

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



**FISIOPATOLOGÍA DE LAS MANIFESTACIONES  
NEUROLÓGICAS DE LA DEFICIENCIA DE  
HIPOXANTINA-GUANINA  
FOSFORRIBOSILTRANSFERASA (HPRT). REPERCUSIÓN  
DE LA DISMINUCIÓN DEL TRANSPORTE DE  
ADENOSINA SOBRE LA FUNCIÓN Y/O EXPRESIÓN DE  
LOS RECEPTORES DE ADENOSINA, DOPAMINA Y  
SEROTONINA.**

**TESIS DOCTORAL  
Marta García García**

**MADRID 2011**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**FISIOPATOLOGÍA DE LAS MANIFESTACIONES  
NEUROLÓGICAS DE LA DEFICIENCIA DE  
HIPOXANTINA-GUANINA  
FOSFORRIBOSILTRANSFERASA (HPRT). REPERCUSIÓN  
DE LA DISMINUCIÓN DEL TRANSPORTE DE  
ADENOSINA SOBRE LA FUNCIÓN Y/O EXPRESIÓN DE  
LOS RECEPTORES DE ADENOSINA, DOPAMINA Y  
SEROTONINA.**

Memoria que presenta la Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid

**Marta García García**

Para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

**Rosa Torres Jiménez**

**Juan García Puig**

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Hospital Universitario “La PAZ”

MADRID 2011



Facultad de Ciencias  
**Departamento de Biología**

D<sup>a</sup>. Rosa Torres Jiménez, con DNI 00794353-W, Investigador Biomédico contratado por la Fundación de Investigación del Hospital Universitario La Paz y D. Juan García Puig, con DNI 50405123-W, Jefe Clínico del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz y profesor titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que Doña Marta García García, Licenciada en Biología, con DNI 51451501-H, ha realizado bajo nuestra co-dirección, en el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario La Paz el trabajo titulado:

**Fisiopatología de las manifestaciones neurológicas de la deficiencia de HPRT.  
Repercusión de la disminución del transporte de adenosina sobre la función y/o  
expresión de los receptores de adenosina, dopamina y serotonina.**

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como tesis doctoral con el objeto de optar al título de Doctora en Genética y Biología celular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos firmamos el presente certificado en,

Madrid, 29 de abril de 2011

Fdo.: Rosa Torres Jiménez  
Co-director de la tesis

Fdo.: Juan García Puig  
Co-director de la tesis



Facultad de Ciencias  
**Departamento de Biología**

D. José Fernández Piqueras, Catedrático de Genética en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid,

**CERTIFICA:**

Que Doña Marta García García, Licenciada en Biología, con DNI 51451501-H, ha realizado, en el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario La Paz el trabajo titulado:

**Fisiopatología de las manifestaciones neurológicas de la deficiencia de Hipoxantina-Guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). Repercusión de la disminución del transporte de adenosina sobre la función y/o expresión de los receptores de adenosina, dopamina y serotonina.**

Una vez supervisado el trabajo, confirmo que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como tesis doctoral con el objeto de optar al título de Doctora en Genética y Biología celular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos firmo el presente certificado en,

Madrid, 29 de abril de 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. F. Piqueras', written over a horizontal line.

Fdo.: José Fernández Piqueras  
Tutor académico de la tesis

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario La Paz gracias a un proyecto de investigación financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (FIS 06/0019) y a una ayuda de apoyo a Proyectos de Investigación con financiación pública financiados insuficientemente por entidades públicas externas de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz

***A mis abuelos***

*“Aquel que duda y no investiga  
se torna, no sólo infeliz,  
sino también injusto”.*

*Blaise Pascal.*

## ***AGRADECIMIENTOS***



## AGRADECIMIENTOS

---

Realmente no tengo mucha gente a la que agradecer de corazón su apoyo y ayuda, aún así nunca habría llegado a ser lo que soy, en lo profesional y en lo personal, sin ellos.

Empezaré los agradecimientos de esta tesis doctoral por la persona "culpable" sin saberlo de que eligiera la investigación como camino, esa persona es mi abuela. Ella, siempre en un segundo plano con su generosidad, su amor por el prójimo, su capacidad de entrega y su sabiduría, fue mi segunda madre y su muerte, el motor que me empujó hasta donde estoy hoy.

A ti, abuela te dedico esta tesis y a ti también, abuelo: De ti aprendí que la vida hay que vivirla pase lo que pase, fuiste el padre que nunca tuve y me guiaste como tal, me diste la ternura y dedicación que sólo un abuelo sabe dar y bromeaste conmigo como sólo un amigo hace. A los dos os dedico mi trabajo porque sin vosotros dos nunca habría llegado hasta aquí.

La siguiente persona a la que quiero agradecer su apoyo, su paciencia y su ayuda es a mi madre, la única persona que siempre ha estado a mi lado en lo bueno y en lo malo, sin juzgarme y demostrando una comprensión que sólo una madre puede mostrar, sin ella y sin su casi instintiva capacidad de lucha y protección de sus "crías" no sería lo que soy.

Quiero agradecer a mi tercera madre, mi tía, el tiempo invertido en mí, en que, pese a las circunstancias, pudiera divertirme como una niña ajena a todo lo malo que la rodea, a sus juegos, su imaginación y por supuesto, su paciencia, sin ella no hubiera tenido la infancia que todo niño debe tener.

Finalmente, no podría dejar de agradecer a la familia sin antes mencionar a mi hermano, mi compañero en esta aventura que es la vida y que nos ha tocado vivir juntos. Los mejores momentos de mi niñez son con él y los peores

## AGRADECIMIENTOS

---

también. Quiero agradecerle su capacidad de perdón y superación porque son un ejemplo a seguir. Gracias por tratar de hacerme subir cuando he estado abajo porque, pese a tu juventud, muchas veces tienes la madurez y sabiduría de un anciano.

También quiero agradecer a mi pequeña "familia científica":

A mi Pigmalión, el doctor Jesús Molano, él me introdujo en el mundo de la investigación y siempre le estaré agradecida por ello, y a su mujer, la doctora M<sup>a</sup> Jesús Mazón, por darme la oportunidad de aprender con y de ella, por enseñarme que la disciplina, el tesón y la capacidad de trabajo son herramientas necesarias para un investigador.

A la doctora M<sup>a</sup> Sol Santa Cruz, por darme la oportunidad de investigar cuando sólo era una estudiante de tercero de carrera, poniéndome en contacto con el doctor Molano.

También quiero mostrar mi agradecimiento de manera especial a la doctora Rosa Torres, por su capacidad de ver soluciones y no problemas, por su optimismo, su paciencia y comprensión y por creer en mí en momentos en que ni siquiera yo lo hacía. Gracias por hacerme crecer tanto profesional como personalmente.

Al doctor Juan García Puig, por ayudarme más de lo que él se imagina y por ser un ejemplo de cómo el entusiasmo y las ganas de trabajar pueden aumentar con los años.

No puedo olvidarme de Marta, que no sólo es una gran profesional sino que cada día me ha demostrado que es una amiga. ¡Y pensar que todo empezó tomando el sol en una piedra!... También tengo que agradecer a Adela nuestras

## AGRADECIMIENTOS

---

conversaciones sobre ciencia y sobre la vida en general, las risas... Gracias por intentar comprenderme y darme siempre algún buen consejo, el laboratorio tiene un color especial desde que estás en él. A la doctora Paloma Martínez por su cuerda locura y sus consejos de madre. A los tres mosqueteros, Héctor, Pedro y Rubén por los buenos momentos que he pasado con cada uno de vosotros.

Al resto de gente del laboratorio, a Alberta, Vero, Miri... por esos desayunos de risas en verano. A José Carlos, por su buen humor y sus enseñanzas filosóficas combinadas con chistes con ese arte que él solo tiene. A Christian, por ser tan "pelión" y por ayudarme siempre que se lo he pedido sin poner mala cara. A Blanca por ofrecer ayuda cuando me ha visto en un mal momento. A las chicas de secuenciación, Rocío e Inma, por tener siempre buena cara escucharan lo que escucharan...

No me olvido de los residentes que han ido rotando a lo largo de estos años y que han alegrado el laboratorio sin dejar de lado el trabajo: Juan Fran, Paloma, Ana, Leyre y especialmente el cuarteto del Niño Jesús: M<sup>a</sup> José, Miguel, M<sup>a</sup> Eugenia y Silvia, espero que os vaya bien a todos porque os lo merecéis.

Por último quiero recordar a toda esa gente que me ha hecho daño a lo largo de mi vida, gracias a vosotros soy más fuerte.

Y si he olvidado a alguien a lo largo de los agradecimientos, no lo tengáis en cuenta, consideraos agradecidos.

## ***RESUMEN***

## RESUMEN

---

El síndrome de Lesch-Nyhan (SLN; OMIM: 300322) es una alteración congénita del metabolismo de las purinas debida a la deficiencia de la actividad de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT; EC 2.4.2.8). Se caracteriza por hiperuricemia y/o hiperuricosuria y una afectación neurológica singular: distonía, coreoatetosis, retraso mental de medio a moderado y, la mayoría de los pacientes, auto mutilación (Lesch y Nyhan, 1964).

Las manifestaciones neurológicas del SLN podrían estar relacionadas con un desequilibrio de neurotransmisores, más que por la afectación aislada de uno sólo (Nyhan, 2000). El acúmulo de hipoxantina, secundario a la deficiencia de HPRT, ocasiona una disminución del transporte de adenosina, al competir con ella por sus transportadores (Prior *et al.*, 2007). Esto, a su vez, causaría un aumento de la cantidad de adenosina extracelular que puede unirse al receptor alterando la expresión y función de sus receptores (Torres *et al.*, 2004). Dada la interacción entre los distintos receptores acoplados a proteínas G, la alteración en la transmisión mediada por adenosina condicionaría una alteración dopaminérgica y/o serotoninérgica.

El principal objetivo de este trabajo ha sido confirmar el desequilibrio de los neurotransmisores adenosina, dopamina y serotonina a nivel de sus receptores, en linfocitos HPRT deficientes mediante “RT-PCR a Tiempo Real”, Western Blotting y enzimoinmunoensayo.

Nuestros resultados confirman un desequilibrio de los neurotransmisores dopamina, adenosina y serotonina tanto a nivel de expresión de sus receptores como a nivel proteico, con un incremento de la expresión y de la proteína del receptor de dopamina D<sub>5</sub>, (García *et al.*, 2009), una disminución significativa del receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y un descenso en 8 de los 12 pacientes analizados (67%) del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> en los linfocitos HPRT deficientes respecto a los linfocitos procedentes de individuos control (García *et al.*, 2009). Además, hemos observado que, el receptor de dopamina D<sub>5</sub>, en los linfocitos procedentes de pacientes con el SLN, está afectado a nivel funcional. Estas modificaciones en los receptores podrían tener repercusión terapéutica en el SLN.

## ***ÍNDICES***

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. El síndrome de Lesch-Nyhan.....	1
2. Manifestaciones del síndrome de Lesch-Nyhan.....	4
2.1. Tratamiento de las manifestaciones del síndrome de Lesch-Nyhan.....	5
3. Hipótesis sobre la fisiopatología de las manifestaciones neurológicas del síndrome de Lesch-Nyhan.....	6
3.1. Dopamina y síndrome de Lesch-Nyhan.....	7
3.1.1. Hipótesis conexión purina – dopamina.....	13
3.1.1.1. Distribución diferencial de la enzima HPRT en el cerebro.....	13
3.1.1.2. Estrés oxidativo.....	14
3.1.1.3. Neurogénesis alterada.....	15
3.2. Serotonina y síndrome de Lesch-Nyhan.....	16
3.3. Adenosina y síndrome de Lesch-Nyhan.....	20
3.4. Toxicidad metabólica.....	23
3.4.1. Ácido úrico.....	23
3.4.2. Hipoxantina y xantina.....	24
3.4.3. 5-amino-4-imidazol carboxamida.....	25
3.5. Depleción de nucleótidos.....	26
3.6. Resumen.....	27
4. Interacción entre neurotransmisores.....	27

## ÍNDICE GENERAL

---

4.1. Acoplamiento dopamina - adenosina: heteromerización receptor de dopamina D <sub>2</sub> - receptor de adenosina A <sub>2A</sub> .....	28
4.2. Interacción adenosina - serotonina.....	29
4.3. Interacción dopamina - serotonina.....	30
4.4. Interacción dopamina - adenosina - serotonina en el síndrome de Lesch-Nyhan.....	31
5. Linfocitos como modelo de estudio en el síndrome de Lesch-Nyhan.....	31
<b>HIPÓTESIS</b> .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
1. Cuantificación de la expresión de los receptores de adenosina A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , los receptores de dopamina D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> y D <sub>5</sub> , del transportador de dopamina DAT y de los receptores de serotonina 5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> y 5-HT <sub>2C</sub> en linfocitos de sangre periférica en condiciones basales y tras incubación con hipoxantina 25 µM.....	34
1.1. Muestras analizadas.....	34
1.2. Separación de linfocitos de sangre periférica y extracción del ARN.....	34
1.3. Efecto del exceso de hipoxantina.....	36
1.4 Cuantificación de la expresión de los receptores de adenosina, de los receptores y el transportador de dopamina y de los receptores de serotonina por “PCR a Tiempo Real”.....	36



## ÍNDICE GENERAL

---

2. Efecto del tiempo de cultivo sobre la expresión de DRD <sub>5</sub> , ADORA <sub>2A</sub> y 5-HTR <sub>1A</sub> .....	39
3. Cuantificación y detección de proteínas.....	40
3.1. Obtención de los extractos y condiciones de cultivo.....	40
3.2. Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras proteicas.....	41
3.3. Electroforesis de proteínas, transferencia a membranas e inmunodetección (“Western-Blotting”).....	41
4. Determinación de los niveles de AMP cíclico (AMPC) en condiciones basales y en presencia del agonista SKF-38393.....	43
4.1. Estimulación de C-PBL y LN-PBL con forskolina.....	45
4.2. Estimulación de C-PBL y LN-PBL con SKF 38393.....	46
5. Análisis de datos.....	47
5.1. Cuantificación de la expresión de ADORA <sub>2A</sub> , ADORA <sub>2B</sub> , DRD <sub>3</sub> , DRD <sub>4</sub> , DRD <sub>5</sub> , de 5-HTR <sub>1A</sub> y de DAT.....	47
5.2. Cuantificación a nivel proteico de ADORA <sub>2A</sub> , DRD <sub>2</sub> , DRD <sub>5</sub> y 5-HTR <sub>1A</sub> .....	49
5.3. Determinación de los niveles de AMP cíclico (AMPC) en condiciones basales y en presencia del agonista SKF-38393.....	49
<b>RESULTADOS</b> .....	51

## ÍNDICE GENERAL

---

1. Cuantificación de la expresión de ADORA <sub>2A</sub> , ADORA <sub>2B</sub> , DRD <sub>2</sub> , DRD <sub>3</sub> , DRD <sub>4</sub> , DRD <sub>5</sub> , de DAT y de 5-HTR <sub>1A</sub> , 5-HTR <sub>1B</sub> y 5-HTR <sub>2C</sub> en linfocitos de sangre periférica en condiciones basales y tras incubación con hipoxantina 25 µM.....	51
1.1. Cuantificación de la expresión de DRD <sub>3</sub> , DRD <sub>4</sub> y DRD <sub>5</sub> .....	51
1.2. Cuantificación de la expresión de DAT.....	52
1.3. Cuantificación de la expresión de ADORA <sub>2A</sub> y ADORA <sub>2B</sub> .....	53
1.4. Cuantificación de la expresión de 5-HTR <sub>1A</sub> .....	55
2. Efecto del tiempo de cultivo sobre la expresión de DRD <sub>5</sub> , de ADORA <sub>2A</sub> y de 5-HTR <sub>1A</sub> .....	56
3. Cuantificación y detección de proteínas.....	61
3.1. Detección de los niveles de proteína del receptor D <sub>2</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN en condiciones basales.....	61
3.2. Detección de los niveles de proteína del receptor d <sub>2</sub> en extractos proteicos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia y ausencia de hipoxantina 25 µM.....	61
3.3. Detección de los niveles de proteína del receptor D <sub>5</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN.....	62
3.4. Detección de los niveles de proteína del receptor D <sub>5</sub> en extractos proteicos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia y ausencia de hipoxantina 25 µM.....	63
3.5. Detección de los niveles de proteína de DRD <sub>5</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días.....	63

## ÍNDICE GENERAL

---

3.6. Detección de los niveles de proteína de A <sub>2A</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN.....	64
3.7. Detección de los niveles de proteína del receptor A <sub>2A</sub> en extractos proteicos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia y ausencia de hipoxantina 25 µM.....	64
3.8. Detección de los niveles de proteína del receptor A <sub>2A</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días.....	65
3.9. Detección de los niveles de proteína de 5-HTR <sub>1A</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN.....	66
3.10. Detección de los niveles de proteína de 5-HTR <sub>1A</sub> en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días.....	66
4. Determinación de los niveles de AMP cíclico (AMPC) en condiciones basales y en presencia del agonista SKF-38393.....	67
4.1. Estimulación de C-PBL y LN-PBL con forskolina.....	67
4.2. Estimulación de C-PBL y LN-PBL con SKF 38393.....	68
<b>DISCUSIÓN</b> .....	70
<b>CONCLUSIONES</b> .....	86
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	82
<b>ANEXO A: PUBLICACIONES</b> .....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

Figura 1. Metabolismo de los nucleótidos hasta ácido úrico.....	3
Figura 2. Síndrome de Lesch-Nyhan.....	4
Figura 3. Activación de las proteínas G.....	7
Figura 4. Efecto de los receptores de tipo D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> sobre la Adenilato ciclasa.....	8
Figura 5. Representación esquemática bidimensional del transportador de dopamina humano DAT.....	10
Figura. 6. Hipótesis del estrés oxidante para el SLN.....	14
Figura 7. Estructura del neurotransmisor serotonina (5-HT).....	17
Figura 8. Neurotransmisión serotoninérgica.....	19
Figura 9. Estructura química de la adenosina.....	20
Figura 10. Representación esquemática de la interacción entre los receptores A <sub>2A</sub> y D <sub>2</sub> a nivel de membrana y citoplasmático en las neuronas GABAérgicas del estriado.....	29
Figura 11. Documentador de geles para quimioluminiscencia.....	43
Figura 12. Fundamento del enzimuinmunoensayo (EIA).....	44
Figura 13. Recta patrón para la determinación de AMPc.....	45
Figura 14. Ecuación basada en el modelo matemático diseñado por Michael W. Pfaffl para el cálculo de la expresión, cuantificada por "PCR a Tiempo Real", de dos genes en relación a otro de referencia.....	48
Figura 15. <i>Box Plot</i> mostrando A. Expresión de los receptores de dopamina D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> y D <sub>5</sub> en C-PBLs vs. LN-PBLs. y B. expresión de los receptores de dopamina D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> y D <sub>5</sub> en C-PBL <sub>Hx</sub> vs. C-PBL <sub>W</sub> .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 16. <i>Box Plot</i> mostrando A. Expresión del transportador DAT en C-PBLs vs. LN-PBLs. B. Expresión del transportador DAT en PBL <sub>W</sub> vs PBL <sub>Hx</sub> .....	53
Figura 17. <i>Box Plot</i> mostrando A. Expresión de ADORA <sub>2A</sub> y ADORA <sub>2B</sub> en C-PBLs comparada con la expresión de ADORA <sub>2A</sub> y ADORA <sub>2B</sub> en LN-PBLs B. Valores individuales de la expresión de ADORA <sub>2A</sub> en los linfocitos control y en los de los pacientes con el SLN y C. <i>Box Plot</i> mostrando expresión de los receptores ADORA <sub>2B</sub> y ADORA <sub>2A</sub> en C-PBL <sub>Hx</sub> vs. C-PBL <sub>W</sub> .....	54
Figura 18. <i>Box Plot</i> mostrando expresión del receptor 5-HTR <sub>1A</sub> en C-PBL y en LN-PBL.....	55
Figura 19. <i>Box Plot</i> mostrando expresión del receptor 5-HTR <sub>1A</sub> en PBL <sub>W</sub> vs PBL <sub>Hx</sub> .....	55
Figura 20. Diagrama de barras mostrando efecto del tiempo de incubación en la expresión del receptor DRD <sub>5</sub> , ADORA <sub>2A</sub> y 5-HTR <sub>1A</sub> en C-PBL.....	56
Figura 21. Diagrama de barras mostrando efecto del tiempo de incubación en la expresión del receptor A. DRD <sub>5</sub> , ADORA <sub>2A</sub> , 5-HTR <sub>1A</sub> en LN-PBL.....	58
Figura 22. Diagrama de barras mostrando el efecto del tiempo de incubación en la expresión del receptor DRD <sub>5</sub> , ADORA <sub>2A</sub> , 5-HTR <sub>1A</sub> en C-PBL y LN-PBL.....	60
Figura 23. Western Blot del receptor de dopamina D <sub>2</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN.....	61
Figura 24. Western Blot del receptor de dopamina D <sub>2</sub> en extractos de individuos control cultivados en presencia o ausencia de hipoxantina.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 25. Western Blot del receptor de dopamina D <sub>5</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN.....	62
Figura 26. Western Blot del receptor de dopamina D <sub>5</sub> en extractos de individuos control cultivados en presencia o ausencia de hipoxantina.....	63
Figura 27. Western Blot del receptor de dopamina D <sub>5</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días.....	63
Figura 28. Western Blot del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN.....	64
Figura 29. Western Blot del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> en extractos de individuos control cultivados en presencia o ausencia de hipoxantina.....	65
Figura 30. Western Blot del receptor de adenosina A <sub>2A</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días.....	65
Figura 31. Western Blot de 5-HTR <sub>1A</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN.....	66
Figura 32. Western Blot de 5-HTR <sub>1A</sub> en extractos de individuos control y de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días.....	66
Figura 33. Representación gráfica de las concentraciones de AMPc linfocitos de individuos control y en linfocitos provenientes de pacientes con el SLN en condiciones basales y tras estimulación con forskolina.....	67
Figura 34. Aumento de AMPc en C-PBL y LN-PBL tras estimulación con forskolina.....	68
Figura 35. Determinación de la concentración de SKF 38393 tiempo de incubación en los que se determinó la máxima concentración de AMPc.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

