecho significativo es el aumento en la expresión de MMP tras casi cualquier estímulo dañino, como el daño en la espina dorsal (Xu y col. 2001), en la enfermedad de Alzheimer (Yoshiyama y col. 2000) e infarto (Sole y col. 2004). Así pues, estos estudios apuntan que la degradación de CSPG facilitaría el crecimiento axonal y el avance del cono de crecimiento (Hayashita-Kinoh y col. 2001) a través de un mecanismo, a priori, meramente físico abriendo espacios en la MEC por los que el axón podría avanzar. Otra explicación podría ser que la eliminación del CS desenmascare señales promotoras del crecimiento relacionadas con laminina, como se ha visto en varios estudios (McKeon y col. 1995; Zhou y col. 2006). Además de estos mecanismos, por los que la eliminación de las cadenas de CS pudiera tener un efecto neuroregenerador, no hay que

minusvalorar un posible efecto fisiológico-farmacológico de los productos de degradación de estas reacciones, de hecho se ha observado que un disacárido procedente de la degradación enzimática del CS, es capaz de ejercer neuroprotección frente a un daño excitotóxico producido por altas concentraciones de glutamato o por el péptido A β oligomerizado tanto *in vitro* como *in vivo* a través de un mecanismo que implica la activación de las rutas PKC α y PYK2 (Rolls y col. 2004). En este sentido no podríamos descartar que además el CS, en forma de polisacárido, pudiera ejercer efectos parecidos a través de la activación de los receptores AMPA/kainato o mGlu del grupo I o que el efecto neuroprotector estuviera siendo disparado por el transiente de calcio generado por el CS tal y como describimos que sucede en esta Tesis.

En una neurona inhibitoria de hipocampo, los receptores AMPA permeables a Ca²⁺ son los predominantes; por el contrario, las células piramidales expresan en su mayoría el receptor con su variante GluR2 siendo, por tanto, impermeables a este catión (Geiger y col. 1995; Isa y col. 1996). Estos receptores median la respuesta rápida excitadora y juegan un papel crítico en la transmisión sináptica y la formación de la potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD por sus siglas en inglés). En nuestro trabajo, presentamos evidencias sólidas de que el CS activa estos receptores tanto como el agonista endógeno glutamato o el agonista selectivo AMPA.

Tal y cómo se comentó en el apartado de introducción, los CSPG son el componente principal de una estructura especializada de la MEC en el SNC llamada red perineural. Ésta forma compartimentos en la membrana celular donde los receptores se agrupan ya que la RPN es capaz de inhibir la difusión lateral, en concreto, de los receptores AMPA: esto ha sido demostrado recientemente por el grupo de Renato Frischknecht, que vieron como el tratamiento enzimático que degrada la RPN aumenta el intercambio de receptores desde la zona extrasináptica hacia la sinapsis (Frischknecht y col. 2009). Pero son muchos los componentes de la MEC que de forma directa afectan a la excitabilidad neuronal. En concreto, las glicoproteínas, tenascina C y tenascina R interactúan de forma directa con los canales de sodio dependientes de voltaje. Esta interacción con las subunidades β 1 y β 2 modulan la localización celular de estos canales durante el proceso de mielinización axonal (Srinivasan y col. 1998; Xiao y col. 1999; Kazarinova-Noyes y col. 2001). Además se ha visto como las tenascinas modulan los canales de tipo L, hecho que tiene profundas consecuencias sobre la LTP y la LTD (Evers y col. 2002; Dityatev y Schachner 2003; Dityatev y Fellin 2008). Otras

moléculas como el CSPG brevicano, también contribuyen a la compartimentalización de moléculas de señalización y receptores y reúnen los complejos proteicos que median la respuesta iónica para formar los nodos de Ranvier (Susuki y Rasband 2008). Curiosamente, el ratón con ablación del gen para brevicano no produce LTP por lo que esta molécula de la MEC se presenta imprescindible para los procesos de consolidación de la memoria (Brakebusch y col. 2002) . Por todo ello, hoy día se acepta que la MEC no solo actúa como una estructura pasiva con cargas iónicas, sino que modula y participa de forma activa en la organización de receptores en membrana determinando las zonas sinápticamente activas en las neuronas.

Patrón de sulfatación

Muchos autores han descrito la importancia del patrón de sulfatación (localización de los grupos SO_4 en los distintos C del disacárido unidad) en las funciones biológicas llevadas a cabo por cada tipo de CS. Por ejemplo, el CS-A (CS-4S) es predominante en el SN adulto. Sin embargo, tras un daño, el CS-C (CS-6S) y la enzima responsable de su síntesis (condroitín 6-sulfotransferasa: C6ST1) aumentan de expresión en la mayoría de células gliales rodeando el sitio de la lesión (Properzi y col. 2005). Por otro lado, el CS-E (CS-4,6S) abunda en el tejido cicatricial tras un daño (Gilbert y col. 2005). Parece por tanto, que existe un código de sulfatación (Gama y col. 2006) por el que la molécula puede modificar su actividad hasta el punto que mientras que el CS-C es particularmente inhibitorio para la regeneración axonal , el CS-E promueve la elongación de los axones de neuronas embrionarias *in vitro* (Clement y col. 1998; Clement y col. 1999) . En nuestro estudio no hemos podido demostrar selectividad de uno u otro CS sobre un tipo concreto de receptor aunque queda patente la distinta potencia ejercida por cada uno de los CS utilizados en la generación de corrientes AMPA/kainato (ver valores de CE_{50}). El hecho de que cada CS provenga de la purificación de muestras biológicas y la falta de homogeneidad en cuanto al peso molecular y diferentes patrones de sulfatación dentro de una misma molécula quizás sea responsable de oscurecer y /o difuminar las conclusiones que puedan ser extraídas de los experimentos abordados en esta Tesis Doctoral.

CS y receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos del grupo I se expresan en diferentes regiones cerebrales entre las que destacan cerebelo, hipotálamo, tálamo, corteza cerebral e hipocampo (Shigemoto y col. 1993; Fotuhi y col. 1994; Petralia y col. 1997). En el hipocampo, mGluR1 se expresa en giro dentado y CA3 (Fotuhi y col. 1994), estando ausente en CA1, donde únicamente se detecta mGluR5 (Lujan y col. 1996). En cuanto a su localización subcelular, los mGluR del grupo I se expresan tanto a nivel postsináptico como presináptico. A nivel bioquímico se ha demostrado que la activación de estos receptores modulan la transmisión sináptica y la liberación de glutamato a nivel presináptico (Schwartz y col. 2000; Sistiaga y col. 2000). En cuanto a la localización postsináptica, los receptores metabotrópicos se sitúan en la región perisináptica y extrasináptica (Baude y col. 1993; Petralia y col. 1998) por lo que necesitan mayor concentración de neurotransmisor para ser activados. Aquí, los mGluR del grupo I, modulan la excitabilidad neuronal y la actividad de los receptores de NMDA (Fitzjohn y col. 1996; Pisani y col. 2001).

La activación de estos receptores desencadenaría la activación de PLC y el incremento de los niveles de IP₃ y DAG. Estos segundos mensajeros activan a su vez distintas rutas intracelulares; el IP₃, a través de su receptor en el RE promueve la liberación de Ca²⁺ hacia el citosol y el DAG entre otras acciones activaría la proteína cinasa C (PKC) que fosforila multitud de proteínas entre las que se encuentran: la subunidad $\alpha 1$ de los canales de Ca²⁺ (Zamponi y col. 1997), por la que aumenta su conductancia, sobre canales de Na⁺ disminuyendo su conductancia (Numann y col. 1991) o multitud de proteínas de la exocitosis como la dinamina 1, Munc-18, VAMP y SNAP 25 (Fujita y col. 1996; Powell y col. 2000) cuya consecuencia es la movilización de vesículas desde el compartimento de reserva hacia la zona activa con un aumento de la sensibilidad de la maquinaria exocitótica al Ca²⁺ (Wu y col. 2001)

En resumen, creemos que las dianas descritas en este trabajo por primera vez apuntan a varios receptores de membrana relacionados con la transmisión excitadora glutamatérgica. Hemos demostrado que el CS activa de forma directa los receptores AMPA/kainato y los mGlu del grupo I. Otros autores también han visto que el ácido poliasilico o el dextrano (polisacárido estructuralmente parecido al CS) son capaces de modular la actividad de receptores AMPA (Suppiramaniam y col. 2006; Senkov y col.

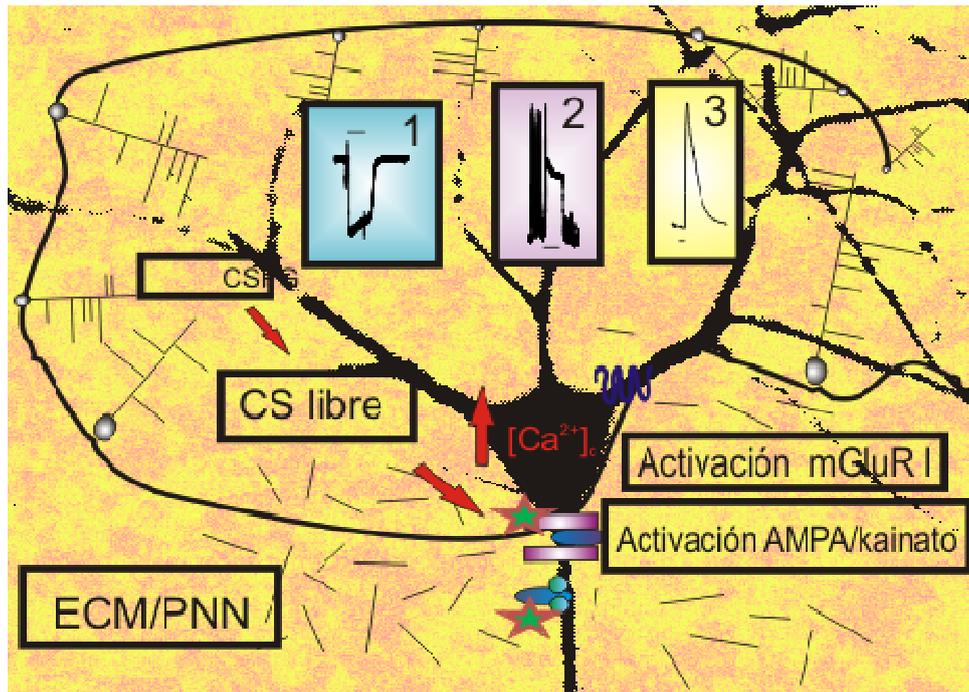
2012), aunque un efecto directo de estas moléculas como agonistas de los receptores AMPA no ha sido descrito nunca.

CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentes en los trabajos que aportamos en esta Tesis Doctoral y de su análisis y discusión nos aventuramos a extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- Hemos encontrado que el glucosaminoglicano CS altera la excitabilidad de neuronas de hipocampo en cultivo, induciendo una corriente iónica que produce la despolarización celular y un disparo de potenciales de acción.
- 2.- El mecanismo que describimos con nuestros experimentos por el que el CS produce estos cambios en la excitabilidad neuronal es la activación directa de los receptores AMPA/kainato. Esta activación conduce a un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} .
- 3.- El calcio necesario para producir el transiente citosólico proviene tanto del medio extracelular como de la liberación de depósitos intracelulares. La despolarización provoca la apertura de los CCVD a través de los cuales fluye el catión hacia el interior celular. A su vez también se produce una liberación directa del retículo por medio de la activación de PLC y la generación de IP_3 .
- 4.- En el esquema 1 exponemos el mecanismo de acción que proponemos acorde a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. La liberación de las cadenas de CS desde un PGCS en la MEC del SN podría provocar que el GAG accediera a la superficie celular y activar los receptores AMPA/kainato o mGlu del grupo I provocando así un incremento en la concentración citosólica de calcio en la célula en cuestión.