Figura 36. Representación gráfica de las concentraciones de AMPc linfocitos de individuos control y en linfocitos provenientes de pacientes con el SLN en condiciones basales y tras estimulación con SKF-38393.....	69
Figura 37. Aumento de AMPc en C-PBL y en LN-PBL tras estimulación con SKF-38393.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Características de los receptores dopaminérgicos.....	9
Tabla 2. Familias y subfamilias de receptores serotoninérgicos.....	18
Tabla 3. Receptores P1 de adenosina.....	22
Tabla 4. Características clínicas, enzimáticas y genéticas de los pacientes incluidos en este estudio.....	35
Tabla 5. Cebadores y sondas empleados para la detección mediante “PCR a Tiempo Real” de ADORA <sub>2A</sub> y ADORA <sub>2B</sub> , DRD <sub>2</sub> , DRD <sub>3</sub> , DRD <sub>4</sub> y DRD <sub>5</sub> , de DAT, de 5-HTR <sub>1A</sub> , HTR <sub>1B</sub> y HTR <sub>2C</sub> .....	38
Tabla 6. Anticuerpos usados para la cuantificación a nivel proteico de DRD <sub>2</sub> , DRD <sub>5</sub> y de ADORA <sub>2A</sub> .....	42
Tabla 7. Resumen de los hallazgos más relevantes, en cuanto a los cambios de expresión y cantidad de proteína, cuantificados en ADORA <sub>2A</sub> , DRD <sub>5</sub> y 5-HTR <sub>1A</sub> en PBL procedentes de pacientes con SLN y en PBL procedentes de individuos control.....	77



## ***ABREVIATURAS***

## ABREVIATURAS

---

**AC:** Adenilato ciclasa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ADORA<sub>1</sub>:** Receptor de adenosina A<sub>1</sub>

**ADORA<sub>2A</sub>:** Receptor de adenosina A<sub>2A</sub>

**ADORA<sub>2B</sub>:** Receptor de adenosina A<sub>2B</sub>

**ADORA<sub>3</sub>:** Receptor de adenosina A<sub>3</sub>

**AMP:** Adenosín monofosfato

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**AMPK:** Proteína kinasa activada por AMP

**APRT:** Adenosina fosforribosiltransferasa humana

**Aprt:** Adenosina fosforribosiltransferasa murina

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**ATP:** Adenosín trifosfato

**Cp:** “Crossing point”

**ΔCp:** Variación del “crossing point”

**C-PBL:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de individuos control

**C-PBL<sub>w</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de individuos control cultivados en ausencia de hipoxantina

**C-PBL<sub>Hx</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de individuos control cultivados en presencia de hipoxantina

**C-PBL<sub>B</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de individuos control sin cultivar

**C-PBL<sub>4D</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de individuos control cultivados 4 días

**DAT:** Transportador de dopamina

**DRD<sub>1</sub>:** Receptor de dopamina 1

**DRD<sub>2</sub>:** Receptor de dopamina 2

**DRD<sub>3</sub>:** Receptor de dopamina 3

**DRD<sub>4</sub>:** Receptor de dopamina 4

**DRD<sub>5</sub>:** Receptor de dopamina 5

**DS:** Desviación estándar

## ABREVIATURAS

---

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EIA:** Enzimo inmunoensayo

**FBS:** Suero bovino fetal

**G<sub>s</sub>:** Proteína G estimuladora (activa a la Adenilato ciclase)

**G<sub>q</sub>:** Proteína G<sub>q</sub> (activa a la Fosfolipasa C)

**G<sub>i</sub>:** Proteína G inhibidora

**GABA:** Ácido  $\gamma$  aminobutírico

**GMP:** Guanosín monofosfato

**GDP:** Guanosín difosfato

**GTP:** Guanosín trifosfato

**HBSS:** Solución Hanks, del inglés “balanced salt solution”

**HPRT1:** Gen de la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa humano

**HPRT:** Hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa humana

**HPRT<sup>-</sup>:** Deficiencia de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa

**Hprt:** Gen de la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa murino

**Hprt<sup>-</sup>:** Ratón *knock out* para el gen Hprt

**Hprt<sup>-</sup> / Aprt<sup>-</sup>:** Ratón doble *knock out* para los genes Hprt y Aprt

**5-HT:** Serotonina

**5-HTR<sub>1A</sub>:** Receptor de serotonina 1A

**5-HTR<sub>1B</sub>:** Receptor de serotonina 1B

**5-HTR<sub>2C</sub>:** Receptor de serotonina 2C

**IMP:** Inositol monofosfato

**L-DOPA:** Levodopa

**LN-PBL:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de pacientes con el síndrome de Lesch-Nyhan

**LN-PBL<sub>w</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de pacientes con el síndrome de Lesch-Nyhan cultivados en ausencia de hipoxantina

**LN-PBL<sub>Hx</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de pacientes con el síndrome de Lesch-Nyhan cultivados en presencia de hipoxantina

**LN-PBL<sub>B</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de pacientes con el síndrome de Lesch-Nyhan sin cultivar

**LN-PBL<sub>4D</sub>:** Linfocitos de sangre venosa periférica procedentes de pacientes con el síndrome de Lesch-Nyhan cultivados 4 días

## ABREVIATURAS

---

**LCR:** Líquido ceforraquídeo

**NAD<sup>+</sup>:** Dinucleótido de nicotinamida-adenina

**NSB:** Unión inespecífica, del inglés “non substrate binding”

**PBL:** Linfocitos de sangre venosa periférica

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PET:** Tomografía por emisión de positrones

**PRPP:** Fosforribosil pirofosfato

**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

**SKF 38393:** 1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina-7,8-diol

**SLN:** Síndrome de Lesch-Nyhan

**SNC:** Sistema nervioso central

**T<sub>m</sub>:** Temperatura de desnaturalización

**TMB:** 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidine

**TPBS:** Tween tampón fosfato salino

**ZMP:** 5-amino-4-imidazol carboxamida

## ***INTRODUCCIÓN***

### 1. EL SÍNDROME DE LESCH-NYHAN

La enfermedad o síndrome de Lesch-Nyhan (SLN; OMIM: 300322) es una alteración congénita del metabolismo de las purinas, caracterizada por hiperuricemia (concentración de ácido úrico en sangre por encima de 7 miligramos por decilitro en varones adultos) y/o hiperuricosuria (aumento del ácido úrico en orina) y sus posibles patologías asociadas (nefrocalcinosis, insuficiencia renal, artritis gotosa y tofos).

Neurológicamente, estos pacientes presentan contracciones involuntarias permanentes de los músculos (distonía), coreoatetosis (movimientos incontrolables de brazos y piernas), retraso mental de medio a moderado y la mayoría de ellos, una conducta que provoca automutilaciones (Lesch y Nyhan, 1964).

La causa del SLN es la deficiencia de la actividad de la enzima Hipoxantina-Guanina fosforribosiltransferasa (HPRT; EC 2.4.2.8). La deficiencia parcial de la enzima HPRT causa fenotipos en los que algunos rasgos están atenuados o ausentes (Kelley *et al.*, 1969; Emmerson y Thompson, 1973; Puig *et al.*, 2001). Los pacientes con deficiencia parcial de HPRT se han agrupado en las denominadas “variantes del SLN” (Jinnah *et al.*, 2010). Todos estos pacientes presentan hiperuricemia y/o hiperuricosuria, y sus posibles patologías asociadas, así como un amplio espectro de manifestaciones neurológicas sin llegar a la automutilación (Kelley *et al.*, 1969).

Esta deficiencia se debe, generalmente, a una mutación en el gen que codifica para la síntesis de dicho enzima, HPRT1, localizado en la porción distal del brazo largo del cromosoma X (Xq26.1). Sólo hay una copia funcional de este gen en el genoma, aunque se han identificado cuatro pseudogenes: uno en el cromosoma 3, otro en el 5 y dos en el cromosoma 11 (Patel *et al.*, 1984). El gen tiene un tamaño de 44 Kilobases aproximadamente (NG\_012329.1) y consta de 9 exones separados por intrones de distintos tamaños. El ARN mensajero (ARNm) consta de 1435 pares de bases (NM\_000194.2) siendo la secuencia codificante de 654 pares de bases (Stout y Caskey, 1985).

La enzima nativa es un tetrámero de subunidades idénticas (Johnson y col., 1979). Cada monómero está compuesto por 217 amino ácidos y tiene una masa de 25 kilodaltons (kDa) (Wilson *et al.*, 1982).

## INTRODUCCIÓN

---

La deficiencia de HPRT se hereda de forma recesiva ligada al cromosoma X, aunque aparece de manera espontánea en el 30% de los enfermos. Por ello, el cuadro clínico sólo se expresa en varones, si bien se han descrito al menos 5 casos de niñas con el SLN debido a diferentes mecanismos moleculares (Ogasawara *et al.*, 1989; Aral *et al.*, 1996; De Gregorio *et al.*, 2000; De Gregorio *et al.*, 2005; Rinat *et al.*, 2006).

El gen que codifica la enzima HPRT pertenece a un grupo de genes, expresados constitutivamente, que codifican enzimas que desarrollan funciones metabólicas básicas. Esta familia de enzimas usa los enlaces fosfodiéster de alta energía del 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) en lugar del adenosín trifosfato (ATP) para la catálisis (Torres y Puig, 2007). Dentro de las funciones realizadas por estas enzimas están las desempeñadas en el metabolismo de los amino ácidos histidina y triptófano así como en el metabolismo de purinas, pirimidinas y nucleótidos de piridina. En concreto, la enzima HPRT participa en el metabolismo de las purinas, catalizando la conversión de hipoxantina y guanina en sus respectivos 5'-mononucleótidos (Torres y Puig, 2007). Las purinas celulares se pueden obtener a través de tres procesos distintos: la síntesis *de novo*, a partir de moléculas orgánicas más pequeñas, el reciclaje de las purinas preformadas y la captación del medio extracelular.

La enzima HPRT participa en la ruta de reciclaje junto a las enzimas Adenina fosforribosiltransferasa (APRT) y la Adenosina kinasa. La síntesis *de novo* tiene lugar en un proceso de varios pasos y requiere la contribución de cuatro aminoácidos, una molécula de PRPP, dos de folato y tres de ATP para sintetizar una molécula de inosina monofosfato (IMP). En concreto, la enzima HPRT cataliza la ruta de reciclaje de la inosina monofosfato (IMP) y guanosina monofosfato (GMP) a partir de las bases púricas hipoxantina y guanina respectivamente, utilizando PRPP como co-sustrato (Fig.1). En humanos, se ha estimado que alrededor del 90% de las purinas libres generadas durante el metabolismo intracelular son recicladas en lugar de degradadas o excretadas (Nyhan, 2005).

## INTRODUCCIÓN

La enzima APRT, que es estructural y funcionalmente muy similar a HPRT, recicla la adenina libre en AMP.

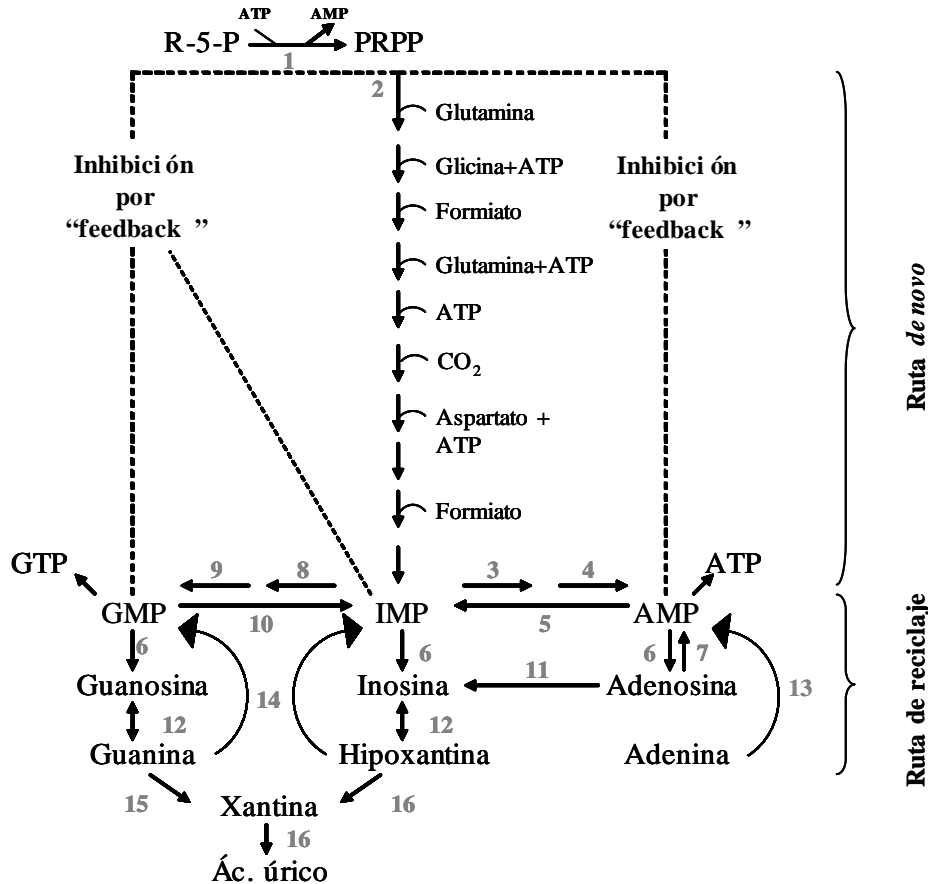


Figura 1. Metabolismo de los nucleótidos hasta el ácido úrico. La síntesis *de novo* tiene lugar en un proceso cuyo primer paso está mediado por la enzima 5'-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) amidotransferasa y que en una serie de pasos intermedios que requieren la contribución de cuatro aminoácidos, un PRPP, dos folatos y tres ATP, sintetiza una molécula de inosina monofosfato (IMP). La ruta de reciclaje está mediada por Hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT) y Adenina fosforribosiltransferasa (APRT). HPRT cataliza la ruta de reciclaje de la inosina monofosfato (IMP) y guanosina monofosfato (GMP) a partir de las purinas hipoxantina y guanina respectivamente, utilizando PRPP como co-sustrato. Las enzimas que se muestran en esta figura son: (1) PRPP sintetasa (2) PRPP amido fosforribosiltransferasa (3) Adenilosuccinato sintetasa (4) Adenilosuccinato liasa; (5) AMP deaminasa; (6) 5'-nucleotidasa; (7) Adenosina kinasa; (8) IMP dehidrogenasa; (9) GMP sintetasa; (10) GMP reductasa; (11) Adenosina desaminasa; (12) Purin nucleósido fosforilasa; (13) Adenina fosforribosiltransferasa; (14) HPRT; (15) Guanina deaminasa y (16) Xantina oxidasa.



### 2. MANIFESTACIONES DEL SLN

El SLN se caracteriza principalmente por hiperuricemia, alteraciones neurológicas y otros trastornos de tipo cognitivo y conductual.

El aumento del ácido úrico en sangre y en orina conduce al depósito de urato monosódico en las articulaciones (artritis gotosa) y en la piel (tofos) típicas de la enfermedad denominada gota. También pueden formarse cristales de ácido urico en los riñones que obstruyen las vías renales y pueden llegar a ocasionar fracaso renal agudo.

La manifestación neurológica más llamativa es la tendencia a la automutilación. Se registra en un 85% de los casos (Nyhan, 1976) y constituye a menudo un dato esencial para llegar a un diagnóstico concluyente (Christie *et al.*, 1982; Mizuno, 1986). Las manifestaciones neurológicas del SLN son las típicas de las lesiones que afectan a los ganglios basales (Ernst *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996) y parecen relacionarse con la gravedad del defecto enzimático (Fig.2).

A.



B.



Figura 2. Síndrome de Lesch-Nyhan. A.) Paciente afectado por el síndrome de Lesch-Nyhan en el que se pueden observar los movimientos involuntarios y la severa distonía que padece. B.) Pérdida tisular provocada por la autolesión en un paciente afectado por el síndrome de Lesch-Nyhan

La mayoría de los afectados presentan trastornos extrapiramidales, como distonía, atetosis y corea. En el segundo año de vida suelen aparecer signos piramidales: hiperreflexia osteotendinosa, clono, respuesta cutaneoplantar extensora e hipertonia de los músculos aductores de la cadera.

Aunque las características fundamentales de la deficiencia de HPRT son los síntomas relacionados con la hiperuricemia y las manifestaciones neurológicas, existen otras manifestaciones propias del SLN. La más frecuente es la anemia megaloblástica que se ha descrito en un gran número de pacientes, aunque no en todos. La causa de esta anemia no ha sido esclarecida ya que en muchos de los pacientes los niveles de vitamina B12 y de ácido fólico son normales y el suplemento con los mismos no es efectivo en la mayoría de ellos (Jinnah y Friedmann, 2001).

Estos pacientes también pueden padecer reflujo gastroesofágico y disfagia, por lo que vomitan con frecuencia y pueden sufrir retraso en el crecimiento y pubertad, muchos de ellos padecen atrofia testicular (Jinnah y Friedmann, 2001).

### 2.1 TRATAMIENTO DE LAS MANIFESTACIONES DEL SLN

El alopurinol inhibe la Xantina oxidasa, por lo que resulta especialmente eficaz en el tratamiento de la hiperuricemia y de la nefrolitiasis, aunque carece de efecto sobre las manifestaciones neurológicas y conductuales de la enfermedad.

La espasticidad se puede tratar con la administración de benzodiazepinas o baclofen.

El comportamiento automutilante puede prevenirse con una combinación de medidas físicas y psicológicas (Harris, 2010; Arhakis *et al.*, 2010).

Hasta ahora, no se ha encontrado ningún tratamiento eficaz para las manifestaciones neurológicas y conductuales de la enfermedad, por lo que el estudio de la relación entre el defecto enzimático y los síntomas neurológicos podría ser de gran ayuda para encontrar alguna opción terapéutica.