Esquema 1: Diagrama ilustrativo sobre el posible efecto del CS sobre una neurona. El CS liberado, producto de la degradación de los PGCS de la MEC podría estar accesible a los receptores AMPA/Kainato y mGlu grupo I los cuales activaría, promoviendo la entrada de cationes (1), despolarización celular (2) y la elevación de calcio en el citosol (3).

AYUDAS DE INVESTIGACIÓN

8.- AYUDAS DE INVESTIGACIÓN

Este trabajo fue apoyado durante todos estos últimos años por las siguientes Instituciones Españolas gracias a ayudas económicas conseguidas por Antonio García García y la colaboración científica entre la UAM y Bioibérica S.A.

- (1) Proyecto SAF 2006-03589, Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN)
- (2) S-SAL-0275-2006, Comunidad Autónoma de Madrid, España
- (3) Proyecto SAF 2010-21795, Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN)
- (4) Cátedra de Patrocinio UAM/Bioibérica de Inflamación Crónica y Citoprotección (CABICYC)

Quisiera agradecer especialmente al Fundación Teófilo Hernando por la beca predoctoral concedida para el desarrollo de distintos proyectos relacionados con la cátedra UAM/Bioibérica. Parte de los frutos de esa colaboración se presentan en esta memoria de Tesis Doctoral.



Fundación
Teófilo Hernando

BIBLIOGRAFÍA

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Airas JM, Betz H & El Far O. (2001). PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Lett* **494**, 60-63.
- Alkondon M, Pereira EF, Eisenberg HM & Albuquerque EX. (1999). Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci* **19**, 2693-2705.
- Amaral DG. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* **182**, 851-914.
- Amaral DG & Witter MP. (1995). Hippocampal formation. In *The Rat Nervous System*. In G. Paxinos/Acad. Press Inc, San Diego.
- Amet LE, Lauri SE, Hienola A, Croll SD, Lu Y, Levorse JM, Prabhakaran B, Taira T, Rauvala H & Vogt TF. (2001). Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule. *Mol Cell Neurosci* **17**, 1014-1024.
- Angevine JB, Jr. (1965). Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl*, Suppl 2:1-70.
- Arai K, Lee SR & Lo EH. (2003). Essential role for ERK mitogen-activated protein kinase in matrix metalloproteinase-9 regulation in rat cortical astrocytes. *Glia* **43**, 254-264.
- Arnaiz-Cot JJ, Gonzalez JC, Sobrado M, Baldelli P, Carbone E, Gandia L, Garcia AG & Hernandez-Guijo JM. (2008). Allosteric modulation of alpha 7 nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 1097-1110.
- Arnaud L, Ballif BA & Cooper JA. (2003). Regulation of protein tyrosine kinase signaling by substrate degradation during brain development. *Mol Cell Biol* **23**, 9293-9302.
- Baig S, Wilcock GK & Love S. (2005). Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **110**, 393-401.
- Bairati A, Jr. & Bianchini A. (1953). [Histochemical studies on mucopolysaccharides in human embryos during the first months of life]. *Boll Soc Ital Biol Sper* **29**, 1880-1881.
- Bandtlow CE & Zimmermann DR. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**, 1267-1290.
- Barker JL & Harrison NL. (1988). Outward rectification of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurones. *J Physiol* **403**, 41-55.

- Barritt AW, Davies M, Marchand F, Hartley R, Grist J, Yip P, McMahon SB & Bradbury EJ. (2006). Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. *J Neurosci* **26**, 10856-10867.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA & Somogyi P. (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787.
- Berardi N, Pizzorusso T & Maffei L. (2004). Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse. *Neuron* **44**, 905-908.
- Berretta S. (2011). Extracellular matrix abnormalities in schizophrenia. *Neuropharmacology*.
- Bettler B & Mulle C. (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* **34**, 123-139.
- Beurdeley M, Spatazza J, Lee HH, Sugiyama S, Bernard C, Di Nardo AA, Hensch TK & Prochiantz A. (2012). Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *J Neurosci* **32**, 9429-9437.
- Bignami A, Hosley M & Dahl D. (1993a). Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl)* **188**, 419-433.
- Bignami A, Perides G & Rahemtulla F. (1993b). Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain. *J Neurosci Res* **34**, 97-106.
- Blackstad TW. (1956). Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* **105**, 417-537.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J & Jeune B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* **138**, 433-449.
- Blumcke I, Egli P & Celio MR. (1995). Relationship between astrocytic processes and "perineuronal nets" in rat neocortex. *Glia* **15**, 131-140.
- Bockaert J & Pin JP. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**, 1723-1729.
- Borkenhagen M, Clemence JF, Sigrist H & Aebischer P. (1998). Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system. *J Biomed Mater Res* **40**, 392-400.
- Bortolotto ZA, Fitzjohn SM & Collingridge GL. (1999). Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 299-304.
- Boudin H, Doan A, Xia J, Shigemoto R, Huganir RL, Worley P & Craig AM. (2000). Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* **28**, 485-497.

- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW & McMahon SB. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* **416**, 636-640.
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, Bockers TM, Zhou X, Kreutz MR, Montag D, Gundelfinger ED & Fassler R. (2002). Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* **22**, 7417-7427.
- Brown JM, Xia J, Zhuang B, Cho KS, Rogers CJ, Gama CI, Rawat M, Tully SE, Uetani N, Mason DE, Tremblay ML, Peters EC, Habuchi O, Chen DF & Hsieh-Wilson LC. (2012). A sulfated carbohydrate epitope inhibits axon regeneration after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4768-4773.
- Bruckner G, Brauer K, Hartig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH & Reichenbach A. (1993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* **8**, 183-200.
- Bruckner G, Hartig W, Kacza J, Seeger J, Welt K & Brauer K. (1996). Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol* **25**, 333-346.
- Bruckner G, Hausen D, Hartig W, Drlicek M, Arendt T & Brauer K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **92**, 791-805.
- Bukalo O, Schachner M & Dityatev A. (2001). Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* **104**, 359-369.
- Busch SA & Silver J. (2007). The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 120-127.
- Cafferty WB, McGee AW & Strittmatter SM. (2008). Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity? *Trends Neurosci* **31**, 215-220.
- Caggiano AO, Zimmer MP, Ganguly A, Blight AR & Gruskin EA. (2005). Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J Neurotrauma* **22**, 226-239.
- Cai Z, Saugstad JA, Sorensen SD, Ciombor KJ, Zhang C, Schaffhauser H, Hubalek F, Pohl J, Duvoisin RM & Conn PJ. (2001). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors. *J Neurochem* **78**, 756-766.
- Canning DR, McKeon RJ, DeWitt DA, Perry G, Wujek JR, Frederickson RC & Silver J. (1993). beta-Amyloid of Alzheimer's disease induces reactive gliosis that inhibits axonal outgrowth. *Exp Neurol* **124**, 289-298.
- Cañas N, Valero T, Villarroya M, Montell E, Verges J, Garcia AG & Lopez MG. (2007). Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 946-953.

- Carmichael ST. (2003). Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist* **9**, 64-75.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT & Fawcett JW. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* **133**, 2331-2347.
- Carulli D, Rhodes KE, Brown DJ, Bonnert TP, Pollack SJ, Oliver K, Strata P & Fawcett JW. (2006). Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J Comp Neurol* **494**, 559-577.
- Celio MR & Blumcke I. (1994). Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* **19**, 128-145.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S & Vitellaro-Zuccarello L. (1998). Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* **21**, 510-515.
- Clement AM, Nadanaka S, Masayama K, Mandl C, Sugahara K & Faissner A. (1998). The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J Biol Chem* **273**, 28444-28453.
- Clement AM, Sugahara K & Faissner A. (1999). Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons. *Neurosci Lett* **269**, 125-128.
- Coles CH, Shen Y, Tenney AP, Siebold C, Sutton GC, Lu W, Gallagher JT, Jones EY, Flanagan JG & Aricescu AR. (2011). Proteoglycan-specific molecular switch for RPTPsigma clustering and neuronal extension. *Science* **332**, 484-488.
- Conn PJ & Pin JP. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 205-237.
- Deepa SS, Umehara Y, Higashiyama S, Itoh N & Sugahara K. (2002). Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues. *J Biol Chem* **277**, 43707-43716.
- Deepa SS, Yamada S, Zako M, Goldberger O & Sugahara K. (2004). Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* **279**, 37368-37376.
- Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD & McKerracher L. (2002). Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* **22**, 6570-6577.
- Dev KK, Nakajima Y, Kitano J, Braithwaite SP, Henley JM & Nakanishi S. (2000). PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGLUR7. *J Neurosci* **20**, 7252-7257.
- DeWitt DA & Silver J. (1996). Regenerative failure: a potential mechanism for neuritic dystrophy in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **142**, 103-110.

- DeWitt DA, Silver J, Canning DR & Perry G. (1993). Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **121**, 149-152.
- Dickendesher TL, Baldwin KT, Mironova YA, Koriyama Y, Raiker SJ, Askew KL, Wood A, Geoffroy CG, Zheng B, Liepmann CD, Katagiri Y, Benowitz LI, Geller HM & Giger RJ. (2012). NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci* **15**, 703-712.
- Dietzmann K, von Bossanyi P, Krause D, Wittig H, Mawrin C & Kirches E. (2000). Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* **196**, 15-21.
- Discher DE, Janmey P & Wang YL. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139-1143.
- Dityatev A, Bruckner G, Dityateva G, Grosche J, Kleene R & Schachner M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol* **67**, 570-588.
- Dityatev A & Fellin T. (2008). Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis. *Neuron Glia Biol* **4**, 235-247.
- Dityatev A & Schachner M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **4**, 456-468.
- Dityatev A, Schachner M & Sonderegger P. (2010). The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* **11**, 735-746.
- Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP & Huganir RL. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* **84**, 745-755.
- Emerling DE & Lander AD. (1996). Inhibitors and promoters of thalamic neuron adhesion and outgrowth in embryonic neocortex: functional association with chondroitin sulfate. *Neuron* **17**, 1089-1100.
- Engelman HS & MacDermott AB. (2004). Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat Rev Neurosci* **5**, 135-145.
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A & Schachner M. (2002). Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci* **22**, 7177-7194.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB & Sofroniew MV. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* **24**, 2143-2155.
- Filbin MT. (2003). Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* **4**, 703-713.

- Fisher D, Xing B, Dill J, Li H, Hoang HH, Zhao Z, Yang XL, Bachoo R, Cannon S, Longo FM, Sheng M, Silver J & Li S. (2011). Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors. *J Neurosci* **31**, 14051-14066.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE & Silver J. (1999). Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* **19**, 8182-8198.
- Fitch MT & Silver J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* **209**, 294-301.
- Fitzjohn SM, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D & Collingridge GL. (1996). Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* **203**, 211-213.
- Flor PJ, Lindauer K, Puttner I, Ruegg D, Lukic S, Knopfel T & Kuhn R. (1995). Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2. *Eur J Neurosci* **7**, 622-629.
- Fonnum F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* **42**, 1-11.
- Fotuhi M, Standaert DG, Testa CM, Penney JB, Jr. & Young AB. (1994). Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* **21**, 283-292.
- Freedman B. (1953). Hyaluronidase effects on thionin-stained sections on brain. *Anat Rec* **115**, 265-270.
- Freund TF & Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470.
- Frischknecht R, Heine M, Perrais D, Seidenbecher CI, Choquet D & Gundelfinger ED. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat Neurosci* **12**, 897-904.
- Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Sudhof TC, Scheller RH & Takai Y. (1996). Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem* **271**, 7265-7268.
- Gaarskjaer FB. (1986). The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res* **396**, 335-357.
- Galtrey CM & Fawcett JW. (2007). The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* **54**, 1-18.
- Galvani L. (1791). De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. *Bon Sci Art Inst Acad Comm* **7**, 363-418.
- Gama CI, Tully SE, Sotogaku N, Clark PM, Rawat M, Vaidehi N, Goddard WA, 3rd, Nishi A & Hsieh-Wilson LC. (2006). Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nat Chem Biol* **2**, 467-473.

- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P & Monyer H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* **15**, 193-204.
- Gereau RWt & Heinemann SF. (1998). Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5. *Neuron* **20**, 143-151.
- Gierke H. (1885). Die Stützsubstanz des Central nerven systems. *Arch Mikrosk Anat* **25**, 441-554.
- Gilbert RJ, McKeon RJ, Darr A, Calabro A, Hascall VC & Bellamkonda RV. (2005). CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension. *Mol Cell Neurosci* **29**, 545-558.
- Glegg RE, Eidinger D & Leblond CP. (1953). Some carbohydrate components of reticular fibers. *Science* **118**, 614-616.
- Glegg RE & Pearce RH. (1956). Chemical extraction of metachromatic and periodic acid-Schiff positive carbohydrates from cerebral tissue. *J Comp Neurol* **106**, 291-297.
- Gogolla N, Caroni P, Luthi A & Herry C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science* **325**, 1258-1261.
- Gomez TM & Spitzer NC. (1999). In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature* **397**, 350-355.
- Gonzalez JC, Albinana E, Baldelli P, Garcia AG & Hernandez-Guijo JM. (2011). Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the enhancement of spontaneous GABAergic postsynaptic currents in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **33**, 69-81.
- Gottschall PE & Yu X. (1995). Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* **64**, 1513-1520.
- Grimpe B & Silver J. (2004). A novel DNA enzyme reduces glycosaminoglycan chains in the glial scar and allows microtransplanted dorsal root ganglia axons to regenerate beyond lesions in the spinal cord. *J Neurosci* **24**, 1393-1397.
- Gupta-Bansal R, Frederickson RC & Brunden KR. (1995). Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem* **270**, 18666-18671.
- Hagihara K, Miura R, Kosaki R, Berglund E, Ranscht B & Yamaguchi Y. (1999). Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J Comp Neurol* **410**, 256-264.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth FJ. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.

- Hartig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mader M, Reichenbach A & Bruckner G. (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* **842**, 15-29.
- Hartig W, Klein C, Brauer K, Schuppel KF, Arendt T, Bigl V & Bruckner G. (2001). Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol Aging* **22**, 25-33.
- Hausen D, Bruckner G, Drlicek M, Hartig W, Brauer K & Bigl V. (1996). Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *Neuroreport* **7**, 1725-1729.
- Hayashi T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *The Keio Journal Of Medicine* **3**, 183-192.
- Hayashita-Kinoh H, Kinoh H, Okada A, Komori K, Itoh Y, Chiba T, Kajita M, Yana I & Seiki M. (2001). Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. *Cell Growth Differ* **12**, 573-580.
- Hjorth-Simonsen A. (1972). Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J Comp Neurol* **146**, 219-232.
- Hobohm C, Gunther A, Grosche J, Rossner S, Schneider D & Bruckner G. (2005). Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J Neurosci Res* **80**, 539-548.
- Hodgkin AL & Huxley AF. (1939). Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature* **144**, 710-711.
- Horn R & Marty A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* **92**, 145-159.
- Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W & Hagen FS. (1991). Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**, 1318-1321.
- Houle JD. (1991). Demonstration of the potential for chronically injured neurons to regenerate axons into intraspinal peripheral nerve grafts. *Exp Neurol* **113**, 1-9.
- Hrabetova S, Masri D, Tao L, Xiao F & Nicholson C. (2009). Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC. *J Physiol* **587**, 4029-4049.
- Hsu JY, Bourguignon LY, Adams CM, Peyrollier K, Zhang H, Fandel T, Cun CL, Werb Z & Noble-Haeusslein LJ. (2008). Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord. *J Neurosci* **28**, 13467-13477.
- Hsu JY, McKeon R, Goussev S, Werb Z, Lee JU, Trivedi A & Noble-Haeusslein LJ. (2006). Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury. *J Neurosci* **26**, 9841-9850.

- Imagama S, Sakamoto K, Tauchi R, Shinjo R, Ohgomori T, Ito Z, Zhang H, Nishida Y, Asami N, Takeshita S, Sugiura N, Watanabe H, Yamashita T, Ishiguro N, Matsuyama Y & Kadomatsu K. (2011). Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci* **31**, 17091-17102.
- Isa T, Itazawa S, Iino M, Tsuzuki K & Ozawa S. (1996). Distribution of neurones expressing inwardly rectifying and Ca(2+)-permeable AMPA receptors in rat hippocampal slices. *J Physiol* **491 (Pt 3)**, 719-733.
- Isaacson R. (1987). Hippocampus. In *Encyclopedia of Neurosciences*, pp. 492-495. Adelman, G. Birkhauser, Basel.
- Ishizuka N, Weber J & Amaral DG. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* **295**, 580-623.
- John N, Krugel H, Frischknecht R, Smalla KH, Schultz C, Kreutz MR, Gundelfinger ED & Seidenbecher CI. (2006). Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. *Mol Cell Neurosci* **31**, 774-784.
- Johnson KG, Tenney AP, Ghose A, Duckworth AM, Higashi ME, Parfitt K, Marcu O, Heslip TR, Marsh JL, Schwarz TL, Flanagan JG & Van Vactor D. (2006). The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development. *Neuron* **49**, 517-531.
- Jones LL, Margolis RU & Tuszynski MH. (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* **182**, 399-411.
- Kaksonen M, Pavlov I, Voikar V, Lauri SE, Hienola A, Riekkki R, Lakso M, Taira T & Rauvala H. (2002). Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory. *Mol Cell Neurosci* **21**, 158-172.
- Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, Oster SF, Inatani M, Hansen MJ, Flanagan JG, Yamaguchi Y, Sretavan DW, Giger RJ & Kolodkin AL. (2004). Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* **44**, 961-975.
- Karp G. (2010). Interactions between cells and environment. In *Cell Biology, International Student Version*, 6 edn, ed. Karp G, pp. 230-263. John Wiley & Sons, Inc. .
- Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM & Bernfield M. (1998). Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med* **4**, 691-697.
- Kawashima H, Atarashi K, Hirose M, Hirose J, Yamada S, Sugahara K & Miyasaka M. (2002). Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J Biol Chem* **277**, 12921-12930.
- Kazarinova-Noyes K, Malhotra JD, McEwen DP, Mattei LN, Berglund EO, Ranscht B, Levinson SR, Schachner M, Shrager P, Isom LL & Xiao ZC. (2001). Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression. *J Neurosci* **21**, 7517-7525.

- Kendall DA. (1993). Direct and indirect responses to metabotropic glutamate receptor activation in the brain. *Biochem Soc Trans* **21**, 1120-1123.
- Khan KM, Falcone DJ & Kraemer R. (2002). Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**, 2353-2359.
- Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM & Chan PH. (2003). Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* **23**, 8733-8742.
- Kobayashi K, Emson PC & Mountjoy CQ. (1989). Vicia villosa lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Res* **498**, 170-174.
- Koppe G, Bruckner G, Brauer K, Hartig W & Bigl V. (1997). Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. *Cell Tissue Res* **288**, 33-41.
- Koprivica V, Cho KS, Park JB, Yiu G, Atwal J, Gore B, Kim JA, Lin E, Tessier-Lavigne M, Chen DF & He Z. (2005). EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science* **310**, 106-110.
- Kuettner KE. (1992). Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* **25**, 155-163.
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H & Morikawa K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971-977.
- Kwok JC, Afshari F, Garcia-Alias G & Fawcett JW. (2008). Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci* **26**, 131-145.
- Kwok JC, Dick G, Wang D & Fawcett JW. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* **71**, 1073-1089.
- Laatsch RH & Cowan WM. (1966). Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization. *J Comp Neurol* **128**, 359-395.
- Leblond CP. (1950). Distribution of periodic acid-reactive carbohydrates in the adult rat. *Am J Anat* **86**, 1-49.
- Lehmenkuhler A, Sykova E, Svoboda J, Zilles K & Nicholson C. (1993). Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience* **55**, 339-351.
- Lerma J. (1997). Kainate reveals its targets. *Neuron* **19**, 1155-1158.

- Lesma E, Di Giulio AM, Ferro L, Prino G & Gorio A. (1996). Glycosaminoglycans in nerve injury: 1. Low doses of glycosaminoglycans promote neurite formation. *J Neurosci Res* **46**, 565-571.
- Li HP, Komuta Y, Kimura-Kuroda J, van Kuppevelt TH & Kawano H. (2013). Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain. *J Neurotrauma* **30**, 413-425.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH & Lohman AH. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* **70**, 453-511.
- Lorente de Nó R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the Ammonic system. *J Psychol Neurol* **46**, 113-177.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R & Somogyi P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **8**, 1488-1500.
- Ma Z, Qin H & Benveniste EN. (2001). Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha. *J Immunol* **167**, 5150-5159.
- Machida CM, Scott JD & Ciment G. (1991). NGF-induction of the metalloproteinase-transin/stromelysin in PC12 cells: involvement of multiple protein kinases. *J Cell Biol* **114**, 1037-1048.
- Malenka RC & Nicoll RA. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
- Manzoni O, Fagni L, Pin JP, Rassendren F, Poulat F, Sladeczek F & Bockaert J. (1990). (trans)-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate stimulates quisqualate phosphoinositide-coupled receptors but not ionotropic glutamate receptors in striatal neurons and *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* **38**, 1-6.
- Margolis RU & Margolis RK. (1997). Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. *Cell Tissue Res* **290**, 343-348.
- Margolis RU, Margolis RK, Chang LB & Preti C. (1975). Glycosaminoglycans of brain during development. *Biochemistry* **14**, 85-88.
- Martin-de-Saavedra MD, del Barrio L, Canas N, Egea J, Lorrio S, Montell E, Verges J, Garcia AG & Lopez MG. (2011). Chondroitin sulfate reduces cell death of rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation by inhibiting p38, NFkappaB and iNOS. *Neurochem Int* **58**, 676-683.
- Mary S, Stephan D, Gomeza J, Bockaert J, Pruss RM & Pin JP. (1997). The rat mGlu1d receptor splice variant shares functional properties with the other short isoforms of mGlu1 receptor. *Eur J Pharmacol* **335**, 65-72.
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R & Nakanishi S. (1991). Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765.

- Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M & Hockfield S. (2002). Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J Neurosci* **22**, 7536-7547.
- McKeon RJ, Hoke A & Silver J. (1995). Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* **136**, 32-43.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS & Silver J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* **11**, 3398-3411.
- McLaurin J, Franklin T, Zhang X, Deng J & Fraser PE. (1999). Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth. *Eur J Biochem* **266**, 1101-1110.
- McRae PA & Porter BE. (2012). The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy. *Neurochem Int* **61**, 963-972.
- Michaelis EK. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* **54**, 369-415.
- Mikami T, Yasunaga D & Kitagawa H. (2009). Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E. *J Biol Chem* **284**, 4494-4499.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK & Margolis RU. (1998a). Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 207-212.
- Milev P, Monnerie H, Popp S, Margolis RK & Margolis RU. (1998b). The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity. *J Biol Chem* **273**, 21439-21442.
- Minakami R, Iida K, Hirakawa N & Sugiyama H. (1995). The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development. *J Neurochem* **65**, 1536-1542.
- Minakami R, Jinnai N & Sugiyama H. (1997). Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J Biol Chem* **272**, 20291-20298.
- Mironova YA & Giger RJ. (2013). Where no synapses go: gatekeepers of circuit remodeling and synaptic strength. *Trends Neurosci* **36**, 363-373.
- Miyata S, Komatsu Y, Yoshimura Y, Taya C & Kitagawa H. (2012). Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation. *Nat Neurosci* **15**, 414-422, S411-412.
- Miyata S, Nakatani Y, Hayashi N & Nakashima T. (2005). Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Res* **1058**, 1-9.

- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S & Mueller BK. (2003). The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci* **22**, 319-330.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B & Seeburg PH. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-540.
- Moon LD, Asher RA, Rhodes KE & Fawcett JW. (2001). Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* **4**, 465-466.
- Moon LD, Asher RA, Rhodes KE & Fawcett JW. (2002). Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat. *Neuroscience* **109**, 101-117.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G & Arendt T. (2010). Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **169**, 1347-1363.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Matthews RT & Arendt T. (2011). Involvement of Perineuronal and Perisynaptic Extracellular Matrix in Alzheimer's Disease Neuropathology. *Brain Pathol.*
- Morawski M, Bruckner MK, Riederer P, Bruckner G & Arendt T. (2004). Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* **188**, 309-315.
- Morris NP & Henderson Z. (2000). Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. *Eur J Neurosci* **12**, 828-838.
- Muir D. (1994). Metalloproteinase-dependent neurite outgrowth within a synthetic extracellular matrix is induced by nerve growth factor. *Exp Cell Res* **210**, 243-252.
- Muir D. (1995). Differences in proliferation and invasion by normal, transformed and NF1 Schwann cell cultures are influenced by matrix metalloproteinase expression. *Clin Exp Metastasis* **13**, 303-314.
- Muller CM & Griesinger CB. (1998). Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* **1**, 47-53.
- Nagel S, Sandy JD, Meyding-Lamade U, Schwark C, Bartsch JW & Wagner S. (2005). Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons. *Brain Res* **1056**, 43-50.
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N & Nakanishi S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* **268**, 11868-11873.

- Nakajima Y, Yamamoto T, Nakayama T & Nakanishi S. (1999). A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate receptor subtype 7. *J Biol Chem* **274**, 27573-27577.
- Nakanishi K, Tokita Y, Aono S, Ida M, Matsui F, Higashi Y & Oohira A. (2010). Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochem Res* **35**, 1131-1137.
- Nakanishi S & Masu M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 319-348.
- Nandini CD & Sugahara K. (2006). Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv Pharmacol* **53**, 253-279.
- Niciu MJ, Kelmendi B & Sanacora G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* **100**, 656-664.
- Nicoletti F, Meek JL, Iadarola MJ, Chuang DM, Roth BL & Costa E. (1986). Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *J Neurochem* **46**, 40-46.
- Nieuwenhuys R, Voogd J & van Huijzen C. (1982). *SNC : sinopsis y atlas del sistema nervioso central humano*. Editorial AC, Madrid.
- Nordstrom LA, Lochner J, Yeung W & Ciment G. (1995). The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae. *Mol Cell Neurosci* **6**, 56-68.
- Numann R, Catterall WA & Scheuer T. (1991). Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science* **254**, 115-118.
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL & Mulvihill ER. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* **11**, 41-52.
- Okamoto M, Mori S, Ichimura M & Endo H. (1994). Chondroitin sulfate proteoglycans protect cultured rat's cortical and hippocampal neurons from delayed cell death induced by excitatory amino acids. *Neurosci Lett* **172**, 51-54.
- Oray S, Majewska A & Sur M. (2004). Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* **44**, 1021-1030.
- Orlando C, Ster J, Gerber U, Fawcett JW & Raineteau O. (2012). Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. *J Neurosci* **32**, 18009-18017.
- Ozawa S, Kamiya H & Tsuzuki K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **54**, 581-618.

- Pantazopoulos H, Woo TU, Lim MP, Lange N & Berretta S. (2010). Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* **67**, 155-166.
- Park KP, Rosell A, Foerch C, Xing C, Kim WJ, Lee S, Opdenakker G, Furie KL & Lo EH. (2009). Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **40**, 2836-2842.
- Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML & Buonanno A. (1993). Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* **11**, 1069-1082.
- Paternain AV, Morales M & Lerma J. (1995). Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* **14**, 185-189.
- Patneau DK, Vyklicky L, Jr. & Mayer ML. (1993). Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate. *J Neurosci* **13**, 3496-3509.
- Petralia RS, Rubio ME & Wenthold RJ. (1998). Selectivity in the distribution of glutamate receptors in neurons. *Cell Biol Int* **22**, 603-608.
- Petralia RS, Wang YX, Singh S, Wu C, Shi L, Wei J & Wenthold RJ. (1997). A monoclonal antibody shows discrete cellular and subcellular localizations of mGluR1 alpha metabotropic glutamate receptors. *J Chem Neuroanat* **13**, 77-93.
- Piccolino M. (1998). Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani. *Brain Res Bull* **46**, 381-407.
- Pin JP, Waeber C, Prezeau L, Bockaert J & Heinemann SF. (1992). Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10331-10335.
- Pindzola RR, Doller C & Silver J. (1993). Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol* **156**, 34-48.
- Pisani A, Gubellini P, Bonsi P, Conquet F, Picconi B, Centonze D, Bernardi G & Calabresi P. (2001). Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience* **106**, 579-587.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW & Maffei L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* **298**, 1248-1251.
- Ploppler G. (2013). Principles of Cell Biology, pp. 187-225. Jones & Barlett LEARNING.
- Powell KA, Valova VA, Malladi CS, Jensen ON, Larsen MR & Robinson PJ. (2000). Phosphorylation of dynamin I on Ser-795 by protein kinase C blocks its association with phospholipids. *J Biol Chem* **275**, 11610-11617.
- Prabhakar V, Capila I, Bosques CJ, Pojasek K & Sasisekharan R. (2005). Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem J* **386**, 103-112.

- Preston E, Webster J & Small D. (2001). Characteristics of sustained blood-brain barrier opening and tissue injury in a model for focal trauma in the rat. *J Neurotrauma* **18**, 83-92.
- Properzi F, Carulli D, Asher RA, Muir E, Camargo LM, van Kuppevelt TH, ten Dam GB, Furukawa Y, Mikami T, Sugahara K, Toida T, Geller HM & Fawcett JW. (2005). Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia. *Eur J Neurosci* **21**, 378-390.
- Ramón y Cajal S. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrales*, vol. 1 y 2. Mantoine, Paris.
- Ramos MC, Steinbrenner H, Stuhlmann D, Sies H & Brenneisen P. (2004). Induction of MMP-10 and MMP-1 in a squamous cell carcinoma cell line by ultraviolet radiation. *Biol Chem* **385**, 75-86.
- Rauch U. (2004). Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2031-2045.
- Reier PJ. (1979). Penetration of grafted astrocytic scars by regenerating optic nerve axons in *Xenopus* tadpoles. *Brain Res* **164**, 61-68.
- Reznikov KY. (1991). Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **122**, 1-74.
- Rhodes KE & Fawcett JW. (2004). Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J Anat* **204**, 33-48.
- Rodriguez-Moreno A & Lerma J. (1998). Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* **20**, 1211-1218.
- Rolls A, Avidan H, Cahalon L, Schori H, Bakalash S, Litvak V, Lev S, Lider O & Schwartz M. (2004). A disaccharide derived from chondroitin sulphate proteoglycan promotes central nervous system repair in rats and mice. *Eur J Neurosci* **20**, 1973-1983.
- Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP & O'Malley KL. (2001). Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol* **59**, 46-53.
- Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol AN & Olney JW. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* **355**, 455-469.
- Rudge JS & Silver J. (1990). Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* **10**, 3594-3603.
- Ruoslahti E. (1996). Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **6**, 489-492.
- Saghatelyan AK, Dityatev A, Schmidt S, Schuster T, Bartsch U & Schachner M. (2001). Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term

- potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci* **17**, 226-240.
- Saugstad JA, Kinzie JM, Mulvihill ER, Segerson TP & Westbrook GL. (1994). Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* **45**, 367-372.
- Saugstad JA, Kinzie JM, Shinohara MM, Segerson TP & Westbrook GL. (1997). Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. *Mol Pharmacol* **51**, 119-125.
- Schoepp DD, Johnson BG, Smith EC & McQuaid LA. (1990). Stereoselectivity and mode of inhibition of phosphoinositide-coupled excitatory amino acid receptors by 2-amino-3-phosphonopropionic acid. *Mol Pharmacol* **38**, 222-228.
- Schwartz NE & Alford S. (2000). Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release. *J Neurophysiol* **84**, 415-427.
- Seeburg PH. (1997). Neurodegeneration. A silent channel opens its gates. *Nature* **388**, 716-717.
- Senkov O, Tikhobrazova O & Dityatev A. (2012). PSA-NCAM: Synaptic functions mediated by its interactions with proteoglycans and glutamate receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 591-595.
- Shen Y, Tenney AP, Busch SA, Horn KP, Cuascut FX, Liu K, He Z, Silver J & Flanagan JG. (2009). PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* **326**, 592-596.
- Shepherd G. (1979). *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press
- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S & Mizuno N. (1993). Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett* **163**, 53-57.
- Shioi J, Pangalos MN, Ripellino JA, Vassilacopoulou D, Mytilineou C, Margolis RU & Robakis NK. (1995). The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures. *J Biol Chem* **270**, 11839-11844.
- Shiosaka S & Yoshida S. (2000). Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors. *Neurosci Res* **37**, 85-89.
- Shipp EL & Hsieh-Wilson LC. (2007). Profiling the sulfation specificities of glycosaminoglycan interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays. *Chem Biol* **14**, 195-208.
- Silver J & Miller JH. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* **5**, 146-156.

- Sistiaga A & Sanchez-Prieto J. (2000). Protein phosphatase 2B inhibitors mimic the action of arachidonic acid and prolong the facilitation of glutamate release by group I mGlu receptors. *Neuropharmacology* **39**, 1544-1553.
- Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM & He Z. (2004). PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* **7**, 261-268.
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J & Weiss S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **317**, 717-719.
- Smith-Thomas LC, Stevens J, Fok-Seang J, Faissner A, Rogers JH & Fawcett JW. (1995). Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J Cell Sci* **108 (Pt 3)**, 1307-1315.
- Snow DM, Atkinson PB, Hassinger TD, Letourneau PC & Kater SB. (1994). Chondroitin sulfate proteoglycan elevates cytoplasmic calcium in DRG neurons. *Dev Biol* **166**, 87-100.
- Snow DM, Lemmon V, Carrino DA, Caplan AI & Silver J. (1990). Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **109**, 111-130.
- Sole S, Petegnief V, Gorina R, Chamorro A & Planas AM. (2004). Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 338-349.
- Srinivasan J, Schachner M & Catterall WA. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15753-15757.
- Stanfield BB, Caviness VS, Jr. & Cowan WM. (1979). The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* **185**, 461-483.
- Steinmetz MP, Horn KP, Tom VJ, Miller JH, Busch SA, Nair D, Silver DJ & Silver J. (2005). Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord. *J Neurosci* **25**, 8066-8076.
- Stowell JN & Craig AM. (1999). Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron* **22**, 525-536.
- Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K & Kitagawa H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 612-620.
- Suppiramaniam V, Vaithianathan T, Manivannan K, Dhanasekaran M, Parameshwaran K & Bahr BA. (2006). Modulatory effects of dextran sulfate and fucoidan on binding and channel properties of AMPA receptors isolated from rat brain. *Synapse* **60**, 456-464.
- Susuki K & Rasband MN. (2008). Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 616-623.