### 3. HIPÓTESIS SOBRE LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS DEL SLN

La hiperuricemia en los pacientes con deficiencia de HPRT se debe a varios mecanismos conocidos desde hace tiempo (Rosenbloom *et al.*, 1968): 1) La incapacidad de las células de los individuos con el SLN de transformar la hipoxantina intracelular en IMP conduce a la conversión de esta base en xantina y ésta es transformada en ácido úrico, ambas reacciones son catalizadas por la enzima Xantina oxidasa (Fig.1, 16). 2) El incremento de los niveles de PRPP intracelular, debido a que las células que carecen de actividad HPRT no lo consumen en la ruta de reciclaje de las purinas. El aumento de PRPP favorece la forma metabólicamente activa de la enzima Amido fosforribosiltransferasa (Fig. 1, 2). Esta enzima es la primera de la vía de síntesis *de novo* del metabolismo de purinas y la enzima limitante en la síntesis de las purinas. 3) Las células HPRT deficientes producen una menor cuantía de los inhibidores de la PRPP amidotransferasa IMP y GMP.

En la deficiencia de HPRT, la Amido fosforribosiltransferasa (Fig. 1, 2) es estabilizada por el PRPP y no es inhibida, por un mecanismo de retroalimentación, por los nucleótidos purínicos, lo que resulta en un incremento de la síntesis *de novo* de purinas.

La combinación del reciclaje deficiente de las purinas y el aumento de la síntesis *de novo* de las mismas explica la sobreproducción de ácido úrico en los individuos con deficiencia de HPRT.

Sin embargo, el mecanismo por el cual el metabolismo anómalo de las purinas causa las manifestaciones neurológicas y el comportamiento característico del SLN no ha sido claramente establecido. Los datos provenientes tanto de estudios *post mortem*, realizados en cerebros de pacientes con el SLN como los estudios de imagen no han revelado ninguna anomalía morfológica (Lloyd *et al.*, 1981). Estos hechos han suscitado la hipótesis de que estos pacientes podrían tener una alteración funcional.

Por otra parte, los datos clínicos sugieren que dicha alteración funcional se localizaría en los ganglios basales; los movimientos involuntarios y la distonía junto con los trastornos del comportamiento son síntomas de daño en esta región del cerebro (Ernst *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996).

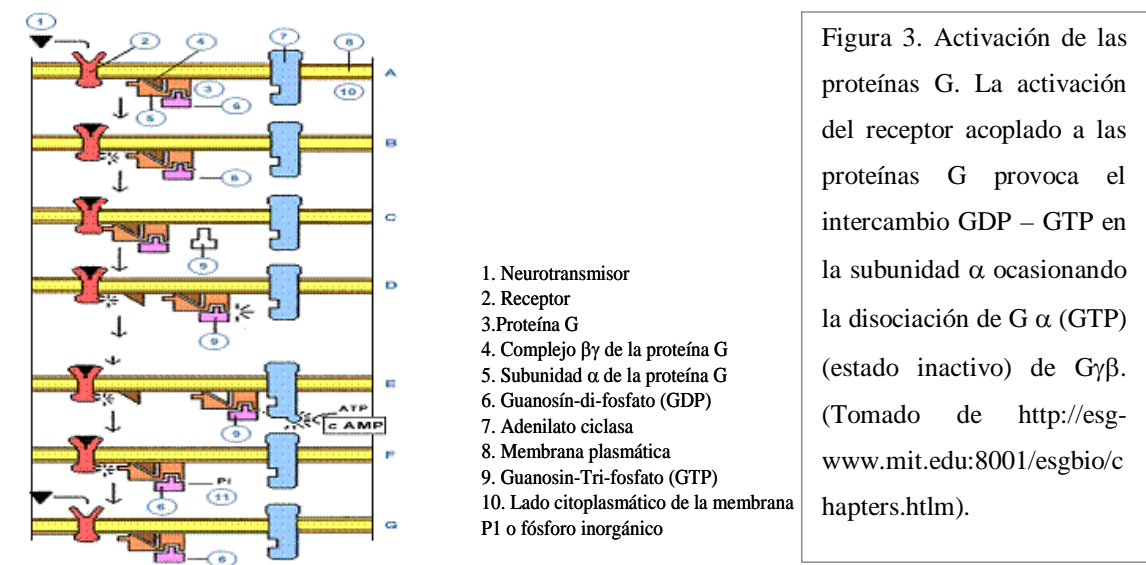
## INTRODUCCIÓN

A continuación revisamos las evidencias existentes acerca de la relación entre neurotransmisores y el SLN. Más concretamente, vamos a exponer la relación existente entre dopamina, adenosina y serotonina con la deficiencia de HPRT.

### 3.1 DOPAMINA Y SLN

La dopamina es el principal transmisor catecolaminérgico del sistema nervioso central (SNC). La mayor parte de las neuronas dopaminérgicas se localizan en una zona de los ganglios basales denominada sustancia negra. Está implicada en funciones de vital importancia tales como el control de la locomoción, de las emociones y de la cognición así como de la secreción neuroendocrina. Su deficiencia está relacionada con la enfermedad de Parkinson (Samii *et al.*, 2004; Weintraub *et al.*, 2008). Por el contrario, un exceso de dopamina se ha relacionado con la esquizofrenia (Weinberger *et al.*, 1992).

La acción de la dopamina en las células diana depende del tipo de receptor presente en éstas. Los receptores de dopamina pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G.



Las proteínas G son una familia de proteínas que tienen especial afinidad por los nucleótidos de guanina y desempeñan un papel muy importante en la transducción de señales de las células eucariotas. Están formadas por tres subunidades proteicas llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En su forma inactiva las tres subunidades se encuentran unidas (Fig.3), la subunidad  $\alpha$  se encuentra unida, a su vez, a GDP.

## INTRODUCCIÓN

Todos los receptores dopaminérgicos poseen 7 dominios transmembrana, de 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno, que están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas ( $i_1, i_2, i_3$ ) y extracelulares ( $e_1, e_2, e_3$ ). La región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado. En base a sus características moleculares y según el efecto de agonistas y antagonistas selectivos, se han descrito 5 subtipos, los cuales han sido, a su vez, agrupados en 2 familias farmacológicas, según el tipo de proteína G al que están acoplados, denominadas  $D_1$  y  $D_2$ , (Kebabian y Calne, 1979) (Fig.4).

Es sabido, que existen dos tipos de proteínas G: las proteínas G estimuladoras ( $G_s$  y  $G_q$ ) y las proteínas G inhibitorias ( $G_i$ ). Las proteínas  $G_s$  (stimulatory G protein), unidas a GTP, activan a la Adenilato ciclasa (AC) aumentando la cantidad de AMPc en el interior de la célula. Las proteínas  $G_q$ , unidas a GTP, activan a la Fosfolipasa C, aumentando la cantidad de diacilglicerol inositol trifosfato y  $Ca^{2+}$  intracelular. Por último, las proteínas  $G_i$  (inhibitory G protein), unidas a GTP, inactivan a la AC, disminuyendo indirectamente la cantidad de AMPc intracelular.

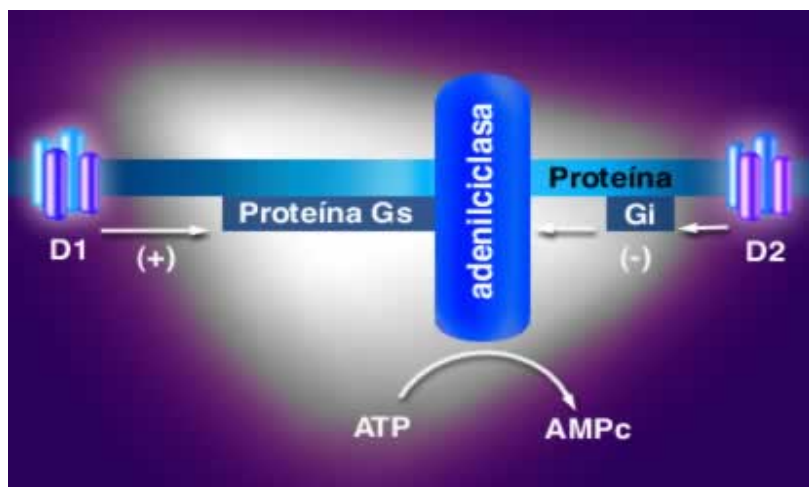


Figura 4. Efecto de los receptores de tipo  $D_1$  y  $D_2$  sobre la Adenilato ciclasa. (Tomado de <http://www.psicofarmacos.info>).

Así, en la subfamilia de receptores  $D_1$ , que está formada por los subtipos  $DRD_1$  y  $DRD_5$ , la unión del agonista al receptor estimula a la AC y la formación de AMP cíclico (Fig.4). Mientras que, en la subfamilia de receptores  $D_2$ , formada por los subtipos  $DRD_2$ ,  $DRD_3$ , y

## INTRODUCCIÓN

DRD<sub>4</sub>, la unión del agonista al receptor inhibe a la AC. (Sibley y Monsma, 1992; Gingrich y Caron, 1993; Seeman y Van Tol, 1994) (Tabla 1).

Tras su unión al receptor, la eliminación de dopamina del espacio extracelular y su recaptación por las neuronas dopaminérgicas constituye un importante mecanismo de control de la neurotransmisión dopaminérgica.

Esta recaptación se produce de manera activa y la lleva a cabo el transportador de dopamina (DAT).

Subtipo	FAMILIA D <sub>1</sub>		FAMILIA D <sub>2</sub>		
	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Secuencia codificada	446 aa	477 aa	D <sub>2a</sub> 443 aa D <sub>2b</sub> 444 aa	400 aa	387 aa
Intrones	No	No	Si	Si	Si
Localización cromosomal	5q 35.1	4p 15.1-16.1	11q 22-23	3q 13.3	11p 15.5
Tamaño del ARNm	3.8 Kb	3 Kb	2.5 Kb	8.3 Kb	5.3 Kb
Regiones de alta densidad	Neostriado	Hipotálamo Hipocampo	Neostriado	Paleostriado	Corteza frontal
Autorreceptor	No	?	No	Si	?
Efecto en la adenilil ciclasa	Estimulación	Estimulación	Inhibición	Inhibición?	Inhibición?
Efector	Gas	Gas	Gai/o	Gai/o	Gai/o

Tabla 1. Características de los receptores dopaminérgicos. aa, aminoácidos; Gas, proteína G estimuladora; Gai, proteína G inhibidora; Gao, proteína G tipo O; Kb, Kilobases. (Modificado de Bahena-Trujillo R, Flores G y Arias –Montaño JA. 2000. *Rev Biomed*, 11, 39-60.

## INTRODUCCIÓN

El transportador de dopamina pertenece a la familia de proteínas transportadoras que dependen de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Tiene doce dominios transmembrana y presenta varios sitios de fosforilación (Fig. 5). Esta familia incluye también a los transportadores de ácido gamma-aminobutírico (GABA), noradrenalina, serotonina, taurina, glicina, betaína y prolina.

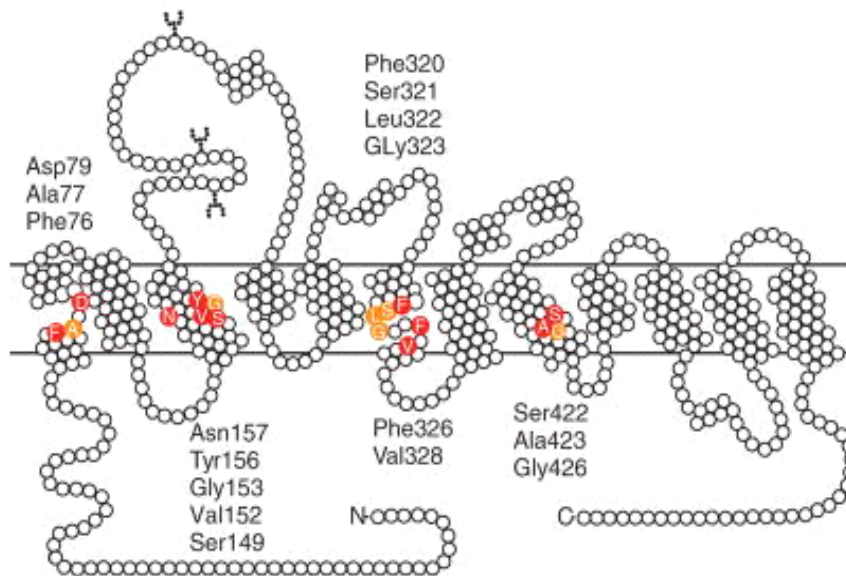


Figura 5. Representación esquemática bidimensional del transportador de dopamina humano (DAT). Los círculos coloreados indican residuos que interactúan con la dopamina o el feniltropano análogo de la cocaína CFT en los modelos moleculares. (Modificado de Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, Newman AH, Javitch JA, Weinstein H, Gether U y Loland CJ. 2008. *Nat Neurosci*, 11, 780-89.

El papel vital del transportador de dopamina DAT en la neurotransmisión dopaminérgica fue demostrado en ratones portadores de deleciones en este gen (Giros *et al.*, 1996; Gainetdinov *et al.*, 1999). Estos ratones mostraban niveles extracelulares de dopamina por encima de los normales y presentaban hiperactividad y cambios en el comportamiento. Por tanto, un defecto de la recaptación de la dopamina se ha asociado, en ratones, a cambios en su comportamiento (hiperactividad).

### ESTUDIOS REALIZADOS EN HUMANOS

En 1981, Lloyd y colaboradores realizaron un análisis *post mortem* del cerebro de tres pacientes con SLN (Lloyd *et al.*, 1981). Estos autores determinaron los niveles de dopamina, ácido homovanílico y dopa decarboxilasa en los ganglios basales. En comparación con cerebros normales, el sistema dopaminérgico de los pacientes con SLN

## INTRODUCCIÓN

---

mostró una reducción notable en el núcleo caudado (disminución media, 33%), en el putamen (11%) y en la sustancia negra (71%).

Este trabajo constituye el primer indicio de la implicación del sistema dopaminérgico en el SLN. La ausencia de lesiones anatomopatológicas evidentes motivó la hipótesis de que la lesión sería más funcional que estructural.

Con posterioridad, los estudios de neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con SLN evidenciaron niveles descendidos de ácido homovanílico (metabolito de la dopamina), junto a un incremento en las concentraciones de hipoxantina y de xantina (Silverstein *et al.*, 1985; Jankovic *et al.*, 1988). Otro dato acerca de la implicación del sistema dopaminérgico en el SLN fue la mejoría que se apreció en la automutilación de uno de los dos pacientes tratados con un antagonista de los receptores de la dopamina (Goldstein *et al.*, 1985), aunque este hallazgo no fue reproducido en otros pacientes. Estos hechos constituyen las primeras evidencias de un déficit de dopamina en pacientes con SLN.

Estudios realizados *in vivo* mediante tomografía por emisión de positrones (PET), en la que se usaron ligandos que se unían a proteínas asociadas con dopamina en el cerebro, confirmaron alteraciones en el sistema dopaminérgico de los pacientes con el SLN (Ernst *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996).

En 1999, en un estudio *post mortem* en dos pacientes con el SLN (Saito *et al.*, 1999), se confirmaron niveles de dopamina disminuídos en el núcleo caudado. Además, mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas, los autores de este trabajo, detectaron un aumento de los receptores de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el putamen y una disminución de los mismos en el núcleo caudado, ambas significativas.

### MODELOS ANIMALES

Ante las dificultades que plantea el estudio del cerebro humano, se ha considerado muy importante disponer de un modelo animal que permitiera estudiar la fisiopatología del trastorno neurológico y que, a su vez, reprodujera los síntomas característicos del SLN, entre ellos la automutilación. Para ello, se han desarrollado modelos animales con fármacos y mediante manipulación genética sin que ninguno de ellos resultara totalmente satisfactorio.



Sin embargo, de estos estudios podemos concluir que la dopamina está implicada en la conducta automutilante del SLN así como la asociación de la deficiencia del contenido cerebral de dopamina con el defecto enzimático.

### *Modelos animales farmacológicos*

Uno de los modelos más aproximados al SLN clásico se obtiene en ratas a las que se origina una lesión del sistema dopaminérgico en el período neonatal, bien quirúrgicamente o administrando intracisternalmente el neurotóxico 6-hidroxidopamina (Breese *et al.*, 1990). En condiciones basales, las ratas muestran trastornos del comportamiento (agresividad) y una deficiencia del control motor fino. Pero tras la administración de un agonista del receptor de la dopamina aparece un comportamiento automutilante. Este comportamiento parece depender de una hipersensibilidad del receptor de dopamina subclase D<sub>1</sub>.

En primates, tras la lesión unilateral del sistema dopaminérgico, y administración de agonistas del receptor de dopamina, se produce una estimulación de receptores D<sub>1</sub> hipersensibles y aparece un comportamiento automutilante (Goldstein *et al.*, 1986).

### *Manipulación genética*

En 1987 se consiguieron los primeros ratones transgénicos Hprt deficientes (Hprt<sup>-</sup>) por dos métodos distintos: selección de células embrionarias totipotenciales sin actividad HPRT y mediante inserción con un vector retroviral con una mutación sin sentido en el gen Hprt para que resultase inactivado (Hooper *et al.*, 1987; Kuehn *et al.*, 1987).

Ambos tipos de ratones transgénicos carecen de actividad enzimática HPRT en los tejidos examinados pero no presentan ningún trastorno neurológico evidente. Entre las hipótesis postuladas para explicar este hecho se ha mencionado que los ratones tienen una respuesta fisiológica diferente a los humanos: los ratones son más dependientes de la actividad de la enzima APRT para la reutilización de las purinas que de la enzima HPRT. A favor de esta hipótesis se obtuvo un modelo animal del SLN mediante la administración de 9-etiladenina (inhibidor de APRT) a ratones transgénicos Hprt<sup>-</sup> en los que aparecía un comportamiento automutilante con tendencia a morderse (Wu y Melton, 1993).

Tres años más tarde, en 1996, Engle y colaboradores, en un intento por confirmar la hipótesis anterior, generaron un ratón doble mutante para Hprt y Aprt en el que no detectaron comportamientos automutilantes ni otras anormalidades más allá de la excreción de adenina y de su derivado, 2,8-dihidroxiadenina, muy insoluble, asociadas ambas a la deficiencia de APRT en humanos (Engle *et al.*, 1996). Por tanto, estos autores descartan al ratón doble mutante Hprt<sup>-</sup> - Aprt<sup>-</sup> como modelo para el estudio del SLN, ya que no muestra un fenotipo nuevo con respecto a los anteriores y tampoco presenta las manifestaciones neurológicas características del SLN.

Diversos estudios realizados en ratones Hprt<sup>-</sup> han mostrado unos niveles de dopamina reducidos y una actividad de la enzima tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de dopamina, también reducida en el núcleo caudado y en el *putamen* (Finger *et al.*, 1988; Jinnah *et al.*, 1994). Sin embargo, los niveles del neurotransmisor y de la enzima estaban dentro de los niveles normales en el resto del cerebro.

### 3.1.1 HIPÓTESIS CONEXIÓN PURINA – DOPAMINA

La causa por la cual la deficiencia de HPRT ocasiona una alteración en el sistema dopaminérgico es desconocida. Hasta el momento, se han propuesto varias hipótesis para aclarar esta relación, aunque ninguna de ellas haya sido confirmada.

#### 3.1.1.1 Distribución diferencial de la enzima HPRT en el cerebro

La vulnerabilidad selectiva de los ganglios basales en el SLN se atribuyó, en un principio, a una mayor expresión del gen HPRT1 en esta región cerebral y a una escasa síntesis *de novo* de purinas. Se pensó que la enzima HPRT jugaría un papel particularmente importante en el metabolismo de las purinas en los ganglios basales y, este hecho, explicaría la vulnerabilidad selectiva de esta zona a la deficiencia de HPRT (Kelley *et al.*, 1969). Estudios posteriores han demostrado que la actividad HPRT no está particularmente incrementada en esta zona del cerebro. Se han demostrado actividades enzimáticas de HPRT intermedias, en comparación con otros tejidos, (Boyle *et al.*, 1970), que sufren importantes variaciones en el desarrollo y varían entre niños y adultos (Jinnah y Friedman., 2001).

Estos resultados indican que las presumibles diferencias en la expresión tisular del gen HPRT1 no son suficientes para explicar la disfunción selectiva que se produce en los

ganglios basales de los pacientes con el SLN. No obstante, una vulnerabilidad selectiva de los ganglios basales no requeriría una expresión preferencial de HPRT1 en esta región. Muchos trastornos neurológicos, como la enfermedad de Huntington, muestran vulnerabilidad selectiva de grupos celulares en los que no hay una expresión diferencial del gen asociado (Mitchell *et al.*, 1999).