- Sykova E & Chvatal A. (1993). Extracellular ionic and volume changes: the role in glia-neuron interaction. *J Chem Neuroanat* **6**, 247-260.
- Szpak GM, Lewandowska E, Wierzba-Bobrowicz T, Bertrand E, Pasennik E, Mendel T, Stepień T, Leszczynska A & Rafalowska J. (2007). Small cerebral vessel disease in familial amyloid and non-amyloid angiopathies: FAD-PS-1 (P117L) mutation and CADASIL. Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Folia Neuropathol* **45**, 192-204.
- Takahashi K, Tsuchida K, Tanabe Y, Masu M & Nakanishi S. (1993). Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination. *J Biol Chem* **268**, 19341-19345.
- Takeuchi K, Yoshioka N, Higa Onaga S, Watanabe Y, Miyata S, Wada Y, Kudo C, Okada M, Ohko K, Oda K, Sato T, Yokoyama M, Matsushita N, Nakamura M, Okano H, Sakimura K, Kawano H, Kitagawa H & Igarashi M. (2013). Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nat Commun* **4**, 2740.
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R & Nakanishi S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* **8**, 169-179.
- Taylor KR & Gallo RL. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J* **20**, 9-22.
- Theodosis DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G & Poulain DA. (1999). Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J Neurosci* **19**, 10228-10236.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM & Silver J. (2004). Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci* **24**, 6531-6539.
- Tong G, Shepherd D & Jahr CE. (1995). Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin. *Science* **267**, 1510-1512.
- Traynelis SF, Hartley M & Heinemann SF. (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**, 873-876.
- Vaillant C, Didier-Bazes M, Hutter A, Belin MF & Thomasset N. (1999). Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci* **19**, 4994-5004.
- Vasilyev DV & Barish ME. (2003). Regulation of an inactivating potassium current (I_A) by the extracellular matrix protein vitronectin in embryonic mouse hippocampal neurones. *J Physiol* **547**, 859-871.
- Vasilyev DV & Barish ME. (2004). Regulation of the hyperpolarization-activated cationic current I_h in mouse hippocampal pyramidal neurones by vitronectin, a component of extracellular matrix. *J Physiol* **560**, 659-675.

- Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG & Yong VW. (2000). Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* **61**, 212-224.
- Wang H, Katagiri Y, McCann TE, Unsworth E, Goldsmith P, Yu ZX, Tan F, Santiago L, Mills EM, Wang Y, Symes AJ & Geller HM. (2008). Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth. *J Cell Sci* **121**, 3083-3091.
- Watkins JC. (1981). Pharmacology of excitatory amino acid transmitters. *Adv Biochem Psychopharmacol* **29**, 205-212.
- Watsky MA & Rae JL. (1991). Resting voltage measurements of the rabbit corneal endothelium using patch-current clamp techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**, 106-111.
- Weber P, Bartsch U, Rasband MN, Czaniera R, Lang Y, Bluethmann H, Margolis RU, Levinson SR, Shrager P, Montag D & Schachner M. (1999). Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* **19**, 4245-4262.
- Wu XS & Wu LG. (2001). Protein kinase c increases the apparent affinity of the release machinery to Ca²⁺ by enhancing the release machinery downstream of the Ca²⁺ sensor. *J Neurosci* **21**, 7928-7936.
- Xiao ZC, Ragsdale DS, Malhotra JD, Mattei LN, Braun PE, Schachner M & Isom LL. (1999). Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem* **274**, 26511-26517.
- Xu J, Kim GM, Ahmed SH, Xu J, Yan P, Xu XM & Hsu CY. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury. *J Neurosci* **21**, 92-97.
- Yick LW, Cheung PT, So KF & Wu W. (2003). Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. *Exp Neurol* **182**, 160-168.
- Yiu G & He Z. (2003). Signaling mechanisms of the myelin inhibitors of axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 545-551.
- Yiu G & He Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* **7**, 617-627.
- Yong VW. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* **6**, 931-944.
- Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R & Edwards DR. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* **21**, 75-80.
- Yoshiyama Y, Asahina M & Hattori T. (2000). Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* **99**, 91-95.

- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J & Snutch TP. (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* **385**, 442-446.
- Zaremba S, Guimaraes A, Kalb RG & Hockfield S. (1989). Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron* **2**, 1207-1219.
- Zhou FQ, Walzer M, Wu YH, Zhou J, Dedhar S & Snider WD. (2006). Neurotrophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism. *J Cell Sci* **119**, 2787-2796.
- Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG & Muir D. (1998a). Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* **18**, 5203-5211.
- Zuo J, Neubauer D, Dyess K, Ferguson TA & Muir D. (1998b). Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp Neurol* **154**, 654-662.
- Airas, J. M., H. Betz, et al. (2001). "PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding." *FEBS Lett* **494**(1-2): 60-3.
- Alkondon, M., E. F. Pereira, et al. (1999). "Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices." *J Neurosci* **19**(7): 2693-705.
- Amaral, D. G. (1978). "A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat." *J Comp Neurol* **182**(4 Pt 2): 851-914.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1995). Hippocampal formation. *The Rat Nervous System*. San Diego, In G. Paxinos Acad. Press Inc. **1**.
- Amet, L. E., S. E. Lauri, et al. (2001). "Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule." *Mol Cell Neurosci* **17**(6): 1014-24.
- Angevine, J. B., Jr. (1965). "Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse." *Exp Neurol Suppl*: Suppl 2:1-70.
- Arai, K., S. R. Lee, et al. (2003). "Essential role for ERK mitogen-activated protein kinase in matrix metalloproteinase-9 regulation in rat cortical astrocytes." *Glia* **43**(3): 254-64.
- Arnaiz-Cot, J. J., J. C. Gonzalez, et al. (2008). "Allosteric modulation of alpha 7 nicotinic receptors selectively depolarizes hippocampal interneurons, enhancing spontaneous GABAergic transmission." *Eur J Neurosci* **27**(5): 1097-110.
- Arnaud, L., B. A. Ballif, et al. (2003). "Regulation of protein tyrosine kinase signaling by substrate degradation during brain development." *Mol Cell Biol* **23**(24): 9293-302.
- Baig, S., G. K. Wilcock, et al. (2005). "Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **110**(4): 393-401.
- Bairati, A., Jr. and A. Bianchini (1953). "[Histochemical studies on mucopolysaccharides in human embryos during the first months of life]." *Boll Soc Ital Biol Sper* **29**(12): 1880-1.
- Bandtlow, C. E. and D. R. Zimmermann (2000). "Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins." *Physiol Rev* **80**(4): 1267-90.
- Barker, J. L. and N. L. Harrison (1988). "Outward rectification of inhibitory postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurones." *J Physiol* **403**: 41-55.

- Barritt, A. W., M. Davies, et al. (2006). "Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury." *J Neurosci* **26**(42): 10856-67.
- Baude, A., Z. Nusser, et al. (1993). "The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction." *Neuron* **11**(4): 771-87.
- Berardi, N., T. Pizzorusso, et al. (2004). "Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse." *Neuron* **44**(6): 905-8.
- Berretta, S. (2011). "Extracellular matrix abnormalities in schizophrenia." *Neuropharmacology*.
- Bettler, B. and C. Mulle (1995). "Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors." *Neuropharmacology* **34**(2): 123-39.
- Beurdeley, M., J. Spatazza, et al. (2012). "Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex." *J Neurosci* **32**(27): 9429-37.
- Bignami, A., M. Hosley, et al. (1993). "Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix." *Anat Embryol (Berl)* **188**(5): 419-33.
- Bignami, A., G. Perides, et al. (1993). "Versican, a hyaluronate-binding proteoglycan of embryonal precartilaginous mesenchyma, is mainly expressed postnatally in rat brain." *J Neurosci Res* **34**(1): 97-106.
- Blackstad, T. W. (1956). "Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination." *J Comp Neurol* **105**(3): 417-537.
- Blackstad, T. W., K. Brink, et al. (1970). "Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods." *J Comp Neurol* **138**(4): 433-49.
- Blumcke, I., P. Egli, et al. (1995). "Relationship between astrocytic processes and "perineuronal nets" in rat neocortex." *Glia* **15**(2): 131-40.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *Embo J* **18**(7): 1723-9.
- Borkenhagen, M., J. F. Clemence, et al. (1998). "Three-dimensional extracellular matrix engineering in the nervous system." *J Biomed Mater Res* **40**(3): 392-400.
- Bortolotto, Z. A., S. M. Fitzjohn, et al. (1999). "Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus." *Curr Opin Neurobiol* **9**(3): 299-304.
- Boudin, H., A. Doan, et al. (2000). "Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site." *Neuron* **28**(2): 485-97.
- Bradbury, E. J., L. D. Moon, et al. (2002). "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury." *Nature* **416**(6881): 636-40.
- Brakebusch, C., C. I. Seidenbecher, et al. (2002). "Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory." *Mol Cell Biol* **22**(21): 7417-27.
- Brown, J. M., J. Xia, et al. (2012). "A sulfated carbohydrate epitope inhibits axon regeneration after injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(13): 4768-73.
- Bruckner, G., K. Brauer, et al. (1993). "Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain." *Glia* **8**(3): 183-200.
- Bruckner, G., W. Hartig, et al. (1996). "Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter." *J Neurocytol* **25**(5): 333-46.
- Bruckner, G., D. Hausen, et al. (1999). "Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease." *Neuroscience* **92**(3): 791-805.
- Bukalo, O., M. Schachner, et al. (2001). "Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus." *Neuroscience* **104**(2): 359-69.
- Busch, S. A. and J. Silver (2007). "The role of extracellular matrix in CNS regeneration." *Curr Opin Neurobiol* **17**(1): 120-7.

- Cafferty, W. B., A. W. McGee, et al. (2008). "Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity?" *Trends Neurosci* **31**(5): 215-20.
- Caggiano, A. O., M. P. Zimmer, et al. (2005). "Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord." *J Neurotrauma* **22**(2): 226-39.
- Cai, Z., J. A. Saugstad, et al. (2001). "Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates group III metabotropic glutamate receptors and inhibits their function as presynaptic receptors." *J Neurochem* **78**(4): 756-66.
- Canning, D. R., R. J. McKeon, et al. (1993). "beta-Amyloid of Alzheimer's disease induces reactive gliosis that inhibits axonal outgrowth." *Exp Neurol* **124**(2): 289-98.
- Cañas, N., T. Valero, et al. (2007). "Chondroitin sulfate protects SH-SY5Y cells from oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt." *J Pharmacol Exp Ther* **323**(3): 946-53.
- Carmichael, S. T. (2003). "Plasticity of cortical projections after stroke." *Neuroscientist* **9**(1): 64-75.
- Carulli, D., T. Pizzorusso, et al. (2010). "Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity." *Brain* **133**(Pt 8): 2331-47.
- Carulli, D., K. E. Rhodes, et al. (2006). "Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components." *J Comp Neurol* **494**(4): 559-77.
- Celio, M. R. and I. Blumcke (1994). "Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system." *Brain Res Brain Res Rev* **19**(1): 128-45.
- Celio, M. R., R. Spreafico, et al. (1998). "Perineuronal nets: past and present." *Trends Neurosci* **21**(12): 510-5.
- Clement, A. M., S. Nadanaka, et al. (1998). "The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth." *J Biol Chem* **273**(43): 28444-53.
- Clement, A. M., K. Sugahara, et al. (1999). "Chondroitin sulfate E promotes neurite outgrowth of rat embryonic day 18 hippocampal neurons." *Neurosci Lett* **269**(3): 125-8.
- Coles, C. H., Y. Shen, et al. (2011). "Proteoglycan-specific molecular switch for RPTPsigma clustering and neuronal extension." *Science* **332**(6028): 484-8.
- Conn, P. J. and J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 205-37.
- Deepa, S. S., Y. Umehara, et al. (2002). "Specific molecular interactions of oversulfated chondroitin sulfate E with various heparin-binding growth factors. Implications as a physiological binding partner in the brain and other tissues." *J Biol Chem* **277**(46): 43707-16.
- Deepa, S. S., S. Yamada, et al. (2004). "Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor." *J Biol Chem* **279**(36): 37368-76.
- Dergham, P., B. Ellezam, et al. (2002). "Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair." *J Neurosci* **22**(15): 6570-7.
- Dev, K. K., Y. Nakajima, et al. (2000). "PICK1 interacts with and regulates PKC phosphorylation of mGLUR7." *J Neurosci* **20**(19): 7252-7.
- DeWitt, D. A. and J. Silver (1996). "Regenerative failure: a potential mechanism for neuritic dystrophy in Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **142**(1): 103-10.
- DeWitt, D. A., J. Silver, et al. (1993). "Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **121**(2): 149-52.
- Dickendeshner, T. L., K. T. Baldwin, et al. (2012). "NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans." *Nat Neurosci* **15**(5): 703-12.

- Dietzmann, K., P. von Bossanyi, et al. (2000). "Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrests: an immunohistochemical study." Pathol Res Pract **196**(1): 15-21.
- Discher, D. E., P. Janmey, et al. (2005). "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate." Science **310**(5751): 1139-43.
- Dityatev, A., G. Bruckner, et al. (2007). "Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets." Dev Neurobiol **67**(5): 570-88.
- Dityatev, A. and T. Fellin (2008). "Extracellular matrix in plasticity and epileptogenesis." Neuron Glia Biol **4**(3): 235-47.
- Dityatev, A. and M. Schachner (2003). "Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **4**(6): 456-68.
- Dityatev, A., M. Schachner, et al. (2010). "The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis." Nat Rev Neurosci **11**(11): 735-46.
- Ehlers, M. D., S. Zhang, et al. (1996). "Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit." Cell **84**(5): 745-55.
- Emerling, D. E. and A. D. Lander (1996). "Inhibitors and promoters of thalamic neuron adhesion and outgrowth in embryonic neocortex: functional association with chondroitin sulfate." Neuron **17**(6): 1089-100.
- Engelman, H. S. and A. B. MacDermott (2004). "Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release." Nat Rev Neurosci **5**(2): 135-45.
- Evers, M. R., B. Salmen, et al. (2002). "Impairment of L-type Ca²⁺ channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C." J Neurosci **22**(16): 7177-94.
- Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, et al. (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." J Neurosci **24**(9): 2143-55.
- Filbin, M. T. (2003). "Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS." Nat Rev Neurosci **4**(9): 703-13.
- Fisher, D., B. Xing, et al. (2011). "Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors." J Neurosci **31**(40): 14051-66.
- Fitch, M. T., C. Doller, et al. (1999). "Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma." J Neurosci **19**(19): 8182-98.
- Fitch, M. T. and J. Silver (2008). "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." Exp Neurol **209**(2): 294-301.
- Fitzjohn, S. M., A. J. Irving, et al. (1996). "Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices." Neurosci Lett **203**(3): 211-3.
- Flor, P. J., K. Lindauer, et al. (1995). "Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2." Eur J Neurosci **7**(4): 622-9.
- Fonnum, F. (1984). "Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain." J Neurochem **42**(1): 1-11.
- Fotuhi, M., D. G. Standaert, et al. (1994). "Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat." Brain Res Mol Brain Res **21**(3-4): 283-92.
- Freedman, B. (1953). "Hyaluronidase effects on thionin-stained sections on brain." Anat Rec **115**(2): 265-70.
- Freund, T. F. and G. Buzsaki (1996). "Interneurons of the hippocampus." Hippocampus **6**(4): 347-470.

- Frischknecht, R., M. Heine, et al. (2009). "Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity." *Nat Neurosci* **12**(7): 897-904.
- Fujita, Y., T. Sasaki, et al. (1996). "Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin." *J Biol Chem* **271**(13): 7265-8.
- Gaarskjaer, F. B. (1986). "The organization and development of the hippocampal mossy fiber system." *Brain Res* **396**(4): 335-57.
- Galtrey, C. M. and J. W. Fawcett (2007). "The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system." *Brain Res Rev* **54**(1): 1-18.
- Galvani, L. (1791). "De viribus electricitatis in motu musculari commentarius." *Bon Sci Art Inst Acad Comm* **7**: 363-418.
- Gama, C. I., S. E. Tully, et al. (2006). "Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity." *Nat Chem Biol* **2**(9): 467-73.
- Geiger, J. R., T. Melcher, et al. (1995). "Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS." *Neuron* **15**(1): 193-204.
- Gereau, R. W. t. and S. F. Heinemann (1998). "Role of protein kinase C phosphorylation in rapid desensitization of metabotropic glutamate receptor 5." *Neuron* **20**(1): 143-51.
- Gierke, H. (1885). "Die Stützsubstanz des Central nerven systems." *Arch Mikrosk Anat* **25**: 441-554.
- Gilbert, R. J., R. J. McKeon, et al. (2005). "CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is a potent inhibitor of neurite extension." *Mol Cell Neurosci* **29**(4): 545-58.
- Glegg, R. E., D. Eidinger, et al. (1953). "Some carbohydrate components of reticular fibers." *Science* **118**(3073): 614-6.
- Glegg, R. E. and R. H. Pearce (1956). "Chemical extraction of metachromatic and periodic acid-Schiff positive carbohydrates from cerebral tissue." *J Comp Neurol* **106**(2): 291-7.
- Gogolla, N., P. Caroni, et al. (2009). "Perineuronal nets protect fear memories from erasure." *Science* **325**(5945): 1258-61.
- Gomez, T. M. and N. C. Spitzer (1999). "In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients." *Nature* **397**(6717): 350-5.
- Gonzalez, J. C., E. Albinana, et al. (2011). "Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the enhancement of spontaneous GABAergic postsynaptic currents in hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **33**(1): 69-81.
- Gottschall, P. E. and X. Yu (1995). "Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes." *J Neurochem* **64**(4): 1513-20.
- Grimpe, B. and J. Silver (2004). "A novel DNA enzyme reduces glycosaminoglycan chains in the glial scar and allows microtransplanted dorsal root ganglia axons to regenerate beyond lesions in the spinal cord." *J Neurosci* **24**(6): 1393-7.
- Gupta-Bansal, R., R. C. Frederickson, et al. (1995). "Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation." *J Biol Chem* **270**(31): 18666-71.
- Hagihara, K., R. Miura, et al. (1999). "Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain." *J Comp Neurol* **410**(2): 256-64.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* **391**(2): 85-100.
- Hartig, W., A. Derouiche, et al. (1999). "Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations." *Brain Res* **842**(1): 15-29.

- Hartig, W., C. Klein, et al. (2001). "Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison." *Neurobiol Aging* **22**(1): 25-33.
- Hausen, D., G. Bruckner, et al. (1996). "Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex." *Neuroreport* **7**(11): 1725-9.
- Hayashi, T. (1954). "Effects of sodium glutamate on the nervous system." *The Keio Journal Of Medicine* **3**: 183-192.
- Hayashita-Kinoh, H., H. Kinoh, et al. (2001). "Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth." *Cell Growth Differ* **12**(11): 573-80.
- Hjorth-Simonsen, A. (1972). "Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata." *J Comp Neurol* **146**(2): 219-32.
- Hobohm, C., A. Gunther, et al. (2005). "Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats." *J Neurosci Res* **80**(4): 539-48.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1939). "Action potentials recorded from inside a nerve fibre." *Nature* **144**: 710-711.
- Horn, R. and A. Marty (1988). "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method." *J Gen Physiol* **92**(2): 145-59.
- Houamed, K. M., J. L. Kuijper, et al. (1991). "Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain." *Science* **252**(5010): 1318-21.
- Houle, J. D. (1991). "Demonstration of the potential for chronically injured neurons to regenerate axons into intraspinal peripheral nerve grafts." *Exp Neurol* **113**(1): 1-9.
- Hrabetova, S., D. Masri, et al. (2009). "Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC." *J Physiol* **587**(Pt 16): 4029-49.
- Hsu, J. Y., L. Y. Bourguignon, et al. (2008). "Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord." *J Neurosci* **28**(50): 13467-77.
- Hsu, J. Y., R. McKeon, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-2 facilitates wound healing events that promote functional recovery after spinal cord injury." *J Neurosci* **26**(39): 9841-50.
- Imagama, S., K. Sakamoto, et al. (2011). "Keratan sulfate restricts neural plasticity after spinal cord injury." *J Neurosci* **31**(47): 17091-102.
- Isa, T., S. Itazawa, et al. (1996). "Distribution of neurones expressing inwardly rectifying and Ca(2+)-permeable AMPA receptors in rat hippocampal slices." *J Physiol* **491** (Pt 3): 719-33.
- Isaacson, R. (1987). Hippocampus. *Encyclopedia of Neurosciences*. Basel, Adelman, G. Birkaushe. **1**: 492-495.
- Ishizuka, N., J. Weber, et al. (1990). "Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat." *J Comp Neurol* **295**(4): 580-623.
- John, N., H. Krugel, et al. (2006). "Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures." *Mol Cell Neurosci* **31**(4): 774-84.
- Johnson, K. G., A. P. Tenney, et al. (2006). "The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development." *Neuron* **49**(4): 517-31.
- Jones, L. L., R. U. Margolis, et al. (2003). "The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury." *Exp Neurol* **182**(2): 399-411.
- Kaksonen, M., I. Pavlov, et al. (2002). "Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory." *Mol Cell Neurosci* **21**(1): 158-72.
- Kantor, D. B., O. Chivatakarn, et al. (2004). "Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans." *Neuron* **44**(6): 961-75.

- Karp, G. (2010). Interactions between cells and environment. Cell Biology, International Student Version. G. Karp, John Wiley & Sons, Inc. : 230-263.
- Kato, M., H. Wang, et al. (1998). "Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2." Nat Med **4**(6): 691-7.
- Kawashima, H., K. Atarashi, et al. (2002). "Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines." J Biol Chem **277**(15): 12921-30.
- Kazarinova-Noyes, K., J. D. Malhotra, et al. (2001). "Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression." J Neurosci **21**(19): 7517-25.
- Kendall, D. A. (1993). "Direct and indirect responses to metabotropic glutamate receptor activation in the brain." Biochem Soc Trans **21**(4): 1120-3.
- Khan, K. M., D. J. Falcone, et al. (2002). "Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **277**(3): 2353-9.
- Kim, G. W., Y. Gasche, et al. (2003). "Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption?" J Neurosci **23**(25): 8733-42.
- Kobayashi, K., P. C. Emson, et al. (1989). "Vicia villosa lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia." Brain Res **498**(1): 170-4.
- Koppe, G., G. Bruckner, et al. (1997). "Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain." Cell Tissue Res **288**(1): 33-41.
- Koprivica, V., K. S. Cho, et al. (2005). "EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans." Science **310**(5745): 106-10.
- Kuettner, K. E. (1992). "Biochemistry of articular cartilage in health and disease." Clin Biochem **25**(3): 155-63.
- Kunishima, N., Y. Shimada, et al. (2000). "Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor." Nature **407**(6807): 971-7.
- Kwok, J. C., F. Afshari, et al. (2008). "Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC." Restor Neurol Neurosci **26**(2-3): 131-45.
- Kwok, J. C., G. Dick, et al. (2011). "Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair." Dev Neurobiol **71**(11): 1073-89.
- Laatsch, R. H. and W. M. Cowan (1966). "Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization." J Comp Neurol **128**(3): 359-95.
- Leblond, C. P. (1950). "Distribution of periodic acid-reactive carbohydrates in the adult rat." Am J Anat **86**(1): 1-49.
- Lehmenkuhler, A., E. Sykova, et al. (1993). "Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis." Neuroscience **55**(2): 339-51.
- Jerma, J. (1997). "Kainate reveals its targets." Neuron **19**(6): 1155-8.
- Lesma, E., A. M. Di Giulio, et al. (1996). "Glycosaminoglycans in nerve injury: 1. Low doses of glycosaminoglycans promote neurite formation." J Neurosci Res **46**(5): 565-71.
- Li, H. P., Y. Komuta, et al. (2013). "Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain." J Neurotrauma **30**(5): 413-25.
- Lopes da Silva, F. H., M. P. Witter, et al. (1990). "Anatomic organization and physiology of the limbic cortex." Physiol Rev **70**(2): 453-511.
- Lorente de Nó, R. (1934). "Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the Ammonic system." J Psychol Neurol **46**: 113-177.