3.1.1.2 Estrés oxidativo

Se ha propuesto que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson podría deberse a una excesiva producción de radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Fahn y Cohen, 1992). En este sentido, los mecanismos patogénicos de la enfermedad de Parkinson podrían ser aplicables a la deficiencia de HPRT, ya que ambos están asociados a una disfunción de los ganglios basales (Fig. 6). Por otra parte, en un estudio previo realizado en 5 pacientes con el SLN las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa en eritrocito y superóxido dismutasa en plasma se encontraron aumentadas sugiriendo que estos pacientes estarían expuestos a una mayor carga oxidativa que los individuos control (Saugstad y Marklund, 1988).

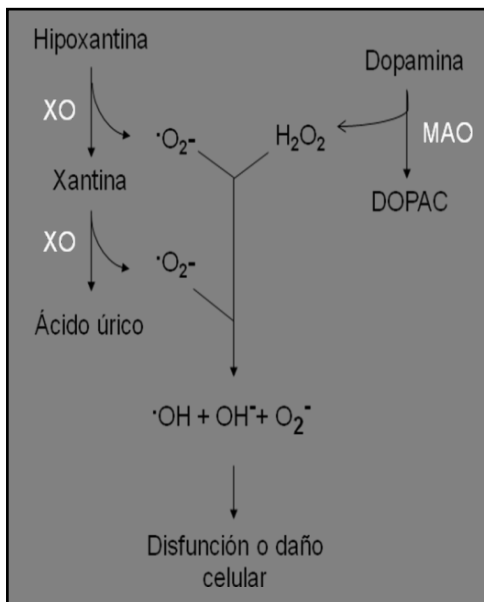


Figura. 6. Hipótesis del estrés oxidante para el SLN. Tanto el metabolismo de las purinas como el de la dopamina producen especies reactivas del oxígeno que pueden interaccionar y producir daño o disfunción celular. Abreviaciones: DOPAC, ácido dihidroxifenilacético; MAO, Monoaminoxidasa; XO, Xantina oxidasa.

En base a estos hallazgos, se han publicado estudios para confirmar esta hipótesis en ratones *Hprt*<sup>-/-</sup>. Para ello se compararon marcadores de daño celular por estrés oxidativo, cambios en los sistemas de detoxificación de radicales, la sensibilidad de los sistemas dopaminérgicos a la neurotoxina 6-hidroxdopamina y la respuesta de estos sistemas a la

sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa 1 (Visser *et al.*, 2002). Estos autores demostraron que aunque algunos marcadores de estrés oxidativo están alterados en los ratones *Hprt*<sup>-</sup> (niveles elevados de peróxidos lipídicos y de glutatión oxidado), otros marcadores no se modificaron significativamente (superóxido dismutasa, catalasa y contenido en proteína carbonilo o proteína tiol). Además, el daño celular no se evitó al sobreexpresar la enzima superóxido dismutasa. Finalmente, a la luz de todos los datos, estos autores concluyen que, en su opinión, el estrés oxidativo no sería el responsable de la deficiencia dopaminérgica.

### *3.1.1.3 Neurogénesis alterada.*

Estudios recientes han permitido formular la hipótesis de que la deficiencia de HPRT1 podría causar alteraciones en la transcripción de otros genes vitales para el desarrollo y función de las vías dopaminérgicas. Así, Song y Friedmann, en el año 2007, publicaron evidencias de que la deficiencia de HPRT1 conduce a defectos transcripcionales en varios genes tanto en estríado de ratones *knockout* para el gen *Hprt* como en fibroblastos humanos HPRT1<sup>-</sup>. Estos autores fueron los primeros que asociaron el desarrollo aberrante de las neuronas dopaminérgicas con la deficiencia de HPRT1 (Song y Friedmann, 2007). En esta misma línea, Ceballos-Picot y colaboradores, en el año 2009, demostraron, mediante técnicas de microarrays y “PCR a Tiempo Real” aplicadas a 10 sublíneas de células HPRT1<sup>-</sup> derivadas de la línea celular MN9D, un incremento en el ARN mensajero (ARNm) de los factores de transcripción *engrailed 1* y *2*. Estos factores de transcripción tienen un papel importante en la especialización y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Los incrementos en el ARNm estaban acompañados por incrementos en la proteína *engrailed*, y al recuperar la expresión de HPRT1, se revertían los niveles normales del factor de transcripción, por lo que según los autores, se demostraba una relación funcional entre HPRT1 y *engrailed*.

Esto mismo lo observaron en fibroblastos de pacientes con el SLN correlacionándose la sobreexpresión con la gravedad de los síntomas de cada paciente. Estos estudios permitieron concluir que la deficiencia de HPRT podría afectar a las neuronas dopaminérgicas, alterando mecanismos implicados en el desarrollo temprano de las mismas (Ceballos-Picot *et al.*, 2009).

Guibinga y colaboradores, a principios del año 2010, examinaron el efecto de la deficiencia de HPRT en la diferenciación neuronal, usando para ello células de carcinoma embrionario NT2, modelo de diferenciación neuronal ya establecido para el estudio de los eventos moleculares que tienen lugar durante la neurogénesis. Estudiaron la expresión de factores de transcripción esenciales para la diferenciación neuronal y marcadores genéticos relacionados con la ruta de síntesis dopaminérgica en células NT2 HPRT1<sup>-</sup>. Observaron, mediante PCR cuantitativa, una expresión aberrante de varios factores de transcripción y marcadores genéticos.

Además, demostraron que estas alteraciones en la expresión de genes que codifican para factores de transcripción en las células HPRT1<sup>-</sup> están asociadas con la formación de células neuronales con una morfología y funcionalidad alteradas. En base a estos hallazgos propusieron que los genes de expresión constitutiva, como lo es HPRT1, podrían tener un papel vital en algunas rutas del desarrollo, incluida la neurogénesis además de las funciones metabólicas ya conocidas (Guibinga *et al.*, 2010). A mediados de este mismo año, Cristini y colaboradores, publicaron, un trabajo en el que examinaron la expresión de varios factores de transcripción esenciales para la diferenciación neuronal así como genes envueltos en la ruta dopaminérgica de neuronas humanas pluripotenciales (hNSCs) aisladas de cerebros de fetos con el SLN. Estos autores demostraron que varios factores de transcripción y marcadores dopaminérgicos presentaban una expresión alterada en las células de los pacientes en comparación con los fetos control (Cristini *et al.*, 2010).

### 3.2 SEROTONINA Y SLN

Los ganglios basales poseen una innervación densa de neuronas serotoninérgicas. Este hecho sugiere que este neurotransmisor está implicado, junto con la dopamina, en las funciones de esta región del cerebro.

La serotonina (indolalquilamina 5-hidroxitriptamina) es una monoamina neurotransmisora (Fig. 7). La combinación del grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amina nitrogenada primaria actuando como aceptor de un protón a pH fisiológico, hace de la serotonina una sustancia hidrofílica que no traspasa la barrera hematoencefálica fácilmente.

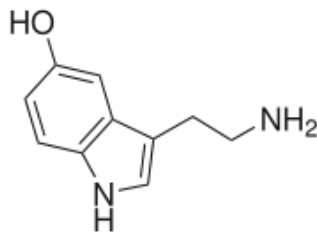


Figura 7. Estructura química del neurotransmisor serotonina (5-HT).

Más del 90% de la serotonina se localiza fuera del cerebro donde ejerce importantes funciones. Entre las funciones fisiológicas de la serotonina destaca la inhibición de la secreción gástrica, la estimulación de la musculatura lisa y la secreción de hormonas por parte de la hipófisis. Además, la serotonina juega un papel importante en la proliferación linfocitaria dependiendo del receptor estimulado (5-HT<sub>1A</sub> vs. 5-HT<sub>7</sub>). En el SNC, la serotonina posee especial relevancia. Está implicada en la inhibición del enfado, la inhibición de la agresión, la temperatura corporal, el humor, el sueño, el vómito, la sexualidad y el apetito (Sodhi y Sanders-Bush, 2004). Estas inhibiciones están relacionadas directamente con síntomas de depresión. La función serotoninérgica es fundamentalmente inhibitoria, (Daw *et al.*, 2002; Yan, 2002) y cambios en el nivel de esta sustancia se asocian a desequilibrios mentales como la esquizofrenia o el autismo infantil (Cook *et al.*, 1994). También juega un papel importante en el trastorno obsesivo compulsivo (Coccaro., 1989).

La serotonina ejerce su acción en la sinapsis mediante la unión a sus receptores específicos. En los mamíferos, se han descrito siete familias de receptores serotoninérgicos denominadas 5-HT<sub>1-7</sub>, y compuestas por un total de catorce subtipos de receptores estructural y farmacológicamente diferentes (Hoyer *et al.*, 1994). Molecularmente, se ha establecido, mediante el uso de modelos recombinantes y análisis de hidrofobicidad de las proteínas de membrana (perfiles hidropáticos), que los receptores serotoninérgicos son receptores acoplados a proteínas G excepto el receptor 5-HT<sub>3</sub>, que es un canal iónico. La función de la mayor parte de estos receptores en el cerebro está asociada a respuestas fisiológicas específicas, como la regulación de la actividad neuronal, la liberación de neurotransmisores o cambios en el comportamiento (Tabla 2).

## INTRODUCCIÓN

RECEPTOR	POTENCIAL	TIPO	MECANISMO DE ACCION	EFECTO Y FUNCIÓN
5-HT <sub>1A</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>f</sub> /G <sub>0</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc	Agresividad, ansiedad, adicción, apetito, impulsividad, sociabilidad, nocicepción, comportamiento sexual.
5-HT <sub>1B</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>f</sub> /G <sub>0</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc	Agresividad, ansiedad, aprendizaje, adicción, locomoción, memoria, comportamiento sexual.
5-HT <sub>1D</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>f</sub> /G <sub>0</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc	Locomoción, ansiedad.
5-HT <sub>1E</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>f</sub> /G <sub>0</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc	Memoria
5-HT <sub>1F</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>f</sub> /G <sub>0</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc	Locomoción? Ansiedad?
5-HT <sub>2A</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>q11</sub>	Incremento de la concentración intracelular de IP3 y DAG	Ansiedad, apetito, adicción, cognición, imaginación, aprendizaje, memoria, percepción
5-HT <sub>2B</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>q11</sub>	Incremento de la concentración intracelular de IP3 y DAG	Ansiedad, apetito, sueño
5-HT <sub>2C</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>q11</sub>	Incremento de la concentración intracelular de IP3 y DAG	Ansiedad, apetito, adicción, locomoción, comportamiento sexual
5-HT <sub>3</sub>	Excitatorio	Ligado a canal Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Despolarización de la membrana celular	Ansiedad, adicción, aprendizaje, memoria, excitación neuronal
5-HT <sub>4</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>s</sub>	Incremento de la concentración intracelular de AMPc	Ansiedad, apetito, aprendizaje, memoria, respiración
5-HT <sub>5</sub>	Inhibitorio	Acoplado a proteína G <sub>f</sub> /G <sub>0</sub>	Disminución de la concentración intracelular de AMPc	Locomoción, sueño
5-HT <sub>6</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>s</sub>	Incremento de la concentración intracelular de AMPc	Ansiedad, cognición, aprendizaje, memoria.
5-HT <sub>7</sub>	Excitatorio	Acoplado a proteína G <sub>s</sub>	Incremento de la concentración intracelular de AMPc	Ansiedad, memoria, respiración, sueño, termoregulación

Tabla 2. Familias y subfamilias de receptores serotoninérgicos. DAG: Diacilglicerol; IP3: Inositol trifosfato. Fuente: Nichols DE y Nichols CD. 2008. *Chem Rev*, 108, 1614-4.

## INTRODUCCIÓN

Tras su unión al receptor, la actividad de la serotonina en la sinapsis se termina, primariamente, por su recogida en terminales serotoninérgicos (Fig. 8) mediante su unión a proteínas específicas de transporte.

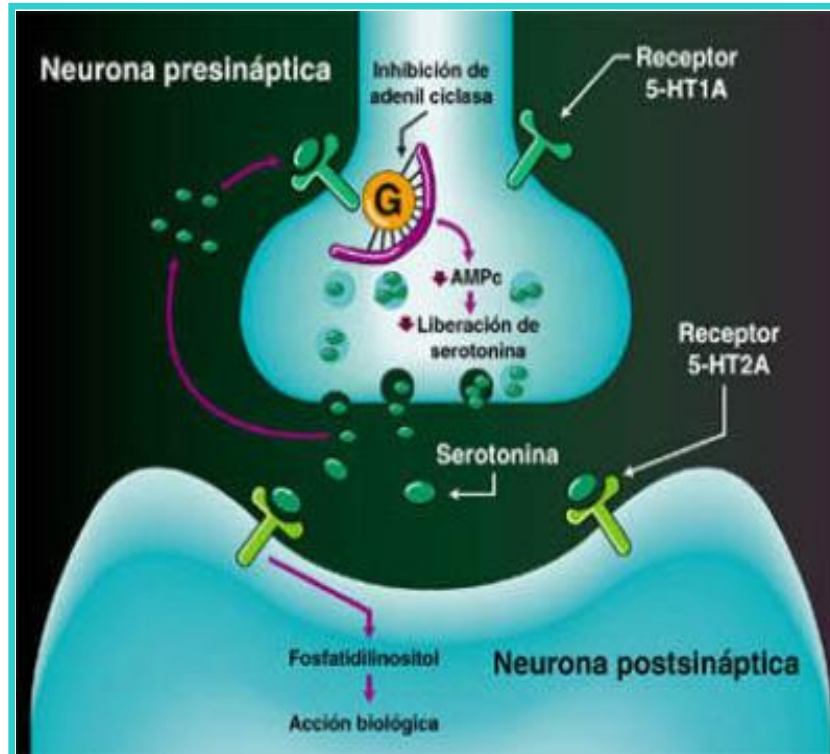


Figura 8. Neurotransmisión serotoninérgica. La serotonina (5-HT) se sintetiza a partir del triptófano, el cual se convierte en 5 - hidroxitriptófano por la enzima Triptófano-hidroxilasa. La 5-HT puede almacenarse en vesículas y/o liberarse. Una vez liberada, puede ocupar receptores postsinápticos, recaptarse, ocupar autorreceptores o metabolizarse por la enzima Mono amino oxidasa mitocondrial hacia ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA). (Tomado de <http://www.psicomag.com/neurobiologia>).

Las primeras investigaciones acerca de la fisiopatología de las manifestaciones neurológicas del SLN se centraron en la serotonina. Esto se debió a que se había observado un comportamiento agresivo en animales con una concentración de serotonina en el cerebro significativamente más baja de lo normal, y, además, la administración de 5-hidroxitriptófano, precursor inmediato de la serotonina, disminuía el comportamiento agresivo (Di Chiara *et al.*, 1971). En 1977, se observó que en los pacientes con el SLN la excreción de ácido 5-hidroxi-indolacético (metabolito de la serotonina) en orina estaba significativamente incrementada (Sweetman *et al.*, 1977), lo que, podría significar que los niveles de serotonina en el cerebro eran bajos. Sin embargo, desde esa primera



observación, se han descrito en líquido cefalorraquídeo niveles de actividad serotoninérgica y de ácido 5-hidroxi-indolacético elevados (Jankovik *et al.*, 1988), disminuidos (Castells *et al.*, 1979) y normales (Silverstein *et al.*, 1985) sin que, hasta el momento, podamos explicar las discrepancias encontradas. Lo mismo sucede con la concentración de serotonina medida en el estríado de pacientes con el SLN: hay estudios que indican una menor concentración (Saito *et al.*, 1999) mientras que otros autores han descrito concentraciones elevadas (Lloyd *et al.*, 1981).

Algunos autores argumentan que estos resultados tan diferentes podrían indicar que los cambios en el sistema serotoninérgico de los pacientes con el SLN serían secundarios al desequilibrio en la ruta dopaminérgica (Kostrzewa *et al.*, 1998; Ferré *et al.*, 1994) que incrementaría el reciclaje de serotonina. Así, lesiones neonatales en el sistema dopaminérgico de animales se caracterizan por un aumento de la actividad serotoninérgica en el estríado por una hiperinervación de los núcleos de Raphé (Luthman, 1989).

### 3.3 ADENOSINA Y SLN

La adenosina es un nucleósido formado de la unión de la adenina con un anillo de ribosa (también conocido como ribofuranosa) mediante un enlace glucosídico  $\beta$ -N-glucosídico (Fig. 9). Es una purina endógena sintetizada a partir de la degradación de aminoácidos como metionina, treonina, valina e isoleucina, así como de AMP.

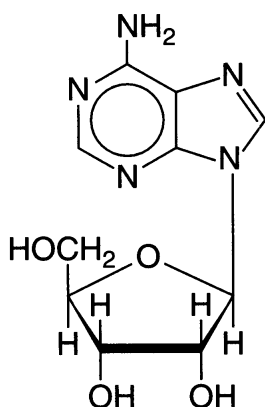


Figura 9. Estructura química de la adenosina

## INTRODUCCIÓN

---

La adenosina y sus derivados son constituyentes esenciales de toda célula viva ya que tienen un papel clave en la formación de moléculas biológicas como los nucleótidos de ATP, y AMPc, cofactores como el dinucleótido de nicotinamida-adenina ( $\text{NAD}^+$ ) y los ácidos nucleicos.

En el metabolismo celular, además de actuar como intermediarios de rutas metabólicas, también forman parte de cofactores necesarios para diversas reacciones enzimáticas tales como la oxidación-reducción (deshidrogenadas dependientes de  $\text{NAD}^+$ , dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato y flavín adenín dinucleótido) o las reacciones de metilación, en las que participan como dadores de grupos metilo (S-adenosilmetionina o SAM) (Arch y Newsholme, 1978). Además, el nucleótido ATP es la principal reserva energética de la célula. El AMPc y en menor medida el guanosín monofosfato cíclico, actúan como segundos mensajeros en diversas rutas bioquímicas de transmisión intracelular de señales (Pull y McIlwain, 1972) así como en el almacenaje y transmisión de la información genética, desempeñando también un papel clave en la síntesis proteica. Estos hechos, probablemente, retrasaron el reconocimiento de otras funciones de las purinas como sustancias autocrinas, paracrinas y neurotransmisoras.

Hoy día, se reconoce que las purinas son liberadas por las neuronas y por otras células y producen amplios efectos en múltiples sistemas orgánicos por su unión a receptores purinérgicos en la superficie de las células. Por tanto, actúa como un mensajero metabólico que imparte información sobre el metabolismo intracelular de una célula particular a receptores en la superficie de la misma célula y adyacentes.

Los nucleótidos y nucleósidos purínicos, ATP, ADP, polifosfatos de diadenosina ( $\text{Ap}_n\text{A}$ ) y adenosina actúan como neuromoduladores intra- y extracelularmente a través de receptores específicos de membrana, mediante los cuales participan en un gran número de procesos fisiológicos y patofisiológicos (Burnstock, 2009). Estos receptores son los receptores purinérgicos y se clasifican en receptores P1 (receptores de adenosina) y receptores P2 (receptores de nucleótidos o de ATP) (Fredholm *et al.*, 1994).

Los receptores P1 se unen preferentemente a la adenosina y modulan la actividad de la AC, mientras los receptores P2 son más selectivos de ATP y modulan la actividad de la Fosfolipasa C y la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se conocen cuatro tipos de receptores P1 ( $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_{2\text{A}}$ ,  $\text{A}_{2\text{B}}$  y  $\text{A}_3$ ) y catorce de tipo P2 (Fredholm *et al.*, 1997).

## INTRODUCCIÓN

Los receptores de adenosina o P1 pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y pueden activar distintos sistemas efectores (Tabla 3). Son polipéptidos de 36 a 45 kDa con el extremo N-terminal extracelular, el extremo C-terminal intracelular y siete segmentos transmembrana ( $\alpha$ - hélices de 21 a 28 amino ácidos) que dan lugar a tres bucles hidrofílicos extracelulares y tres citoplasmáticas. La unión del ligando al receptor tiene lugar a través de una cavidad en las zonas de los segmentos transmembrana, en el dominio extracelular. Hasta ahora se han caracterizado cuatro tipos de receptores de adenosina (Tabla 3). Los receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>3</sub> pueden activarse con concentraciones fisiológicas de adenosina mientras que la activación del receptor A<sub>2B</sub> requiere concentraciones de adenosina en límites patológicos (Fredholm *et al.*, 2001).

Tras su unión al receptor, la adenosina extracelular es rápidamente eliminada, en parte por recaptura al interior de la célula y, en parte, por su degradación a inosina.

Nomenclatura	Proteína G acoplada	Agonistas	Antagonistas	Factores acoplados
A1	G <sub>i/o</sub>	R-PIA =CPA>NECA>>CGS	DPCPX>XAC>>ZM	↓AMPc ↑Ca <sup>2+</sup> ↑K <sup>+</sup> ↓IP3
A2A	G <sub>s</sub>	NECA>CGS>>R-PIA=CPA	ZM>>XAC>>DPCPX	↑AMPc
A2B	G <sub>s</sub> /G <sub>q</sub>	NECA>R-PIA=CPA>CGS	ZM>DPCPX>>XAC	↑AMPc ↑IP3 ↑Ca <sup>2+</sup>
A3	G <sub>i</sub> /G <sub>q</sub>	NECA>R-PIA>>CPA>>CGS	XAC>>DPCPX>ZM	↓AMPc ↑IP3

Tabla 3. Receptores P1 de adenosina.

Los receptores de adenosina están implicados en procesos fisiológicos: regulación del sueño, (Landolt, 2008) y la cognición (Takahashi *et al.*, 2008) y en patologías de origen cerebral como Alzheimer (Fredholm *et al.*, 2005), Parkinson (Schwarzschild *et al.*, 2006), Corea de Huntington (Popoli *et al.*, 2007), epilepsia (Fedele *et al.*, 2006), depresión (Cunha *et al.*, 2008) y esquizofrenia (Lara *et al.*, 2006).

Diversos estudios implican a la adenosina en la modulación de la conducta, más en concreto en la regulación del comportamiento agresivo. Ferrer y colaboradores, en 1982, describieron un comportamiento automutilante en ratas tras la administración crónica de cafeína, antagonista de la adenosina, similar al descrito en los pacientes con el SLN (Ferrer *et al.*, 1982). Ledent y colaboradores describieron que la agresividad desencadenada por la adenosina podría deberse a su acción sobre los receptores de adenosina tipo A<sub>2A</sub> (Ledent *et al.*, 1997).

Por otro lado, el comportamiento agresivo observado en ratones tras la administración de dosis elevadas de clonidina se ha relacionado con el bloqueo de los receptores de adenosina, ya que dicho comportamiento se puede inhibir con la administración conjunta de agonistas de adenosina y potenciar con otros antagonistas de la adenosina (Ushijima *et al.*, 1984).

Respecto a su relación con el SLN, en 1988, en el modelo animal farmacológico de ratas lesionadas con 6-hidroxi-dopamina, se demostró, por primera vez, la hipersensibilidad del comportamiento locomotor de estos animales a los agonistas de la adenosina y la influencia pre y postsináptica de la adenosina sobre la dopamina en este modelo (Criswell 1988). Desde entonces, distintos trabajos apoyan la relación entre la adenosina y las manifestaciones del SLN (Navarro *et al.*, 2000; Richter y Hamann, 2001; Hauser y Schwarzschild, 2005).

### 3.4 TOXICIDAD METABÓLICA

La deficiencia de HPRT, como sucede en muchos defectos enzimáticos, se acompaña de un aumento de ciertos metabolitos que, a determinadas concentraciones, pueden resultar tóxicos.

Así, se han propuesto varias hipótesis para explicar la posible conexión entre la deficiencia de HPRT y las manifestaciones neurológicas: algunos metabolitos se acumulan en la deficiencia de HPRT y pueden resultar deletéreos para los pacientes con el SLN.

#### 3.4.1 ÁCIDO ÚRICO

El marcado incremento de la producción y excreción de ácido úrico en el SLN han suscitado la hipótesis de que este metabolito podría tener efectos tóxicos en el desarrollo del sistema nervioso. De hecho, se ha propuesto que los ratones Hprt<sup>-</sup> no manifiestan

síntomas neurológicos porque la enzima Uricasa evita los elevados niveles de ácido úrico (Wu *et al.*, 1994). Sin embargo, son numerosas las evidencias que descartan al ácido úrico como responsable de las manifestaciones neurológicas en el SLN. La primera de ellas es que hay pocas evidencias de que el cerebro de los pacientes con el SLN esté expuesto a elevadas concentraciones de ácido úrico (Edwards *et al.*, 1986) debido a la escasa actividad de la enzima Xantina oxidasa en el cerebro (Al-Khalidi y Chaglassian., 1965).

Por otro lado, la sobreproducción de ácido úrico que se produce en otras enfermedades metabólicas, como la deficiencia parcial de HPRT o la sobreactividad de la Fosforribosilpirofosfato sintetasa, no se acompaña de las alteraciones neurológicas características del SLN.

Además, el uso de alopurinol para reducir los niveles de ácido úrico desde el nacimiento de los pacientes con SLN no disminuye o retarda la aparición de las manifestaciones neurológicas (Jinnah y Friedmann., 2001). Por último, mutaciones en el gen de la Uricasa en ratones  $Hprt^{-}$  causan hiperuricemia patológica pero no alteraciones neurológicas (Wu *et al.*, 1994).

### 3.4.2 HIPOXANTINA Y XANTINA

La deficiencia de HPRT se acompaña de un aumento muy importante de los sustratos de la enzima, hipoxantina y xantina. Ambos metabolitos están muy elevados en plasma, orina y LCR de pacientes con SLN (Puig *et al.*, 2001).

En las neuronas, la actividad Xantina oxidasa es prácticamente indetectable mientras que la actividad enzimática guanasa esta muy elevada. Esto hace que en estas células el producto final del metabolismo de los nucleótidos de adenina sea la hipoxantina, y el metabolito final de la guanina sea la xantina.

Estudios realizados en cultivos de células de neuroma de rata  $Hprt1^{-}$  y en cultivos primarios de astroglia de ratones transgénicos  $Hprt^{-}$ , muestran que el defecto metabólico más llamativo es una excreción 15 veces mayor de hipoxantina que las de las células control (que excretan muy poca cantidad al medio porque la reutilizan en su mayoría gracias a la actividad HPRT) mientras que la excreción de xantina, que en condiciones normales es metabolizada a xantina preferentemente y no reutilizada, es semejante a la de las células control.

## INTRODUCCIÓN

---

Varios autores han relacionado el incremento de hipoxantina con la patogenia de las manifestaciones neurológicas presentes en la deficiencia de HPRT. Algunos proponen que éstas se unen a los receptores de benzodiazepinas del cerebro (Kish *et al.*, 1985). Otros autores sugieren que la hipoxantina podría ser la causa de la disfunción neuronal de los pacientes afectados por el SLN (Bavaresco *et al.*, 2005).

Estos mismos autores, confirman, tras inyección de hipoxantina en el estríado de rata y medición de algunos parámetros indicadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica, capacidad antioxidante tisular, actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa), que la hipoxantina induce estrés oxidativo en el estríado, hipocampo y corteza cerebral y que la reducción de la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es causada por especies reactivas de oxígeno (Bavaresco *et al.*, 2007).

En nuestro laboratorio se ha observado que los incrementos de la concentración de hipoxantina interfieren en el transporte de adenosina de linfocitos HPRT<sup>-</sup> provenientes de pacientes con el SLN (Torres *et al.*, 2004) probablemente por un mecanismo competitivo (Prior *et al.*, 2007).

La inhibición del transporte de adenosina por las elevadas concentraciones de hipoxantina, probablemente incremente los niveles de adenosina extracelular y por tanto la unión de ésta a sus receptores. Así, en las células HPRT<sup>-</sup> constatamos que a una mayor concentración de hipoxantina la cantidad de AMPc producida en respuesta al agonista de los receptores de adenosina se incrementaba (Prior *et al.*, 2007).

### 3.4.3 5-AMINO-4-IMIDAZOL CARBOXAMIDA (ZMP)

Recientemente, se ha propuesto que el metabolito cuya toxicidad es clave en la patología del SLN es el ZMP (López, 2008). El ZMP es un inhibidor de la enzima bifuncional adenilosuccinato liasa. La deficiencia de esta enzima causa retraso psicomotor y mental en humanos. Además, el ZMP inhibe la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria y, en ciertos tipos celulares, induce apoptosis (López, 2008). El ZMP es un activador de la Proteín-kinasa activada por AMP (AMPK), un regulador homeostático de los niveles energéticos en la célula que ha sido implicado en la regulación de la viabilidad celular, la biosíntesis de las catecolaminas y la estructura celular.

López propuso que la acumulación de ZMP tendría un efecto pleiotrópico en el cerebro. El ZMP inhibía directamente la respiración mitocondrial y la enzima bifuncional

adenilosuccinato liasa, pero activaba la AMPK que reduciría la viabilidad celular y la síntesis de dopamina, todo lo cual alteraría la morfología de la célula (López, 2008). Sin embargo, hasta ahora, esta hipótesis no ha sido confirmada.

### 3.5 DEPLECIÓN DE NUCLEÓTIDOS

Por último, algunos autores han propuesto que la disfunción cerebral de los pacientes con el SLN podría ser resultado de una depleción global de purinas o de la depleción de determinadas purinas (Visser *et al.*, 2000). Por ejemplo, la depleción de ATP podría causar disfunción cerebral por interferir con procesos dependientes de energía, con el desarrollo cerebral, con las reacciones dependientes del ATP como cofactor, con la reparación del ADN o un almacenamiento inapropiado de neurotransmisores en sus vesículas.

Aún así, los resultados son contradictorios en lo que se refiere a los niveles de nucleótidos de adenina en células HPRT<sup>-</sup>. Existen estudios en los que se han descrito nucleótidos de adenina aumentados (Hussain *et al.*, 1999) y otros en los que no se ha visto ninguna alteración de los mismos (Becker y Kim, 1987). Incluso se han encontrado niveles reducidos de ATP en linfoblastos HPRT<sup>-</sup> (McCreanor y Harkness, 1995) y en fibroblastos de pacientes con el SLN (Fairbanks *et al.*, 2002).

Por otra parte, modelos matemáticos de los cambios en el metabolismo de las purinas con células HPRT<sup>-</sup> en distintos grados, sugieren que la depleción de los nucleótidos de guanina es el proceso más significativamente patogénico (Curto *et al.*, 1998). Diversos autores han relacionado la depleción de nucleótidos de guanina y la alteración en el desarrollo neuronal. Messina y colaboradores, describieron que la depleción de nucleótidos de guanina en líneas celulares humanas dopaminérgicas de neuroblastoma, induce una pobre diferenciación y un crecimiento aberrante de las neuritas, similar al descrito en neuronas dopaminérgicas HPRT<sup>-</sup> en cultivo (Messina *et al.*, 2005).

Estos autores postularon que los niveles disminuidos de nucleótidos de guanina, descritos por algunos autores en los pacientes con el SLN, podrían tener un papel patogénico, al afectar al desarrollo neuronal. Shirley y colaboradores demostraron, empleando para ello la línea celular BE (2) M17, HPRT<sup>-</sup>, una disminución en el tamaño celular, así como una disminución del cociente GTP:GDP, proponiendo que las anomalías descritas podrían deberse a una alteración en dicho cociente (Shirley *et al.*, 2007).

Shirley y colaboradores, en el año 2007, realizaron una revisión de la literatura y encontraron 21 estudios en los que se cuantificaban las purinas en células HPRT<sup>-</sup>. De estos estudios, cuatro de ellos describieron una disminución de los nucleótidos de adenina, tres describieron una disminución de los nucleótidos de guanina y cuatro una depleción de ambos. Sin embargo, nueve estudios no observaron cambios en el contenido de ninguno de los dos nucleótidos (Shirley *et al.*, 2007). Esta variabilidad tan significativa puede ocurrir en una o más purinas en las células HPRT<sup>-</sup>. Se ha sugerido que la inconsistencia de estos estudios podría deberse a las diferencias entre especies, en concreto entre roedores y humanos (Pinto *et al.*, 2005). Además, Shirley y colaboradores, apoyan este argumento afirmando que esta variabilidad podría deberse a que los diferentes tipos celulares mantienen distintos niveles de purinas (Shirley *et al.*, 2007).

### 3.6. RESUMEN

En resumen, aunque son muchas las teorías que tratan de explicar la fisiopatología de las manifestaciones neurológicas del SLN, hasta el momento ninguna las explica claramente siendo la causa/as aún desconocida. Los únicos datos que conocemos hasta el momento sugieren que se trataría de un defecto que afectaría fundamentalmente a los ganglios de la base, tratándose probablemente de una alteración funcional al no haberse evidenciado alguna lesión morfológica. Este trastorno funcional podría tener lugar durante el desarrollo de esta región del cerebro y podrían estar implicados varios neurotransmisores como la dopamina, la serotonina y la adenosina. Por otra parte, el exceso de hipoxantina en el cerebro de estos pacientes podría resultar tóxico y contribuir a la patogenia de este síndrome.

### 4. INTERACCIÓN ENTRE NEUROTRANSMISORES

En los últimos años, se ha postulado la existencia de homo-dímeros, heterodímeros, e incluso oligómeros de mayor orden, de receptores acoplados a proteínas G en la membrana plasmática. El acoplamiento de estos receptores juega un importante papel en la biología y función de los mismos. Entre estos receptores acoplados a proteínas G se encuentran los receptores de dopamina, serotonina y adenosina.



### 4.1 ACOPLAMIENTO DOPAMINA-ADENOSINA: HETEROMERIZACIÓN RECEPTOR DE DOPAMINA D<sub>2</sub> - RECEPTOR DE ADENOSINA A<sub>2A</sub>

El primer indicio de las interacciones, de tipo antagonista, entre los receptores de adenosina y de dopamina se obtuvo en modelos de Parkinson usando los antagonistas no selectivos cafeína y teofilina en combinación con L-DOPA y agonistas de los receptores de dopamina. Se apreció un incremento de la actividad motora producida por los agonistas dopaminérgicos (Fuxe y Ungerstedt, 1974). Estudios posteriores han confirmado esta conexión funcional adenosina-dopamina. En animales de experimentación, la adenosina produce un efecto opuesto a la dopamina y los antagonistas de la adenosina producen efectos similares a la dopamina, tanto a nivel motor como en otros ámbitos relacionados con el comportamiento y modulados por la dopamina (Fuxe *et al.*, 1998). Criswell *et al.*, en 1998, confirmaron esta relación dopamina-adenosina en ratas lesionadas en la etapa neonatal con 6 hidroxidopamina: la administración de los agonistas de adenosina 2-cloroadenosina o 5'-N-etilcarboxamida adenosina, tras la administración de L-DOPA o SKF-38393 (agonista de DRD<sub>1</sub>), es capaz de prevenir la automutilación inducida por estos agonistas dopaminérgicos (Criswell *et al.*, 1998).

La localización conjunta de los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> se demostró mediante estudios de co-inmunoprecipitación y fluorescencia en células humanas de neuroblastoma y en células cultivadas de estriado de rata (Franco *et al.*, 2000). La exposición a largo plazo de agonistas de ADORA<sub>2A</sub> y DRD<sub>2</sub> resultó en la co-agregación, co-inmunoprecipitación y co-desensibilización de éstos (Hillion *et al.*, 2002).

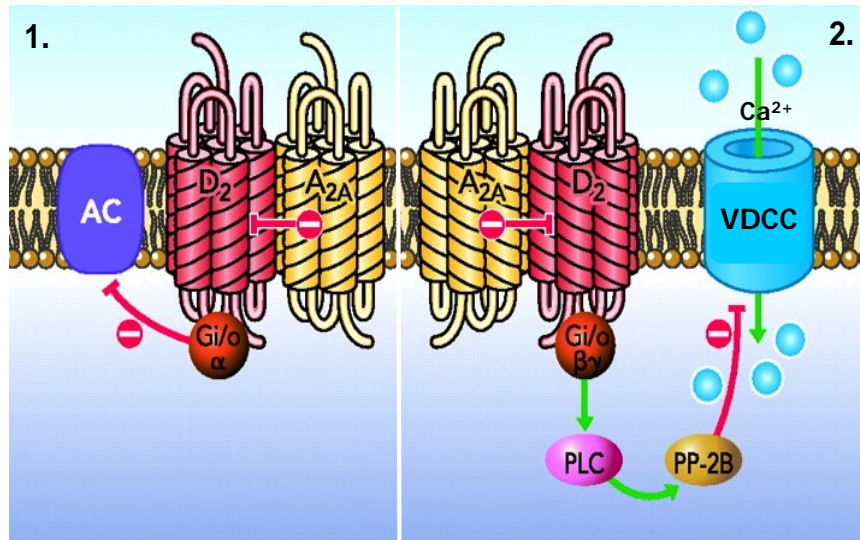


Figura 10. Representación esquemática de la interacción entre los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> a nivel de membrana y citoplasmático en las neuronas GABAérgicas del estriado. 1) El receptor A<sub>2A</sub> inhibe al receptor D<sub>2</sub>, lo que conduce a una reducción en la activación de la proteína G<sub>i/o</sub> con la consecuente reducción de la inhibición de la Adenilato ciclasa (AC) debido a la menor liberación de la subunidad α de la proteína G<sub>i</sub>. 2) Al mismo tiempo, hay una menor liberación de las subunidades βγ de la proteína G<sub>i/o</sub> activando la Fosfolipasa C (PLC). Esta activación conduce a la formación de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) con liberación de iones Ca<sup>2+</sup>, que activan al inhibidor de la Fosfatasa 2B (PP-2B) causando la defosforilación de un canal Ca<sup>2+</sup> dependiente (VDCC) y su inhibición. Modificado de Fuxé K, Marcellino D, Guidolin D, Woods, AS, Agnati LF. 2008. *Physiology*, 23, 322-32.

Se demostró, además, que el acoplamiento físico de receptores de adenosina y receptores de dopamina tiene repercusión funcional (Fig.10). En células de neuroblastoma humanas SH-SY5Y, los receptores A<sub>2A</sub> ejercen un efecto antagónico sobre las funciones mediadas por los receptores de dopamina D<sub>2</sub>, habiéndose demostrado que la activación de estos receptores A<sub>2A</sub> conduce a la disminución de la afinidad de la dopamina por los receptores de dopamina D<sub>2</sub> (Salim *et al.*, 2000).

#### 4.2. INTERACCIÓN ADENOSINA-SEROTONINA

Algunos datos funcionales apoyan también una interacción adenosina-serotonina a nivel de receptor (Lukasiewicz *et al.*, 2007). La unión de adenosina a receptores A<sub>1</sub> en neuronas serotoninérgicas inhibe la liberación de serotonina, mientras que la unión a receptores del

tipo A<sub>2A</sub> estimula la liberación de este neurotransmisor (Okada *et al.*, 2001). Además, en ratones transgénicos en los que se suprimió la expresión del receptor de serotonina, la expresión de los receptores A<sub>2A</sub> estaba descendida en los ganglios basales, mientras que la expresión de los receptores A<sub>1</sub> estaba elevada.

### 4.3. INTERACCIÓN DOPAMINA-SEROTONINA

La interacción entre los receptores de dopamina y de serotonina ha sido demostrada a nivel funcional y físico. Dicha interacción había sido motivo de estudio desde que se demostrara la presencia de monoaminas en las neuronas a mediados de los años 60. Estudios neuroanatómicos indicaron que las neuronas dopaminérgicas del cerebro reciben inervación de las fibras serotoninérgicas provenientes de los cuerpos celulares de los núcleos dorsal y medial de Raphé (Azmitia y Segal, 1978; Van Der Kooy y Attori, 1980; Van Bockstaele *et al.*, 1994; Moukhles *et al.*, 1997). Por otra parte, estudios experimentales en los que se provocaba una disminución de serotonina, mediante lesiones nerviosas con neurotoxinas, inhibición de la síntesis de serotonina o bloqueo del receptor de serotonina, producían un aumento en la neurotransmisión dopaminérgica. Estos resultados permitieron concluir que el sistema serotoninérgico inhibe las funciones dopaminérgicas (Samanin y Garattini, 1975). Otros estudios sugieren que varios subtipos de receptores de serotonina, incluidos 5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub>, 5-HTR<sub>2A</sub>, 5-HTR<sub>3</sub>, y 5-HTR<sub>4</sub> facilitan tanto la función como la liberación de dopamina, mientras que el receptor 5-HTR<sub>2C</sub> media un efecto inhibitorio de la serotonina sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas y la liberación de dopamina (Di Giovanni *et al.*, 2010).