- Lujan, R., Z. Nusser, et al. (1996). "Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus." Eur J Neurosci **8**(7): 1488-500.
- Ma, Z., H. Qin, et al. (2001). "Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha." J Immunol **167**(9): 5150-9.
- Machida, C. M., J. D. Scott, et al. (1991). "NGF-induction of the metalloproteinase-transin/stromelysin in PC12 cells: involvement of multiple protein kinases." J Cell Biol **114**(5): 1037-48.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" Science **285**(5435): 1870-4.
- Manzoni, O., L. Fagni, et al. (1990). "(trans)-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate stimulates quisqualate phosphoinositide-coupled receptors but not ionotropic glutamate receptors in striatal neurons and *Xenopus* oocytes." Mol Pharmacol **38**(1): 1-6.
- Margolis, R. U. and R. K. Margolis (1997). "Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding." Cell Tissue Res **290**(2): 343-8.
- Margolis, R. U., R. K. Margolis, et al. (1975). "Glycosaminoglycans of brain during development." Biochemistry **14**(1): 85-8.
- Martin-de-Saavedra, M. D., L. del Barrio, et al. (2011). "Chondroitin sulfate reduces cell death of rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation by inhibiting p38, NFkappaB and iNOS." Neurochem Int **58**(6): 676-83.
- Mary, S., D. Stephan, et al. (1997). "The rat mGlu1d receptor splice variant shares functional properties with the other short isoforms of mGlu1 receptor." Eur J Pharmacol **335**(1): 65-72.
- Masu, M., Y. Tanabe, et al. (1991). "Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor." Nature **349**(6312): 760-5.
- Matthews, R. T., G. M. Kelly, et al. (2002). "Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets." J Neurosci **22**(17): 7536-47.
- McKeon, R. J., A. Hoke, et al. (1995). "Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars." Exp Neurol **136**(1): 32-43.
- McKeon, R. J., R. C. Schreiber, et al. (1991). "Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes." J Neurosci **11**(11): 3398-411.
- McLaurin, J., T. Franklin, et al. (1999). "Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth." Eur J Biochem **266**(3): 1101-10.
- McRae, P. A. and B. E. Porter (2012). "The perineuronal net component of the extracellular matrix in plasticity and epilepsy." Neurochem Int **61**(7): 963-72.
- Michaelis, E. K. (1998). "Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging." Prog Neurobiol **54**(4): 369-415.
- Mikami, T., D. Yasunaga, et al. (2009). "Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E." J Biol Chem **284**(7): 4494-9.
- Milev, P., P. Maurel, et al. (1998). "Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican." Biochem Biophys Res Commun **247**(2): 207-12.
- Milev, P., H. Monnerie, et al. (1998). "The core protein of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan is a high-affinity ligand of fibroblast growth factor-2 and potentiates its mitogenic activity." J Biol Chem **273**(34): 21439-42.
- Minakami, R., K. Iida, et al. (1995). "The expression of two splice variants of metabotropic glutamate receptor subtype 5 in the rat brain and neuronal cells during development." J Neurochem **65**(4): 1536-42.

- Minakami, R., N. Jinnai, et al. (1997). "Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro." *J Biol Chem* **272**(32): 20291-8.
- Mironova, Y. A. and R. J. Giger (2013). "Where no synapses go: gatekeepers of circuit remodeling and synaptic strength." *Trends Neurosci* **36**(6): 363-73.
- Miyata, S., Y. Komatsu, et al. (2012). "Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation." *Nat Neurosci* **15**(3): 414-22, S1-2.
- Miyata, S., Y. Nakatani, et al. (2005). "Matrix-degrading enzymes tissue plasminogen activator and matrix metalloprotease-3 in the hypothalamo-neurohypophysial system." *Brain Res* **1058**(1-2): 1-9.
- Monnier, P. P., A. Sierra, et al. (2003). "The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar." *Mol Cell Neurosci* **22**(3): 319-30.
- Monyer, H., N. Burnashev, et al. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." *Neuron* **12**(3): 529-40.
- Moon, L. D., R. A. Asher, et al. (2001). "Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC." *Nat Neurosci* **4**(5): 465-6.
- Moon, L. D., R. A. Asher, et al. (2002). "Relationship between sprouting axons, proteoglycans and glial cells following unilateral nigrostriatal axotomy in the adult rat." *Neuroscience* **109**(1): 101-17.
- Morawski, M., G. Bruckner, et al. (2010). "Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against tau pathology in subcortical regions in Alzheimer's disease." *Neuroscience* **169**(3): 1347-63.
- Morawski, M., G. Bruckner, et al. (2011). "Involvement of Perineuronal and Perisynaptic Extracellular Matrix in Alzheimer's Disease Neuropathology." *Brain Pathol.*
- Morawski, M., M. K. Bruckner, et al. (2004). "Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress." *Exp Neurol* **188**(2): 309-15.
- Morris, N. P. and Z. Henderson (2000). "Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin-immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex." *Eur J Neurosci* **12**(3): 828-38.
- Muir, D. (1994). "Metalloproteinase-dependent neurite outgrowth within a synthetic extracellular matrix is induced by nerve growth factor." *Exp Cell Res* **210**(2): 243-52.
- Muir, D. (1995). "Differences in proliferation and invasion by normal, transformed and NF1 Schwann cell cultures are influenced by matrix metalloproteinase expression." *Clin Exp Metastasis* **13**(4): 303-14.
- Muller, C. M. and C. B. Griesinger (1998). "Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex." *Nat Neurosci* **1**(1): 47-53.
- Nagel, S., J. D. Sandy, et al. (2005). "Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons." *Brain Res* **1056**(1): 43-50.
- Nakajima, Y., H. Iwakabe, et al. (1993). "Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate." *J Biol Chem* **268**(16): 11868-73.
- Nakajima, Y., T. Yamamoto, et al. (1999). "A relationship between protein kinase C phosphorylation and calmodulin binding to the metabotropic glutamate receptor subtype 7." *J Biol Chem* **274**(39): 27573-7.
- Nakanishi, K., Y. Tokita, et al. (2010). "Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor." *Neurochem Res* **35**(8): 1131-7.
- Nakanishi, S. and M. Masu (1994). "Molecular diversity and functions of glutamate receptors." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 319-48.

- Nandini, C. D. and K. Sugahara (2006). "Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors." *Adv Pharmacol* **53**: 253-79.
- Niciu, M. J., B. Kelmendi, et al. (2012). "Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system." *Pharmacol Biochem Behav* **100**(4): 656-64.
- Nicoletti, F., J. L. Meek, et al. (1986). "Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus." *J Neurochem* **46**(1): 40-6.
- Nieuwenhuys, R., J. Voogd, et al. (1982). *SNC : sinopsis y atlas del sistema nervioso central humano*. Madrid, Editorial AC.
- Nordstrom, L. A., J. Lochner, et al. (1995). "The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae." *Mol Cell Neurosci* **6**(1): 56-68.
- Numann, R., W. A. Catterall, et al. (1991). "Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation." *Science* **254**(5028): 115-8.
- O'Hara, P. J., P. O. Sheppard, et al. (1993). "The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins." *Neuron* **11**(1): 41-52.
- Okamoto, M., S. Mori, et al. (1994). "Chondroitin sulfate proteoglycans protect cultured rat's cortical and hippocampal neurons from delayed cell death induced by excitatory amino acids." *Neurosci Lett* **172**(1-2): 51-4.
- Oray, S., A. Majewska, et al. (2004). "Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation." *Neuron* **44**(6): 1021-30.
- Orlando, C., J. Ster, et al. (2012). "Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner." *J Neurosci* **32**(50): 18009-17.
- Ozawa, S., H. Kamiya, et al. (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* **54**(5): 581-618.
- Pantazopoulos, H., T. U. Woo, et al. (2010). "Extracellular matrix-glia abnormalities in the amygdala and entorhinal cortex of subjects diagnosed with schizophrenia." *Arch Gen Psychiatry* **67**(2): 155-66.
- Park, K. P., A. Rosell, et al. (2009). "Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats." *Stroke* **40**(8): 2836-42.
- Partin, K. M., D. K. Patneau, et al. (1993). "Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A." *Neuron* **11**(6): 1069-82.
- Paternain, A. V., M. Morales, et al. (1995). "Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons." *Neuron* **14**(1): 185-9.
- Patneau, D. K., L. Vyklicky, Jr., et al. (1993). "Hippocampal neurons exhibit cyclothiazide-sensitive rapidly desensitizing responses to kainate." *J Neurosci* **13**(8): 3496-509.
- Petralia, R. S., M. E. Rubio, et al. (1998). "Selectivity in the distribution of glutamate receptors in neurons." *Cell Biol Int* **22**(9-10): 603-8.
- Petralia, R. S., Y. X. Wang, et al. (1997). "A monoclonal antibody shows discrete cellular and subcellular localizations of mGluR1 alpha metabotropic glutamate receptors." *J Chem Neuroanat* **13**(2): 77-93.
- Piccolino, M. (1998). "Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani." *Brain Res Bull* **46**(5): 381-407.
- Pin, J. P., C. Waeber, et al. (1992). "Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10331-5.
- Pindzola, R. R., C. Doller, et al. (1993). "Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions." *Dev Biol* **156**(1): 34-48.
- Pisani, A., P. Gubellini, et al. (2001). "Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons." *Neuroscience* **106**(3): 579-87.

- Pizzorusso, T., P. Medini, et al. (2002). "Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex." *Science* **298**(5596): 1248-51.
- Ploppler, G. (2013). *Principles of Cell Biology*, Jones & Barlett LEARNING.
- Powell, K. A., V. A. Valova, et al. (2000). "Phosphorylation of dynamin I on Ser-795 by protein kinase C blocks its association with phospholipids." *J Biol Chem* **275**(16): 11610-7.
- Prabhakar, V., I. Capila, et al. (2005). "Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification." *Biochem J* **386**(Pt 1): 103-12.
- Preston, E., J. Webster, et al. (2001). "Characteristics of sustained blood-brain barrier opening and tissue injury in a model for focal trauma in the rat." *J Neurotrauma* **18**(1): 83-92.
- Properzi, F., D. Carulli, et al. (2005). "Chondroitin 6-sulphate synthesis is up-regulated in injured CNS, induced by injury-related cytokines and enhanced in axon-growth inhibitory glia." *Eur J Neurosci* **21**(2): 378-90.
- Ramón y Cajal, S. (1911). *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrales*. Paris, Mantoine.
- Ramos, M. C., H. Steinbrenner, et al. (2004). "Induction of MMP-10 and MMP-1 in a squamous cell carcinoma cell line by ultraviolet radiation." *Biol Chem* **385**(1): 75-86.
- Rauch, U. (2004). "Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain." *Cell Mol Life Sci* **61**(16): 2031-45.
- Reier, P. J. (1979). "Penetration of grafted astrocytic scars by regenerating optic nerve axons in *Xenopus tadpoles*." *Brain Res* **164**: 61-8.
- Reznikov, K. Y. (1991). "Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus." *Adv Anat Embryol Cell Biol* **122**: 1-74.
- Rhodes, K. E. and J. W. Fawcett (2004). "Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?" *J Anat* **204**(1): 33-48.
- Rodriguez-Moreno, A. and J. Lerma (1998). "Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function." *Neuron* **20**(6): 1211-8.
- Rolls, A., H. Avidan, et al. (2004). "A disaccharide derived from chondroitin sulphate proteoglycan promotes central nervous system repair in rats and mice." *Eur J Neurosci* **20**(8): 1973-83.
- Romano, C., J. K. Miller, et al. (2001). "Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization." *Mol Pharmacol* **59**(1): 46-53.
- Romano, C., M. A. Sesma, et al. (1995). "Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain." *J Comp Neurol* **355**(3): 455-69.
- Rudge, J. S. and J. Silver (1990). "Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro." *J Neurosci* **10**(11): 3594-603.
- Ruoslahti, E. (1996). "Brain extracellular matrix." *Glycobiology* **6**(5): 489-92.
- Saghatelyan, A. K., A. Dityatev, et al. (2001). "Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R." *Mol Cell Neurosci* **17**(1): 226-40.
- Saugstad, J. A., J. M. Kinzie, et al. (1994). "Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors." *Mol Pharmacol* **45**(3): 367-72.
- Saugstad, J. A., J. M. Kinzie, et al. (1997). "Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile." *Mol Pharmacol* **51**(1): 119-25.
- Schoepp, D. D., B. G. Johnson, et al. (1990). "Stereoselectivity and mode of inhibition of phosphoinositide-coupled excitatory amino acid receptors by 2-amino-3-phosphonopropionic acid." *Mol Pharmacol* **38**(2): 222-8.
- Schwartz, N. E. and S. Alford (2000). "Physiological activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors increases intracellular calcium and glutamate release." *J Neurophysiol* **84**(1): 415-27.