Finalmente, en el año 2010, Łukasiewicz y colaboradores, demostraron en células humanas de riñón (HEK 293) y mediante el uso de técnicas biofísicas (medidas espectrofluorimétricas y de fluorescencia) basadas en el nivel de transferencia energética entre una molécula donadora de energía y otra aceptora, ambas próximas entre sí (FRET), que 5-HTR<sub>2A</sub> y DRD<sub>2</sub>, forman dímeros lo que permitió sugerir por primera vez, que el complejo 5-HTR<sub>2A</sub>/DRD<sub>2</sub> podría existir en células vivas (Łukasiewicz *et al.*, 2010).

### 4.4. INTERACCIÓN DOPAMINA-ADENOSINA-SEROTONINA EN EL SLN

Esta interacción entre los receptores acoplados a proteínas G nos ha llevado a postular que el desequilibrio en el transporte de adenosina, encontrado en células HPRT<sup>-</sup>, y la consiguiente alteración de los niveles extracelulares de la misma, (Prior *et al.*, 2007) podría afectar a la expresión de los receptores de adenosina y, a través de estos, a la neurotransmisión dopaminérgica y/o serotoninérgica. Por ello nos hemos propuesto estudiar los receptores de adenosina, serotonina y dopamina así como el transportador de dopamina en células HPRT<sup>-</sup> (expresión, cantidad de proteína y función).

### 5. LINFOCITOS COMO MODELO DE ESTUDIO EN EL SLN

Ante las dificultades que plantea el estudio del cerebro humano y, ya que los modelos animales no reproducen los síntomas neurológicos del SLN, y, las líneas celulares empleadas del sistema nervioso HPRT<sup>-</sup> son de origen tumoral, se ha hecho necesaria la búsqueda de otras células de fácil accesibilidad y mantenimiento, cuya extracción no supusiera daño alguno al paciente y en las que la expresión de las proteínas a estudiar fueran reflejo de lo que puede suceder en el cerebro.

En nuestro laboratorio hemos utilizado linfocitos procedentes de sangre venosa periférica. Son células fáciles de mantener, accesibles y son un buen modelo para el estudio de las enfermedades provocadas por desequilibrios en la neurotransmisión. Como se comentará a continuación, existe una regulación paralela entre los receptores de dopamina, serotonina y adenosina en el sistema nervioso central y en los linfocitos procedentes de sangre venosa periférica empleados.

Por otra parte, los linfocitos de pacientes con el síndrome de Lesch Nyhan reproducen las alteraciones del metabolismo de las purinas propias de la deficiencia con un aumento de la síntesis de purinas *de novo* y una elevada excreción de hipoxantina al medio (Brosh *et al.*, 1976).

Los linfocitos periféricos poseen tanto receptores de dopamina como receptores de adenosina y de serotonina, que son funcionalmente activos y cuya función está relacionada con la inmunidad. Además poseen un sistema de transporte de membrana y vesicular de dopamina, actividad tiroxina hidroxilasa y son capaces de sintetizar endógenamente dopamina.

La dopamina es capaz de activar receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> o D<sub>5</sub> en linfocitos y de provocar la secreción de interleuquina 10 y/o del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Besser *et al.*, 2005), de

## INTRODUCCIÓN

---

aumentar los niveles intracelulares de AMPc (Levite, 2008), y de activar la adhesión a fibronectina mediada por  $\beta$ 1-integrina (Levite *et al.*, 2001). Por su parte la adenosina o los agonistas de los receptores de adenosina incrementan los niveles de AMPc en linfocitos (Ernst *et al.*, 2010).

La expresión de los receptores de dopamina en linfocitos de sangre venosa periférica parece ser reflejo de su expresión en el cerebro. Este hecho estaría en consonancia con la hipótesis de que las células del sistema inmune serían un buen biomarcador periférico. Aunque esta correlación no ha sido demostrada directamente debido a limitaciones metodológicas, se ha detectado una expresión alterada de los receptores de dopamina en los linfocitos de sangre venosa periférica de los pacientes afectados por enfermedades neuropsiquiátricas en las que están implicados desequilibrios en los receptores de dopamina presentes en el cerebro (Blakely, 2001; Kwak *et al.*, 2001).

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

### **HIPÓTESIS**

La patogenia de las alteraciones del síndrome de Lesch-Nyhan podría estar relacionada con un desequilibrio de neurotransmisores, más que por la afectación aislada de uno de ellos. El acúmulo de hipoxantina, secundario a la deficiencia de HPRT, ocasionaría una disminución del transporte de adenosina, al competir por sus transportadores. Esto a su vez ocasiona un aumento de la cantidad de adenosina susceptible de unirse a sus receptores alterando la expresión de los mismos y su función. Dada la interacción entre los distintos receptores acoplados a proteínas G, la alteración en la transmisión mediada por adenosina condicionaría una alteración dopaminérgica y/o serotoninérgica.

### **OBJETIVOS**

Partiendo de esta hipótesis el principal objetivo de este trabajo ha sido examinar, a nivel de receptor, si existe un desequilibrio de neurotransmisores en las células HPRT<sup>-</sup> para lo cual se propusieron los siguientes objetivos secundarios:

- 1) Analizar la expresión de los receptores de adenosina (ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>), los receptores y transportador de dopamina (DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub>, DRD<sub>5</sub> y DAT) y de los receptores de serotonina (5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub> y 5-HTR<sub>2C</sub>) en linfocitos normales y HPRT<sup>-</sup>.
- 2) Analizar el efecto del exceso de hipoxantina sobre los niveles de expresión de los receptores de adenosina, de dopamina y del transportador de dopamina en cultivos de linfocitos normales.
- 3) Analizar el efecto del cultivo, a nivel de expresión y proteico, de los receptores de adenosina, dopamina y serotonina en linfocitos normales y HPRT<sup>-</sup>.
- 4) Corroborar a nivel proteico los posibles cambios de expresión de los receptores de adenosina, dopamina y serotonina en linfocitos normales y HPRT<sup>-</sup>, así como en cultivos de linfocitos normales en presencia y ausencia de hipoxantina.
- 5) Analizar la funcionalidad de los receptores de dopamina expresados en linfocitos en células normales y HPRT<sup>-</sup> en condiciones basales y tras incubación con el agonista SKF 38393.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***



1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, LOS RECEPTORES DE DOPAMINA D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> Y D<sub>5</sub>, DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA DAT Y DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> Y 5-HT<sub>2C</sub> EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN CONDICIONES BASALES Y TRAS INCUBACIÓN CON HIPOXANTINA 25 µM.

### 1.1 MUESTRAS ANALIZADAS

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario “La Paz”. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres de los pacientes y de los individuos sanos. Los individuos llamados sanos, fueron pacientes del hospital seleccionados en rangos de edades similares ( $\pm 2$  años). Se descartó que tuvieran alguna patología hematológica que pudiera interferir en este trabajo, para lo que se consultaron sus hemogramas. En el caso de los pacientes con el SLN, la deficiencia de la enzima HPRT se diagnosticó en base a los siguientes criterios: síntomas y signos clínicos propios de la deficiencia enzimática, concentración de ácido úrico en sangre y orina elevadas, aumento de las concentraciones de hipoxantina y xantina en plasma y orina, una disminución marcada de la actividad de la enzima HPRT en hemolisado con elevación de la actividad de la enzima Adenina fosforribosiltransferasa, y caracterización de la mutación asociada a la deficiencia de la enzima (Puig *et al.*, 2001) (Ver tabla 4).

### 1.2 SEPARACIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y EXTRACCIÓN DEL ARN

Se recogieron muestras de sangre venosa con EDTA de 12 pacientes con el SLN ( $8,4 \pm 6,4$  años, 2-20 años) y de 12 individuos sanos. Las células mononucleares se aislaron a partir de sangre periférica por el método de sedimentación por densidad con Ficoll (Boyum, 1964), empleando una solución de poliglucosa sodio diatrizoato, ajustada a densidad  $1,077 \pm 0,001$  g/ml (Histopaque® -1077, Sigma Diagnostic). Las células aisladas son en un  $88,8\% \pm 1,0\%$  linfocitos. La capa linfocitaria aislada se lavó dos veces en tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania). El ARN total se aisló usando el kit comercial QIAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Paciente	Edad	Características clínicas al diagnóstico	HPRT	APRT	Mutación descrita
LN1	4 años	Espasticidad, coreatetosis, automutilación	<0,01	45	c.331 del AG
LN2	19 m	Retraso psicomotor, cristaluria	<0,01	68	c.532 -3 A → G
LN3	11 m	Retraso psicomotor, espasticidad	<0,01	52	c. 319-384 del (exón 4)
LN4	3 años	Retraso psicomotor, pielonefritis aguda	<0,01	60	c. 99 ins GG
LN5	19 m	Retraso psicomotor, arenilla en pañal.	<0,01	59	c. 551 +1 G → A
LN6	9 m	Retraso desarrollo motor, nefrocalcinosis.	<0,01	53	c. 610 del A
LN7	11 m	Retraso desarrollo motor.	<0,01	41	c. 610 C→ G
LN8	2 años	Parálisis cerebral Infantil espástico-distónica , retraso psicomotor	<0,01	53	c.609-820 del (exón 9)
LN9	4 años	Parálisis cerebral, retraso psicomotor, automutilación.	<0,01	57	c. 617 +1 A → G
LN10	16 m	Tetraparesia distónica	<0,01	59	c. 261-265 del GCCAT ins TAGATGTGAAA
LN11	11 m	Retraso psicomotor	<0,01	60	No mutación en ARNm Disminución de la expresión
LN12	6 m	Insuficiencia renal aguda a los 16 días de vida	<0,01	63	c. 50 ins AT

Tabla 4. Características clínicas, enzimáticas y genéticas de los pacientes incluidos en este estudio. Las mutaciones han sido descritas en base al ARNm (NM\_000194.2). HPRT: VALORES NORMALES: 64 a 124 nmol/h/mg hemoglobina. APRT: VALORES NORMALES 19 a 38 nmol/h/mg hemoglobina.

Este procedimiento combina la unión selectiva que permiten las columnas de membrana de sílice QIAamp con el proceso de centrifugación.

La unión de ARN de más de 200 pares de bases a la membrana de estas columnas se logra gracias a un sistema basado en la elevada concentración de sales.

### 1.3 EFECTO DEL EXCESO DE HIPOXANTINA

Se obtuvieron muestras de sangre venosa con EDTA de 13 individuos sanos. La capa linfocitaria, obtenida como se ha descrito anteriormente, se lavó dos veces en medio compuesto por RPMI 1640 (Sigma Diagnostic) y suero bovino fetal (FBS) al 10% v/v (Gibco, Barcelona, España). A continuación, las células se transfirieron a medio RPMI 1640 conteniendo suero bovino fetal (FBS) al 10% v/v, estreptomicina (50 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Sigma Diagnostic) y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 24 horas de incubación, las células se dividieron en dos alícuotas y se cultivaron en medio con RPMI 1640, suero bovino fetal (FBS) al 1% v/v, estreptomicina (50µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Sigma Diagnostic) en presencia (C-PBL<sub>Hx</sub>) o en ausencia (C-PBL<sub>w</sub>) de hipoxantina 25 µM a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 72 horas de incubación, las células se centrifugaron y el pellet obtenido se lavó dos veces en tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania) y el ARN total se aisló usando el kit comercial QIAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania).

### 1.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA, DE LOS RECEPTORES Y EL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA Y DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA POR “PCR A TIEMPO REAL”

El ADN complementario (ADNc) se obtuvo mediante RT-PCR usando ImProm-II™ Reverse Transcriptase system (Promega, Promega Corporation, WI, EEUU) y oligo (dT) 15 mer como cebador (Promega, Promega Corporation, WI, EEUU). El programa que se usó para la retrotranscripción fue el siguiente: 5 minutos a 25° C, 60 minutos a 42° C, 15 minutos a 70° C tras una incubación previa de 5 minutos a 70° C del RNA con el oligo (dT) 15 mer (Promega, Promega Corporation, WI, EEUU), en un termociclador Termal Cycler BioCycler TC-S (Lab4you GMBH, Berlín, Alemania).

La expresión fue cuantificada por “PCR a Tiempo Real” mediante el método de cuantificación relativa (Rasmussen, 2001). Para ello, empleamos un gen de expresión constitutiva como lo es la  $\beta$ -actina como gen de referencia y los resultados se expresaron como el cociente entre la expresión del gen de interés y la expresión cuantificada en el gen de referencia en la misma muestra.

Para obtener la concentración de estos dos parámetros en cada muestra se diseñó una curva estándar para cada uno de los transcritos. Se usó un ADNc procedente de un ARN control como calibrador. La curva estándar de la  $\beta$ -actina humana y del resto de los transcritos se elaboró a partir de diluciones seriadas de este calibrador. A la muestra de calibrador sin diluir se le asignó un valor de 100.

Para cuantificar la expresión de  $\beta$ -actina la “PCR a Tiempo Real” se llevó a cabo en el LightCycler II de Roche usando LC Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) con 2  $\mu$ l de ADN complementario como molde. Para asegurar la especificidad de los productos amplificados se determinó la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) mediante el análisis de la curva de desnaturalización.

La cuantificación de los ARN mensajeros (ARNm) de DAT, ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub> de DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y de 5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub> y 5-HTR<sub>2C</sub> se llevó a cabo con sondas de la librería universal de Roche (Roche Applied Science). Estas sondas son sondas de hidrólisis de tan sólo 8 ó 9 pares de bases con un fluorocromo donador (*reporter*) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Para lograr la elevada temperatura de melting característica de las sondas más largas se usa Locked Nucleic Acid. Debido al corto tamaño de estas sondas, cada una de ellas puede hibridar con unos 7000 transcritos. Los cebadores para DAT, ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>, para los receptores de dopamina DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> se diseñaron con el programa ProbeFinder versión 2.40 para humanos (Roche Diagnostics) y cada sonda se eligió en función de estos cebadores (Tabla 5). Usamos TaKaRa Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) (TaKaRa Bio Europe, Francia) diseñado para PCR cuantitativa usando sondas Taq Man ®. Este *cocktail* incluye la polimerasa TaKaRa high performance Ex Taq Hot Start que previene la amplificación inespecífica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a la estructura genética de DRD<sub>5</sub>, y de los receptores de serotonina 5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub> y 5-HTR<sub>2C</sub> carentes de intrones, no se pudieron diseñar cebadores en la unión de dos exones para así reducir al mínimo la posibilidad de contaminación por amplificación de ADN genómico (*Intron spanning assay*). Para evitar esta posible contaminación, tratamos el ARN con DNAsa (Ambion, Applied Systems). Diseñamos los cebadores tanto para DRD<sub>5</sub> como para 5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub> y 5-HTR<sub>2C</sub> y además, una sonda Taq Man ® (<http://biotools.umassd.edu>) para el caso de DRD<sub>5</sub>, ya que no se pudo emplear una sonda de la librería universal. Las secuencias y tamaños de los cebadores y sondas y los tamaños de los amplicones se muestran en la Tabla 5.

Gen	Secuencia del primer	# sonda de la librería universal	Longitud del amplicón	RefSeq
DAT1 (SLC6A3)	Forward 5 -CTCTGCGAGGGCTCTGTT Reverse 5 -AGCTGGAGAAGGCGATCAG	7	89	NM_001044.3
ADORA <sub>2A</sub>	Forward 5 -CTACATTGCCATCCGCATC Reverse 5 -AACCTAGCATGGGAGTCAGG	3	122	NM_000675.4
ADORA <sub>2B</sub>	Forward 5 -TCTGTGTCCCGCTCAGGT Reverse 5 -GATGCCAAAGGCAAGGAC	56	89	NM_000676.2
DRD <sub>2</sub>	Forward 5 -AGACCATGAGCCGTAGGAAG Reverse 5 -GCAGCCAGCAGATGATGA	3	96	NM_000795.3
DRD <sub>3</sub>	Forward 5 -GGCAGATTATCGACATCTTGA Reverse 5 -GCAGCCAGCAGACAATGA	7	121	NM_000796.3
DRD <sub>4</sub>	Forward 5 -GCTCTTCGTCTACTCCGAGGT Reverse 5 -CGCACAGGTTGAAGATGGA	66	116	NM_000797.2
DRD <sub>5</sub>	5 -CGACGTGAATGCAGAGAACT Reverse 5 -GTAGATGCGCGTGTAGGTCA <b>Sonda</b> 5 -CTTCTCGCTCATCAGCTTCT	-	118	NM_000798.4
HTR <sub>1A</sub>	Forward 5 -GACCGTCAGCTACCAAGTGAT Reverse 5 -GATAATTGGCCACGTTCTGC	3	128	NM_000524.2
HTR <sub>1B</sub>	Forward 5 -GGTCACCGACCTGCTTGT Reverse 5 -GTGACAGTGTACATGGTGCTGA	9	60	NM_000863.1
HTR <sub>2C</sub>	Forward 5 -CCGAGTCCGTTTCTCGTCTA Reverse 5 -TCGCGGGTGTAGCTGAT	27	90	NM_000868.2
β-ACTINA (ACTB)	Forward 5 - GAGCGGGAAATCGTGCATGACATT Reverse 5 -GAAGGTAGTTTCGTGGATGCC	Sybr Green	76	NM_001101.3

Tabla 5. Cebadores y sondas empleados para la detección mediante “PCR a Tiempo Real” de ADORA<sub>2A</sub> y ADORA<sub>2B</sub>, DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub>, DAT, de 5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub> y 5-HTR<sub>2C</sub>. Se empleó el gen de la β-actina para la cuantificación relativa.

### 2. EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DE DRD<sub>5</sub>, ADORA<sub>2A</sub> Y 5-HTR<sub>1A</sub>

En este trabajo nos propusimos determinar si el período de tiempo en que las células estén cultivándose afecta a los niveles de expresión y/o proteicos en los receptores de dopamina, DRD<sub>5</sub>, adenosina, ADORA<sub>2A</sub> y serotonina, 5-HTR<sub>1A</sub>, comparados con los niveles de expresión y/o proteicos cuantificados tanto en C-PBL como en LN-PBL sin cultivar (C-PBL<sub>B</sub>/LN-PBL<sub>B</sub>) y si existen diferencias entre las células provenientes de individuos control y las células HPRT<sup>-</sup>. La expresión de ARNm se cuantificó mediante “PCR a Tiempo Real” tal y como se ha descrito en el apartado 1.3. Los cebadores y sonda usados se detallan en la tabla 6.

Se obtuvieron muestras de sangre con EDTA de 5 individuos sanos y de 5 pacientes con el SLN. La capa linfocitaria, obtenida como se ha descrito anteriormente, se lavó dos veces en medio compuesto por RPMI 1640 (Sigma Diagnostic) y suero bovino fetal (FBS) al 10% v/v (Gibco, Barcelona, España). A continuación, las células se transfirieron a medio RPMI 1640 conteniendo suero bovino fetal (FBS) al 10% v/v, estreptomina (50µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Sigma Diagnostic) y se incubaron a 37C° en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 24 horas de incubación, se contaron las células y se cultivó una concentración aproximada de células de 1·10<sup>6</sup> céls /ml por muestra en medio con RPMI 1640, suero bovino fetal (FBS) al 1% v/v, estreptomina (50µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Sigma Diagnostic) a 37C° en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 96 horas de incubación, tiempo máximo antes de comprometer la viabilidad celular, se centrifugaron y el pellet obtenido (C-PBL<sub>4D</sub>/LN-PBL<sub>4D</sub>) se lavó dos veces en tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania) y el ARN total se aisló usando el kit comercial QIAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania).

### 3. CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las células mononucleares se aislaron a partir de sangre periférica por el método de sedimentación por densidad con Ficoll (Boyum, 1964), empleando una solución de poliglucosa sodio diatrizoato, ajustada a densidad  $1,077 \pm 0,001$  g/ml (Histopaque® -1077, Sigma Diagnostic). La capa linfocitaria aislada se lavó una vez con solución salina fisiológica (Laboratorios Grifols, Barcelona, España) y otra con tampón de lisis de eritrocitos (Qiagen GMBH, d-40724, Hilden, Alemania).

a) Detección de los niveles de proteína en extractos proteicos provenientes de individuos control y de pacientes con el SLN en condiciones basales. El pellet se resuspendió, y homogeneizó con jeringa, en 250  $\mu$ l de tampón 2:1:1 ( $\text{HPO}_4\text{Na}_2$  2mM, ditiotretitol 1 mM, ácido etilen diamino tetracético (EDTA) 1 mM; pH 7,4) al que se añadía Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche Applied Science) para preservar a las proteínas de la actividad proteasa. A continuación se lisaron las células mediante 3 ciclos de congelación/descongelación a  $-70^\circ\text{C}$  y posteriormente 1 minuto de sonicación y se centrifugaron los tubos durante 15 minutos a 14.000 rpm en frío. El sobrenadante de esta centrifugación constituye el extracto.

b) Detección de los niveles de proteína en extractos proteicos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia y ausencia de hipoxantina 25  $\mu$ m. Para ello se incubaron los linfocitos tal y como se menciona en el apartado 1.2. Tras las 72 h de incubación se centrifugaron y el pellet se trató como se ha mencionado en el apartado a.

c) Detección de los niveles de proteína en extractos proteicos provenientes de linfocitos control y de pacientes con SLN cultivados durante 4 días. Para ello se incubaron los linfocitos tal como se comenta en el apartado 2. Tras las 96 h de incubación se centrifugaron y el pellet se trató como se ha mencionado en el apartado a.

### 3.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROTEÍCAS

La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) en placa microtiter y usando un lector de placa Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltd., Suiza), a 595 nm. Se preparó una recta patrón usando el kit Bovine Gamma Globulin Standard set (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California) para ello se empleó el standard 1 mg/ml y se pusieron cantidades crecientes del mismo (entre 0 -blanco- y 20  $\mu$ l). A continuación se pipetearon 20  $\mu$ l de cada extracto diluido  $\frac{1}{2}$  tras lo que se añadían 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California) tanto en los estándares como en los extractos y se leía en el lector de placa.

Las muestras para la electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida se prepararon para cargar 30  $\mu$ g de proteína aproximadamente y se añadió a cada una la cantidad conveniente de solubilizador de Laemmli X5 (Laemmli, 1970) activado con  $\beta$ -mercaptoetanol. Antes de cargarlas en el gel, las muestras se trataron 1 minuto a 95°C.

### 3.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS, TRANSFERENCIA A MEMBRANAS E INMUNODETECCIÓN (“WESTERN-BLOTTING”)

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS (SDS-PAGE), y utilizando el sistema Mini-Protean III Cell (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California) a un voltaje constante de 100 V. Posteriormente, las proteínas eran transferidas a membranas de polivinildenedifloride (Roche Diagnostics) en cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California) con tampón de transferencia Tris-Glicina pH 8,3 en 20% metanol (Merck) y aplicando un voltaje de 100 V durante 1 hora y media a 4°C. A continuación las membranas se teñían con Ponceau S solution (Sigma-Aldrich Life Science, St. Luis, USA) para verificar una correcta transferencia.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Se lavaron las membranas con ácido acético al 0,04% y se bloqueaban con leche en polvo semidesnatada (Central Lechera Asturiana) al 2% en tampón fosfato salino (PBS) (Dulbecco, Berlín, Alemania) con Tween al 0,5% (TPBS) durante 1 hora tras lo que se hacían 4 lavados de 15 minutos cada uno con TPBS.

Transcurrido este tiempo, las membranas se hibridaron con anticuerpos anti DRD<sub>2</sub>, anti DRD<sub>5</sub>, anti ADORA<sub>2A</sub>, anti 5-HTR<sub>1A</sub> ó anti β-actina diluidos en leche en polvo semidesnatada (Central Lechera Asturiana) al 2% en TPBS, durante 1 hora (Tabla 6).

Tabla 6. Anticuerpos usados para la cuantificación a nivel proteico de DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>5</sub> y de A<sub>2A</sub>. Como control de carga se usó la β-actina.

ANTICUERPO	DILUCIÓN EMPLEADA	ISOTIPO	TAMAÑO DEL FRAGMENTO DETECTADO	CASA COMERCIAL
α-DRD <sub>2</sub>	1:3000	Policlonal IgG CONEJO	48 kDa	ACRIS Antibodies, Herford, Alemania
α-DRD <sub>5</sub>	1:3000	Policlonal IgG CONEJO	53 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania
α-A <sub>2A</sub>	1:3000	Policlonal IgG CONEJO	45 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania
α-5-HTR <sub>1A</sub>	1:3000	Policlonal IgG CONEJO	55 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania
α-actina	1:3000	Policlonal IgG CONEJO	43 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se hacían tres lavados de la membrana en tampón TPBS de 15 minutos de duración cada uno de ellos.

A continuación, se hibridaba la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Goat Anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) durante 45 minutos, tras los que se lavaba la membrana tres veces con tampón fosfato salino (PBS, Dulbecco, Berlín, Alemania) con Tween al 0,5% (TPBS) durante 45 minutos. La detección de las bandas proteicas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia usando un kit comercial (Amersham Pharmacia Biotech) y las imágenes fueron tomadas en el documentador de geles para quimioluminiscencia MF-Chemibis 6.0 (*DNR Bio-Imaging Systems*, Israel) (Fig.11).



Figura 11. Documentador de geles para quimioluminiscencia (*DNR Bio-Imaging Systems*, Israel).

#### 4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP CÍCLICO (AMPc) EN CONDICIONES BASALES Y EN PRESENCIA DEL AGONISTA SKF-38393

La determinación del AMPc se realizó mediante un enzoinmunoensayo (EIA) diseñado para detectar AMPc total (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe, Alemania). Este ensayo está basado en la competición entre el AMPc celular y una cantidad fija de AMPc conjugado con la peroxidasa por un número limitado de sitios de unión a anticuerpos específicos para AMPc. Para ello, se combina el uso de de AMPc conjugado con la peroxidasa, un antisuero específico que puede ser inmovilizado de las microplacas y un sustrato enzimático estable como es el 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidine (TMB)/peróxido de hidrógeno (Fig. 12).

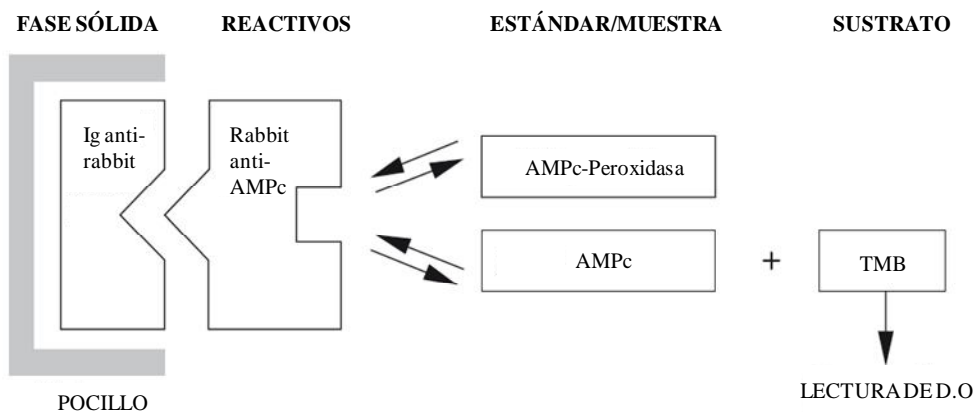


Figura 12. Fundamento del ensayo inmunoenzimático (EIA). El AMPc celular compite con una cantidad fija de AMPc conjugado con la peroxidasa por un número limitado de sitios de unión a anticuerpos específicos para AMPc.

Para la determinación del AMPc en linfocitos de sangre venosa periférica, se realizó una recta patrón ( $r=0,99$ ) con cantidades decrecientes de AMPc empleando los estándares proporcionados por el kit comercial de Amersham. Las concentraciones elegidas estaban en el rango entre los 50 y los 1000 femtomoles de AMPc/pocillo.

En la recta se enfrentan el porcentaje de unión de cada estándar, usando la proporción  $B/B_0$  que representa el cociente entre la densidad óptica de cada estándar menos la densidad óptica del pocillo de unión no específica (\*NSB) dividido entre la densidad óptica del estándar 0 menos la densidad óptica del pocillo NSB y el logaritmo de la concentración de AMPc (Fig.13).

Se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada estándar por triplicado y se pasaron a la placa para EIA, a continuación se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del antisuero y se incubaron 2 horas a 4 °C, transcurrido este tiempo, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del AMPc conjugado con la peroxidasa y se incubó a 4 °C durante 1 hora, tras la cual se lavaron los pocillos 4 veces mediante aspiración añadiendo 400  $\mu\text{l}$  del tampón de lavado proporcionado en el kit.

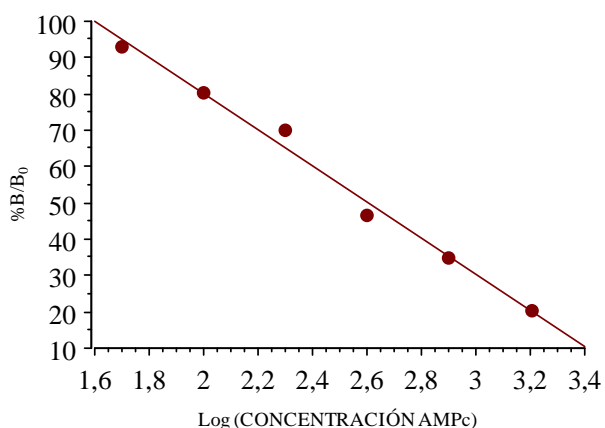


Figura 13. Recta patrón para la determinación de AMPc. Para la construcción de la recta se emplearon cantidades decrecientes de AMPc (entre 50 y 1000 femtomoles). \*En ausencia de anticuerpo específico un pequeño porcentaje de la muestra se une al pocillo, el pocillo NSB representa esta unión.

Se dejó secar al aire y se añadieron 150  $\mu$ l del sustrato enzimático 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB)/peróxido de hidrógeno incubándose 30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua. La reacción se paró añadiendo 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1,0 M y la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas ELISA minilyser.

#### 4.1 ESTIMULACIÓN DE C-PBL y LN-PBL CON FORSKOLINA

Antes de estudiar el efecto de la activación de la AC a través de los receptores dopaminérgicos tipo 1, acoplados positivamente a la misma, estudiamos el efecto de la activación directa de la AC. Para ello usamos forskolina (Sigma-Aldrich, Alemania), un diterpeno activador de la AC. La concentración empleada fue 1 mM y el tiempo de incubación 1 hora (Álava *et al.*, 1992).

El ensayo se llevó a cabo a partir de linfocitos procedentes de 9 ml de sangre venosa periférica de individuos control o de pacientes con el SLN extraídos como ya se explicó anteriormente (Apartado 1.1). Una vez extraídos, se incubaban una noche en medio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, Alemania) a pH 7,2 en estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo, se tomaban 160  $\mu$ l de los linfocitos cultivados, se pasaban a una placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon) y se incubaron 10 minutos con el inhibidor de la fosfodiesterasa Ro-20-1724 (Calbiochem, Nottingham, Inglaterra) a una concentración de 30  $\mu$ M. Posteriormente se incubaban tres pocillos por muestra con/sin forskolina 1 mM durante 1 hora. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l del antisuero y se incubaron 2 horas a 4 °C.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 50  $\mu$ l del AMPc conjugado con la peroxidasa y se incubó a 4 °C durante 1 hora, tras la cual se lavaron los pocillos 4 veces mediante aspiración añadiendo 400  $\mu$ l del búffer de lavado proporcionado en el kit, se dejó secar al aire y se añadieron 150  $\mu$ l del sustrato enzimático (TMB)/peróxido de hidrógeno incubándose 30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua. La reacción se paró añadiendo 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1,0 M y la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas EIA minilyser.

#### 4.2 ESTIMULACIÓN DE C-PBL y LN-PBL CON SKF 38393

Para la determinación de la concentración de SKF 38393 (1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine-7,8-diol) (Tocris Bioscience, Inglaterra), agonista de los receptores de dopamina tipo 1, a la cual se produce una máxima estimulación de los receptores, se tomaron 160  $\mu$ l de los linfocitos cultivados 24 horas en medio HBSS a pH 7,2 por pocillo, se pasaron a una placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon) y se incubaron 10 minutos con el inhibidor de la fosfodiesterasa Ro-20-1724 a una concentración final de 30  $\mu$ M. A continuación se añadió SKF 38393, a distintas concentraciones (entre 100  $\mu$ M y 0,001  $\mu$ M) y se incubó 1 hora a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras este tiempo se añadieron 100  $\mu$ l de antisuero y se procedió del mismo modo descrito en el apartado 4.1.

Una vez establecida la concentración a la cual la estimulación es máxima, se incubaron las células con dicha concentración de SKF 38393 durante diferentes tiempos para establecer a cuál de ellos la estimulación era mayor

Una vez elegidas las condiciones del ensayo (concentración de agonista y tiempo de incubación), este se llevó a cabo a partir de linfocitos procedentes de 9 ml de sangre venosa periférica de individuos control o de pacientes con el SLN extraídos como ya se explicó anteriormente (Apartado 1.1).

Una vez extraídos los linfocitos, se incubaban una noche en medio HBSS a pH 7,2 en estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se tomaron 160 µl de los linfocitos cultivados, se pasaron a una placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon) y se incubaron 10 minutos con el inhibidor de la fosfodiesterasa Ro-20-1724. Posteriormente se incubaban tres pocillos por muestra con SKF 38393 0,1 µM durante 2 horas, otros tres pocillos con forskolina 1 mM durante 1 hora, y tres pocillos a los que no se añadía ninguno de estos dos compuestos (condiciones basales). Tras la incubación se procedía como se ha comentado en el apartado 4.1 hasta completar el EIA.

### 5. ANÁLISIS DE DATOS

#### 5.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub>, DRD<sub>5</sub>, DE 5-HTR<sub>1A</sub>, Y DE DAT

El análisis de los datos de la cuantificación de la expresión de ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>, de DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub>, de 5-HTR<sub>1A</sub> y de DAT se hizo con el software del LightCycler (Versión 3.5.3). Este software solo considera los valores de fluorescencia medidos en la fase de crecimiento exponencial del proceso de amplificación de la PCR. El “crossing point” (Cp) se define como el número de ciclos en los cuales los niveles de fluorescencia de todas las muestras son los mismos, justo por encima de la línea base. El Cp lo calcula automáticamente el software del LightCycler por el “método del máximo de la segunda derivada”: El software identifica el primer punto de corte de la curva de fluorescencia. Este punto de corte corresponde al primer máximo de la curva de la segunda derivada.

La curva estándar se genera representando los Cp *versus* los logaritmos de las concentraciones de cada dilución de cada estándar o calibrador, de este modo, el software calcula una recta de regresión lineal que permite interpolar Cp de cualquier muestra y calcular sus respectivas concentraciones (Rasmussen, 2001). Los datos se expresaron como el cociente entre la concentración del gen a cuantificar y la concentración de β-actina cuantificada para esa misma muestra y se presentan como la media ± la desviación estándar (DS).

Cuando los datos obtenidos para cada receptor quedaron fuera de la recta patrón construida para cada uno de ellos, por lo que la cuantificación relativa basada en la relación “expresión del gen a estudio / expresión del gen de referencia ( $\beta$ -actina)” no fue posible, empleamos un método en el que no se precisa recta patrón.

La ecuación usada, (Fig. 14) está basada en el modelo matemático diseñado por Michael W. Pfaffl (Pfaffl, 2001). En este modelo, la expresión relativa se calcula incluyendo las eficiencias de PCR de cada gen estudiado (E) y las diferencias de crossing points entre la expresión de un gen medida en distintas condiciones ( $\Delta$ Cp).

$$\text{PROPORCIÓN} = \frac{(E_{\text{gen a estudiar}})^{\Delta\text{Cp gen a estudio (basal-4 días)}}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta\text{Cp gen de referencia (basal-4 días)}}}$$

Figura 14. Ecuación basada en el modelo matemático diseñado por Michael W. Pfaffl (Pfaffl, 2001) para el cálculo de la expresión, cuantificada por “PCR a Tiempo Real”, de dos genes en relación a otro de referencia.

Las eficiencias de la “PCR en Tiempo Real” se calculan a partir de las pendientes de cada curva estándar (Pfaffl, 2001) de acuerdo a la siguiente fórmula:  $E=10^{[-1/\text{pendiente}]}$ .

Es importante mencionar que la eficiencia de la “PCR a Tiempo Real” es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004) siendo el incremento de ADN (P)= (E)<sup>n</sup> y “n” el número de ciclos.

Las diferencias de expresión entre DAT, ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub> y 5-HTR<sub>1A</sub> entre los linfocitos de los individuos control (C-PBL) y los linfocitos de los pacientes con el SLN (LN-PBL) se calcularon usando la prueba de la U de Mann Whitney.

Las diferencias de expresión entre DAT, ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub> y 5-HTR<sub>1A</sub>, entre los linfocitos de los individuos control incubados en presencia (C-PBL<sub>Hx</sub>) o ausencia (C-PBL<sub>w</sub>) de hipoxantina 25  $\mu$ M se calcularon usando la prueba de Wilcoxon. Los test estadísticos se llevaron a cabo usando el software Statview (SAS institute, Inc., EEUU).

Se consideró significativo un p-valor  $\leq 0,05$ . En las figuras los datos están representados en diagramas de caja (*Box Plot*). En cada uno están representados: El cuartil superior e inferior, la mediana y los datos máximo y mínimo. La caja representa el 50% de los datos en el intervalo entre los cuartiles 25 y 75%.

### 5.2 CUANTIFICACIÓN A NIVEL PROTEICO DE ADORA<sub>2A</sub>, DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>5</sub> Y DE 5-HTR<sub>1A</sub>

Se realizó densitometría de bandas mediante el *software* TotalLab-100 (DNR, Bio-Imaging Systems Israel), los resultados fueron representados en histogramas en los que las barras representan las medias de cada grupo, a excepción de 5-HTR<sub>1A</sub> y DRD<sub>2</sub> en los que se representan los datos independientes, y los tallos representan las desviaciones estándar.

### 5.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP CÍCLICO (AMP<sub>c</sub>) EN CONDICIONES BASALES Y EN PRESENCIA DEL AGONISTA SKF-38393

Para determinar si el aumento en la concentración de AMP<sub>c</sub> es estadísticamente significativo tanto en los linfocitos provenientes de los individuos control (C-PBL) como en los linfocitos de los pacientes con el SLN (LN-PBL) tras ser estimulados con SKF 38393 o con forskolina se usó la prueba de Wilcoxon.

Las diferencias entre el aumento de los niveles de AMP<sub>c</sub> detectado en los linfocitos de los individuos control (C-PBL) y el aumento detectado en los linfocitos de los pacientes con el SLN (LN-PBL), tras ser estimulados con SKF 38393 o con forskolina, se calcularon usando la prueba de la U de Mann-Whitney. Los test estadísticos se llevaron a cabo usando el software Statview (SAS institute, Inc., EEUU). Se consideró significativo un p-valor  $\leq 0,05$ . Las concentraciones de AMP<sub>c</sub> tras estimulación con forskolina o SKF38393 tanto en C-PBL como en LN-PBL se representaron en gráficas de líneas.



La comparación entre el aumento de AMPc, en porcentaje respecto a la concentración basal, en C-PBL respecto al aumento en los LN-PBL se representa en histogramas en los que se incluye la media  $\pm$  1 desviación estándar (DS).

## ***RESULTADOS***

1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>, DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub>, DRD<sub>5</sub>, DE DAT Y DE 5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>1B</sub> Y 5-HTR<sub>2C</sub> EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN CONDICIONES BASALES Y TRAS INCUBACIÓN CON HIPOXANTINA 25  $\mu$ M

Se realizaron curvas estándar para los receptores de dopamina D<sub>3</sub> (pendiente 2,064, r=0,99); D<sub>4</sub> (pendiente 2,818, r=0,98) y D<sub>5</sub> (pendiente 2,765, r=1), para DAT (pendiente 2,493, r=0,99), para los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> (pendiente 2,792, r=1) y A<sub>2B</sub> (pendiente 3,852, r=0,99), para el receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> (pendiente 2,666, r=0,94); y para la  $\beta$ -actina (pendiente 3,191, r=1). DRD<sub>2</sub> así como los receptores de serotonina HT<sub>2C</sub> y HT<sub>1B</sub> fueron detectables pero no cuantificables por estar en el umbral de detección por encima del cual la cuantificación no es estadísticamente significativa.