- Seeburg, P. H. (1997). "Neurodegeneration. A silent channel opens its gates." Nature **388**(6644): 716-7.
- Senkov, O., O. Tikhobrazova, et al. (2012). "PSA-NCAM: Synaptic functions mediated by its interactions with proteoglycans and glutamate receptors." Int J Biochem Cell Biol **44**(4): 591-5.
- Shen, Y., A. P. Tenney, et al. (2009). "PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration." Science **326**(5952): 592-6.
- Shepherd, G. (1979). The synaptic organization of the brain, Oxford University Press
- Shigemoto, R., S. Nomura, et al. (1993). "Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain." Neurosci Lett **163**(1): 53-7.
- Shioi, J., M. N. Pangalos, et al. (1995). "The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures." J Biol Chem **270**(20): 11839-44.
- Shiosaka, S. and S. Yoshida (2000). "Synaptic microenvironments--structural plasticity, adhesion molecules, proteases and their inhibitors." Neurosci Res **37**(2): 85-9.
- Shipp, E. L. and L. C. Hsieh-Wilson (2007). "Profiling the sulfation specificities of glycosaminoglycan interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays." Chem Biol **14**(2): 195-208.
- Silver, J. and J. H. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." Nat Rev Neurosci **5**(2): 146-56.
- Sistiaga, A. and J. Sanchez-Prieto (2000). "Protein phosphatase 2B inhibitors mimic the action of arachidonic acid and prolong the facilitation of glutamate release by group I mGlu receptors." Neuropharmacology **39**(9): 1544-53.
- Sivasankaran, R., J. Pei, et al. (2004). "PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration." Nat Neurosci **7**(3): 261-8.
- Sladeczek, F., J. P. Pin, et al. (1985). "Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones." Nature **317**(6039): 717-9.
- Smith-Thomas, L. C., J. Stevens, et al. (1995). "Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors." J Cell Sci **108 (Pt 3)**: 1307-15.
- Snow, D. M., P. B. Atkinson, et al. (1994). "Chondroitin sulfate proteoglycan elevates cytoplasmic calcium in DRG neurons." Dev Biol **166**(1): 87-100.
- Snow, D. M., V. Lemmon, et al. (1990). "Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro." Exp Neurol **109**(1): 111-30.
- Sole, S., V. Petegnief, et al. (2004). "Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion." J Neuropathol Exp Neurol **63**(4): 338-49.
- Srinivasan, J., M. Schachner, et al. (1998). "Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15753-7.
- Stanfield, B. B., V. S. Caviness, Jr., et al. (1979). "The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice." J Comp Neurol **185**(3): 461-83.
- Steinmetz, M. P., K. P. Horn, et al. (2005). "Chronic enhancement of the intrinsic growth capacity of sensory neurons combined with the degradation of inhibitory proteoglycans allows functional regeneration of sensory axons through the dorsal root entry zone in the mammalian spinal cord." J Neurosci **25**(35): 8066-76.
- Stowell, J. N. and A. M. Craig (1999). "Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains." Neuron **22**(3): 525-36.
- Sugahara, K., T. Mikami, et al. (2003). "Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate." Curr Opin Struct Biol **13**(5): 612-20.

- Suppiramaniam, V., T. Vaithianathan, et al. (2006). "Modulatory effects of dextran sulfate and fucoidan on binding and channel properties of AMPA receptors isolated from rat brain." *Synapse* **60**(6): 456-64.
- Susuki, K. and M. N. Rasband (2008). "Molecular mechanisms of node of Ranvier formation." *Curr Opin Cell Biol* **20**(6): 616-23.
- Sykova, E. and A. Chvatal (1993). "Extracellular ionic and volume changes: the role in glia-neuron interaction." *J Chem Neuroanat* **6**(4): 247-60.
- Szpak, G. M., E. Lewandowska, et al. (2007). "Small cerebral vessel disease in familial amyloid and non-amyloid angiopathies: FAD-PS-1 (P117L) mutation and CADASIL. Immunohistochemical and ultrastructural studies." *Folia Neuropathol* **45**(4): 192-204.
- Takahashi, K., K. Tsuchida, et al. (1993). "Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination." *J Biol Chem* **268**(26): 19341-5.
- Takeuchi, K., N. Yoshioka, et al. (2013). "Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury." *Nat Commun* **4**: 2740.
- Tanabe, Y., M. Masu, et al. (1992). "A family of metabotropic glutamate receptors." *Neuron* **8**(1): 169-79.
- Taylor, K. R. and R. L. Gallo (2006). "Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation." *Faseb J* **20**(1): 9-22.
- Theodosis, D. T., R. Bonhomme, et al. (1999). "Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity." *J Neurosci* **19**(23): 10228-36.
- Tom, V. J., M. P. Steinmetz, et al. (2004). "Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury." *J Neurosci* **24**(29): 6531-9.
- Tong, G., D. Shepherd, et al. (1995). "Synaptic desensitization of NMDA receptors by calcineurin." *Science* **267**(5203): 1510-2.
- Traynelis, S. F., M. Hartley, et al. (1995). "Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines." *Science* **268**(5212): 873-6.
- Vaillant, C., M. Didier-Bazes, et al. (1999). "Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum." *J Neurosci* **19**(12): 4994-5004.
- Vasilyev, D. V. and M. E. Barish (2003). "Regulation of an inactivating potassium current (IA) by the extracellular matrix protein vitronectin in embryonic mouse hippocampal neurones." *J Physiol* **547**(Pt 3): 859-71.
- Vasilyev, D. V. and M. E. Barish (2004). "Regulation of the hyperpolarization-activated cationic current Ih in mouse hippocampal pyramidal neurones by vitronectin, a component of extracellular matrix." *J Physiol* **560**(Pt 3): 659-75.
- Vecil, G. G., P. H. Larsen, et al. (2000). "Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo." *J Neurosci Res* **61**(2): 212-24.
- Wang, H., Y. Katagiri, et al. (2008). "Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth." *J Cell Sci* **121**(Pt 18): 3083-91.
- Watkins, J. C. (1981). "Pharmacology of excitatory amino acid transmitters." *Adv Biochem Psychopharmacol* **29**: 205-12.
- Weber, P., U. Bartsch, et al. (1999). "Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS." *J Neurosci* **19**(11): 4245-62.
- Wu, X. S. and L. G. Wu (2001). "Protein kinase c increases the apparent affinity of the release machinery to Ca²⁺ by enhancing the release machinery downstream of the Ca²⁺ sensor." *J Neurosci* **21**(20): 7928-36.

- Xiao, Z. C., D. S. Ragsdale, et al. (1999). "Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits." *J Biol Chem* **274**(37): 26511-7.
- Xu, J., G. M. Kim, et al. (2001). "Glucocorticoid receptor-mediated suppression of activator protein-1 activation and matrix metalloproteinase expression after spinal cord injury." *J Neurosci* **21**(1): 92-7.
- Yick, L. W., P. T. Cheung, et al. (2003). "Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC." *Exp Neurol* **182**(1): 160-8.
- Yiu, G. and Z. He (2003). "Signaling mechanisms of the myelin inhibitors of axon regeneration." *Curr Opin Neurobiol* **13**(5): 545-51.
- Yiu, G. and Z. He (2006). "Glial inhibition of CNS axon regeneration." *Nat Rev Neurosci* **7**(8): 617-27.
- Yong, V. W. (2005). "Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS." *Nat Rev Neurosci* **6**(12): 931-44.
- Yong, V. W., C. A. Krekoski, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS." *Trends Neurosci* **21**(2): 75-80.
- Yoshiyama, Y., M. Asahina, et al. (2000). "Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain." *Acta Neuropathol* **99**(2): 91-5.
- Zamponi, G. W., E. Bourinet, et al. (1997). "Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit." *Nature* **385**(6615): 442-6.
- Zaremba, S., A. Guimaraes, et al. (1989). "Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301." *Neuron* **2**(3): 1207-19.
- Zhou, F. Q., M. Walzer, et al. (2006). "Neurotrophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism." *J Cell Sci* **119**(Pt 13): 2787-96.
- Zuo, J., T. A. Ferguson, et al. (1998). "Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan." *J Neurosci* **18**(14): 5203-11.
- Zuo, J., D. Neubauer, et al. (1998). "Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue." *Exp Neurol* **154**(2): 654-62.

APÉNDICE

Durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral he publicado parte de los resultados obtenidos y presentados en esta memoria en el siguiente artículo original:

- **TÍTULO:** *Chondroitin sulfate, a major component of the perineuronal net, elicits inward currents, cell depolarization and calcium transients by acting on AMPA and kainate receptors of hippocampal neurons.*
REVISTA: *Journal of Neurochemistry* **Doi:** 10.1111/jnc.12159

AUTORES: Marcos Maroto, José-Carlos Fernández-Morales, Juan Fernando Padín, José C. González, Jesús M. Hernández-Guijo, Eulalia Montell, Josep Vergés, Antonio M.G.

Además he sido coautor en otras publicaciones que han contribuido a mi formación predoctoral. Las enumero a continuación.

- **TÍTULO:** *Presynaptic muscarinic receptors reduce synaptic depression and facilitate its recovery at hippocampal GABAergic synapses*
REVISTA: *Cerebral Cortex* **Doi:** 10.1093/cercor/bht032

AUTORES: González J.C., Lignani G., **Maroto M.**, Baldelli P., and Hernández-Guijo J.M.

- **TÍTULO:** *A neural extracellular matrix-based method for in vitro hippocampal neuron culture and dopaminergic differentiation of neural stem cells*
REVISTA: *BMC Neuroscience* **Doi:** 10.1186/1471-2202-14-48

AUTORES: Patricia García-Parra, **Marcos Maroto**, Fabio Cavaliere, Neia Naldaiz-Gastesi, José I. Álava, Antonio G. García, Adolfo López de Munain and Ander Izeta.

- **TÍTULO:** *Murine muscle engineered from dermal precursors: An in vitro model for skeletal muscle generation, degeneration and fatty infiltration*
REVISTA: *Tissue Engineering* **Doi:** 10.1089/ten.tec.2013.0146

AUTORES: Patricia García-Parra, Neia Naldaiz-Gastesi, **Marcos Maroto**, Juan Fernando Padín, María Goicoechea, Ana Aiastui, José Carlos Fernández-Morales, Paula García-Belda, Jaione Lacalle, Jose Iñaki Álava, José Manuel García-Verdugo, Antonio G. García, Ander Izeta, and Adolfo López de Munain.

- **TÍTULO:** *Multi-target novel neuroprotective compound ith33/iqm9.21 inhibits calcium entry, calcium signals and exocytosis.*
REVISTA: *Cell calcium* **Doi:** 10.1016/j.ceca.2011.06.006 V:50 Article:4 Pages:359-69

AUTORES: **Marcos Maroto**, Antonio M.G. de Diego, Elisa Albiñana, José C. Fernández-Morales, Afonso Caricati-Neto, Aron Jurkiewicz, Matilde Yáñez, María Isabel Rodríguez-Franco, Santiago Conde, Mariana P. Arce, Jesús M. Hernández-Guijo and Antonio G. García