#### 1.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> Y DRD<sub>5</sub>

La expresión de DRD<sub>3</sub> y DRD<sub>4</sub> no fue significativamente diferente entre los linfocitos provenientes de individuos control (C-PBL) y los de pacientes con el SLN (LN-PBL), (DRD<sub>3</sub>: media  $\pm$  desviación estándar (DS): 0,693  $\pm$  0,409 vs. 0,854  $\pm$  0,844; p= 0,7624; DRD<sub>4</sub>: 0,569  $\pm$  0,491 vs. 1,191  $\pm$  1,131; p = 0,094) Sin embargo, los niveles de expresión de DRD<sub>5</sub> fueron significativamente más elevados en los PBL procedentes de pacientes con el SLN que en los PBL control (12,797  $\pm$  7,587 vs. 3,655  $\pm$  1,996; p = 0,0098) (Fig. 15 A). No se detectaron diferencias significativas entre la expresión de DRD<sub>3</sub> (5,847  $\pm$  3,690 vs. 5,353  $\pm$  3,644; p = 0,5078), DRD<sub>4</sub> (0,183  $\pm$  0,163 vs. 0,137  $\pm$  0,098; p > 0,999) y DRD<sub>5</sub> (1,033  $\pm$  0,583 vs. 0,796  $\pm$  0,320; p = 0,726) cuando los PBL control fueron cultivados con (C-PBL<sub>Hx</sub>) y sin (C-PBL<sub>w</sub>) hipoxantina 25  $\mu$ M (Fig.15 B).

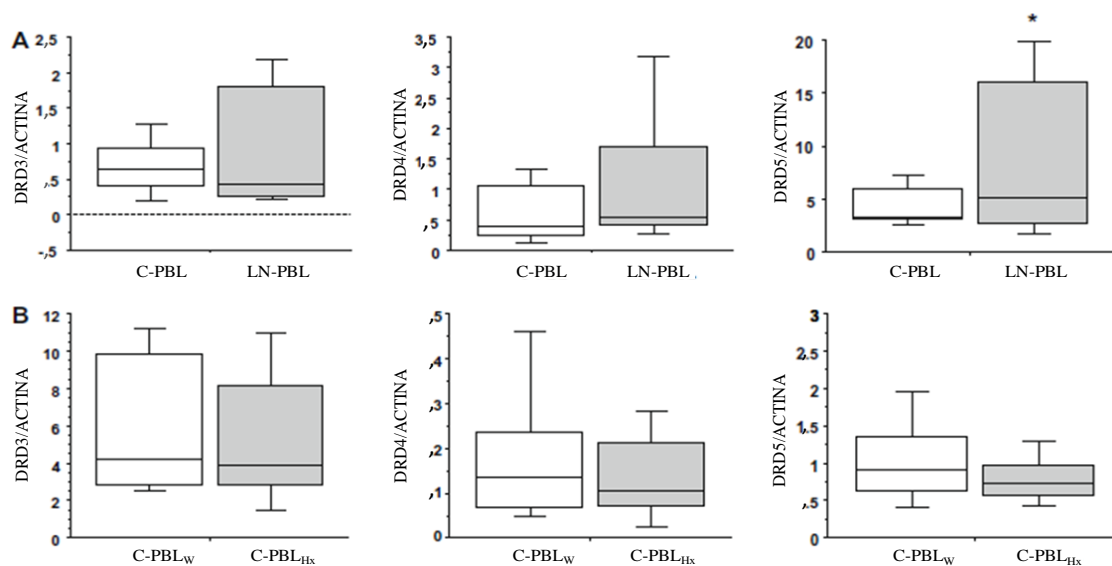


Figura 15. *Box Plot* mostrando A. Expresión de DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub> en C-PBLs vs. LN-PBLs. \* p-valor <0,05. B) Expresión de DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub> en C-PBL<sub>Hx</sub> vs. C-PBL<sub>W</sub>. Los datos están expresados como el cociente entre la expresión de DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> o DRD<sub>5</sub> y la concentración de la expresión de β-actina determinada para cada muestra.

## 1.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DAT

No se encontraron diferencias significativas entre la expresión de DAT en C-PBL y LN-PBL (media ± DS  $0,918 \pm 0,539$  vs.  $0,609 \pm 0,318$ ;  $p = 0,2050$ ) (Fig 16 A).

La expresión del transportador en los PBL incubados con hipoxantina  $25 \mu\text{M}$  no fue significativamente diferente de la expresión cuantificada en los PBL cultivados sin hipoxantina  $25 \mu\text{M}$  (media ± DS  $8,464 \pm 6,086$  vs.  $6,763 \pm 2,060$ ;  $p > 0,999$ ) (Fig. 16 B).

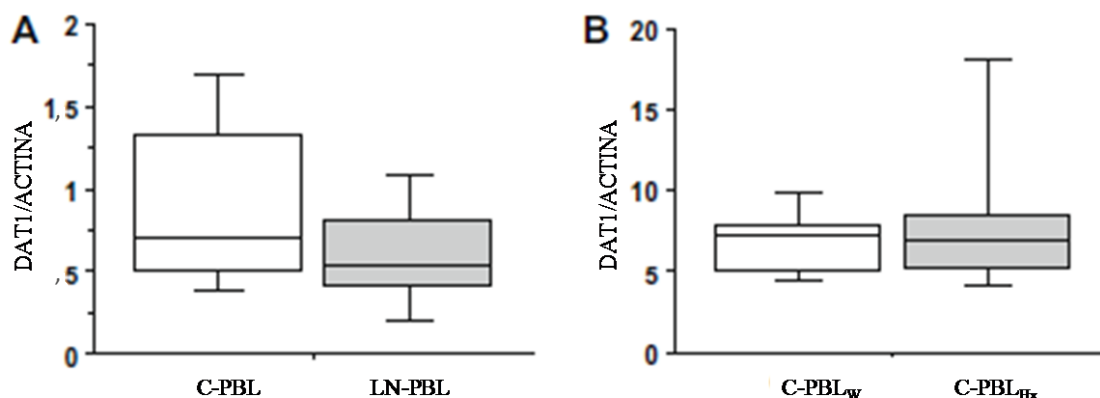


Figura 16. *Box Plot* mostrando A. Expresión de DAT en C-PBL vs. LN-PBL. B. Expresión de DAT en PBL<sub>W</sub> vs PBL<sub>Hx</sub>.

### 1.3 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ADORA<sub>2A</sub> Y ADORA<sub>2B</sub>

No se detectaron diferencias significativas de expresión ni en ADORA<sub>2A</sub> ni en ADORA<sub>2B</sub> entre C-PBL y LN-PBL (media  $\pm$  DS; ADORA<sub>2A</sub>;  $1,261 \pm 0,133$  vs.  $1,188 \pm 1,160$ ;  $p = 0,7237$ ; ADORA<sub>2B</sub>;  $1,575 \pm 0,564$  vs.  $1,215 \pm 0,375$ ;  $p = 0,1649$ ) (Fig. 17 A).

Sin embargo, la expresión de ADORA<sub>2A</sub> en los C-PBL se encontró en unos márgenes muy estrechos entre 1,029 y 1,398 (cociente ADORA<sub>2A</sub>/ $\beta$ -actina).

Por el contrario, en LN-PBL la expresión del receptor ADORA<sub>2A</sub> se encontró en todos los casos fuera del rango de los C-PBL (Fig. 17 B).

Por ello, dividimos la expresión de ADORA<sub>2A</sub> en LN-PBL en dos grupos: Alto, expresión más alta de 1,389 y Bajo, expresión más baja que 1,029.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre C-PBL y el subgrupo LN-PBL Alto (media  $\pm$  DS  $2,536 \pm 1,098$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ) y entre C-PBL y el subgrupo LN-PBL Bajo (media  $\pm$  DS  $0,514 \pm 0,204$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 8$ ) (Fig. 17B).

## RESULTADOS

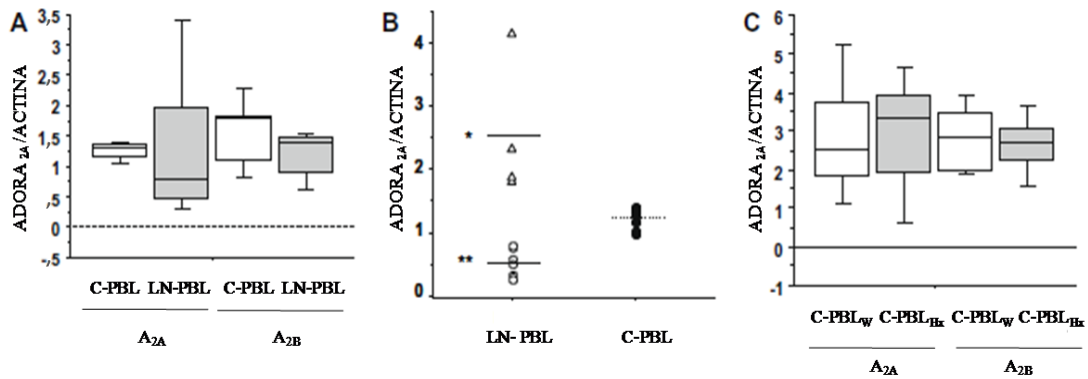


Figura 17. *Box Plot* mostrando A. Expresión de ADORA<sub>2A</sub> y ADORA<sub>2B</sub> en C-PBL comparada con la expresión de ADORA<sub>2A</sub> y ADORA<sub>2B</sub> en LN-PBL. B. Valores individuales de la expresión de ADORA<sub>2A</sub> en los linfocitos control (círculos negros) y en los de los pacientes con el SLN. Los pacientes se dividieron en dos subgrupos: El grupo LN-PBL Alto, que representa a los pacientes con expresión de ADORA<sub>2A</sub> >1,389 (triángulos) y el grupo LN-PBL Bajo, que representa a los pacientes con una expresión del receptor <1,029 (círculos vacíos). Las líneas horizontales representan los valores medios de los controles, y los grupos LN-PBL Alto y LN-PBL Bajo.\*C-PBLs vs. LN-PBL Alto,  $p < 0,05$ ; \*\*C-PBLs vs. LN-PBL Bajo,  $p < 0,0001$ . C. *Box Plot* mostrando expresión de ADORA<sub>2B</sub> y ADORA<sub>2A</sub> en C-PBL<sub>HX</sub> vs. C-PBL<sub>W</sub>.

Se analizaron los pacientes pertenecientes a cada subgrupo con el objetivo de determinar si había diferencias tanto a nivel clínico, bioquímico, enzimático o molecular entre los miembros de cada uno. A su vez comparamos variables que podrían diferenciar a los pacientes con el SLN con alta expresión de ADORA<sub>2A</sub> respecto a los controles de los pacientes con baja expresión de ADORA<sub>2A</sub> respecto a los controles tales como: edad de cada paciente en el momento de la extracción del ARN, grado de comportamiento automutilante (SIB, Self-Injurious Behavior, 0–4), y expresión de HPRT y no encontramos correlación entre estas variables y la expresión de ADORA<sub>2A</sub>.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ADORA<sub>2A</sub> o ADORA<sub>2B</sub> entre C-PBL<sub>W</sub> y C-PBL<sub>HX</sub> (ADORA<sub>2A</sub>:  $2,929 \pm 1,602$  vs.  $2,966 \pm 1,504$ ;  $p = 0,960$ ; ADORA<sub>2B</sub>:  $2,802 \pm 0,863$  vs.  $2,641 \pm 0,752$ ;  $p = 0,680$ ) (Fig. 17C).

1.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE 5-HTR<sub>1A</sub>

La expresión de 5-HTR<sub>1A</sub> fue significativamente mayor en los linfocitos provenientes de individuos control (C-PBL) respecto a los linfocitos provenientes de pacientes (LN-PBL), (media ± desviación estándar (DS): 1,057 ± 0,722 vs. 0,208 ± 0,117; p = 0,0181) (Fig.18).

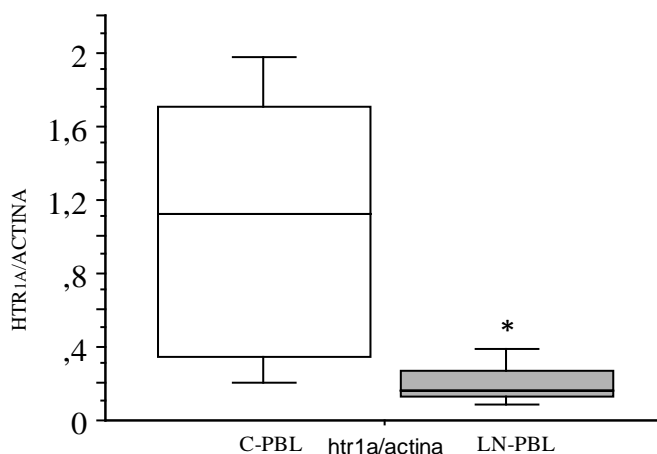


Figura 18. *Box Plot* mostrando expresión de 5-HTR<sub>1A</sub> en C-PBL y en LN-PBL. \*C-PBL vs. LN-PBL p= 0,0181. Los datos se expresan como el cociente entre la concentración de 5-HTR<sub>1A</sub> y la concentración de β-actina estimada para cada muestra.

La expresión del receptor en los PBL incubados sin hipoxantina no fue significativamente diferente de la expresión cuantificada en los PBL cultivados con hipoxantina (media ± DS 29,477 ± 18,036 vs. 27,89 ± 10,323; p = 0,3452) (Fig. 19).

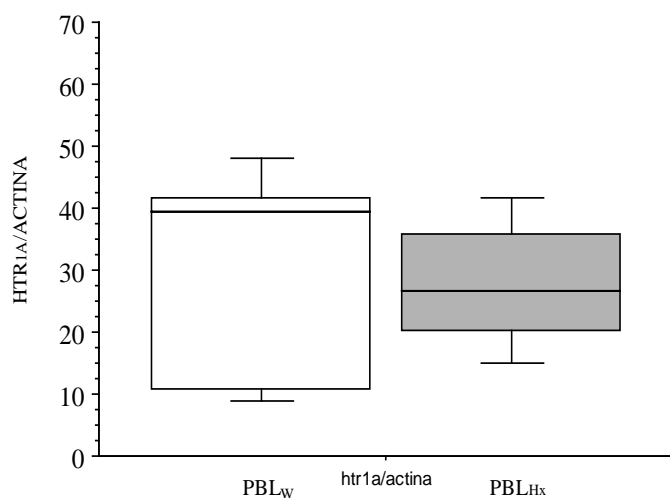


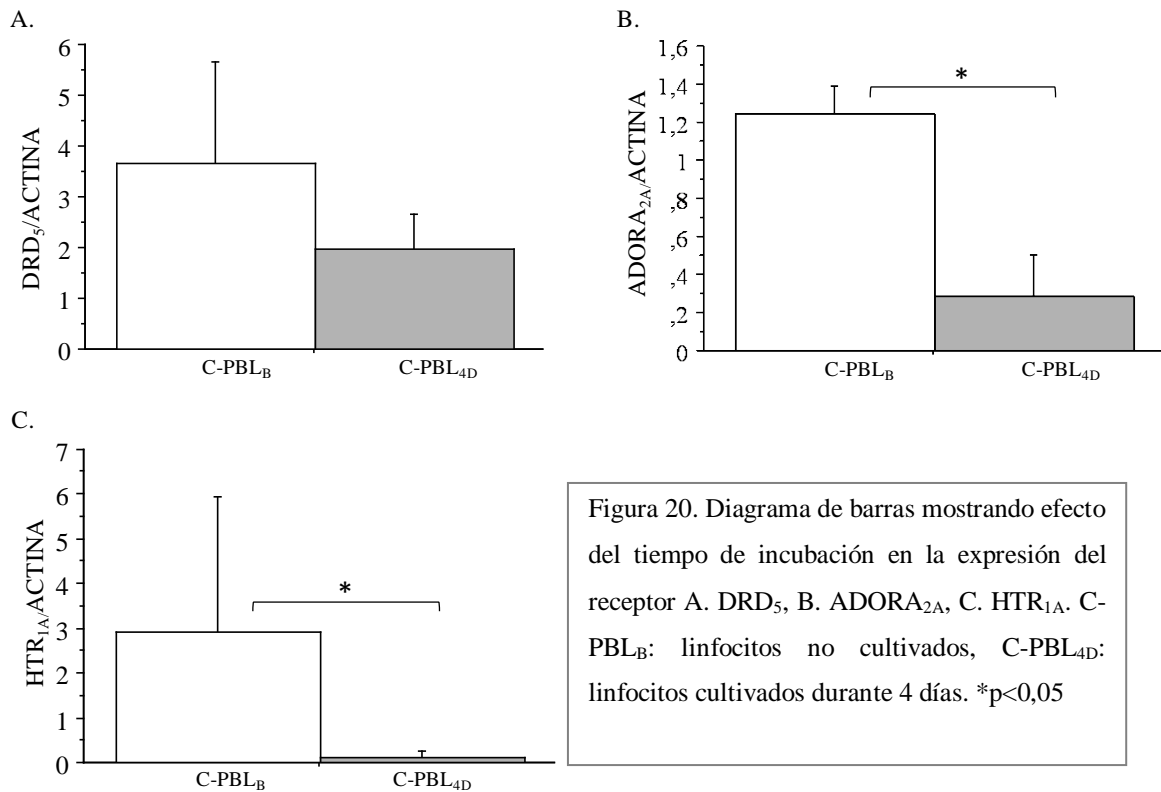
Figura 19. *Box Plot* mostrando Expresión de 5-HTR<sub>1A</sub> en PBL<sub>W</sub> vs PBL<sub>Hx</sub>.

2. EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO SOBRE LA EXPRESIÓN DE DRD<sub>5</sub>, DE ADORA<sub>2A</sub> Y DE 5-HTR<sub>1A</sub>

El tiempo que permanezcan las células en cultivo afecta a la expresión de los receptores de manera diferente según sean o no HPRT.

a) CÉLULAS CONTROL:

En el caso de DRD<sub>5</sub>, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,07$ ) entre la expresión cuantificada en C-PBL directamente (media  $\pm$  DS:  $3,650 \pm 1,990$ ) y los C-PBL cultivados 4 días (media  $\pm$  DS:  $1,980 \pm 0,680$ ) (Fig. 20 A).



Sin embargo, observamos una disminución estadísticamente significativa de la expresión de ADORA<sub>2A</sub> cuantificada en los linfocitos cultivados durante 4 días respecto a la cuantificada en los linfocitos directamente (media  $\pm$  DS:  $0,287 \pm 0,200$  vs.  $1,261 \pm 0,140$ ;  $p=0,0015$ ) (Fig. 20 B). Así mismo, cuantificamos una disminución estadísticamente significativa ( $p=0,007$ ) de la expresión de 5-HTR<sub>1A</sub> cuantificada en los C-PBL cultivados



durante 4 días respecto a la cuantificada en los C-PBL directamente (media  $\pm$  DS: 0,123  $\pm$  0,100 vs. 3  $\pm$  2,8) (Fig. 20 C).

b) CÉLULAS HPRT<sup>-</sup>:

Las células HPRT<sup>-</sup> cultivadas durante 4 días mostraron, para los tres receptores, un comportamiento muy diferente al de las células control, bien por una drástica disminución de la expresión (ADORA<sub>2A</sub>) o por un llamativo aumento de la misma (5-HTR<sub>1A</sub> y DRD<sub>5</sub>).

En ambos casos los datos obtenidos para cada receptor quedaron fuera de la recta patrón construida para cada uno de ellos por lo que la cuantificación relativa basada en la relación “expresión del gen a estudio / expresión del gen de referencia ( $\beta$ -actina)” no fue posible.

Los datos, tanto para cada receptor como para la  $\beta$ - actina, se han representado como los *crossing points* (Cp) (ciclo a partir del cual la fluorescencia es detectable y exponencial) de cada muestra y la cuantificación de la relación “expresión del gen a estudio / expresión del gen de referencia ( $\beta$ -actina)” se realizó mediante el Método Pfaffl (Pfaffl, 2001) (Ver materiales y métodos, apartado 5.2).

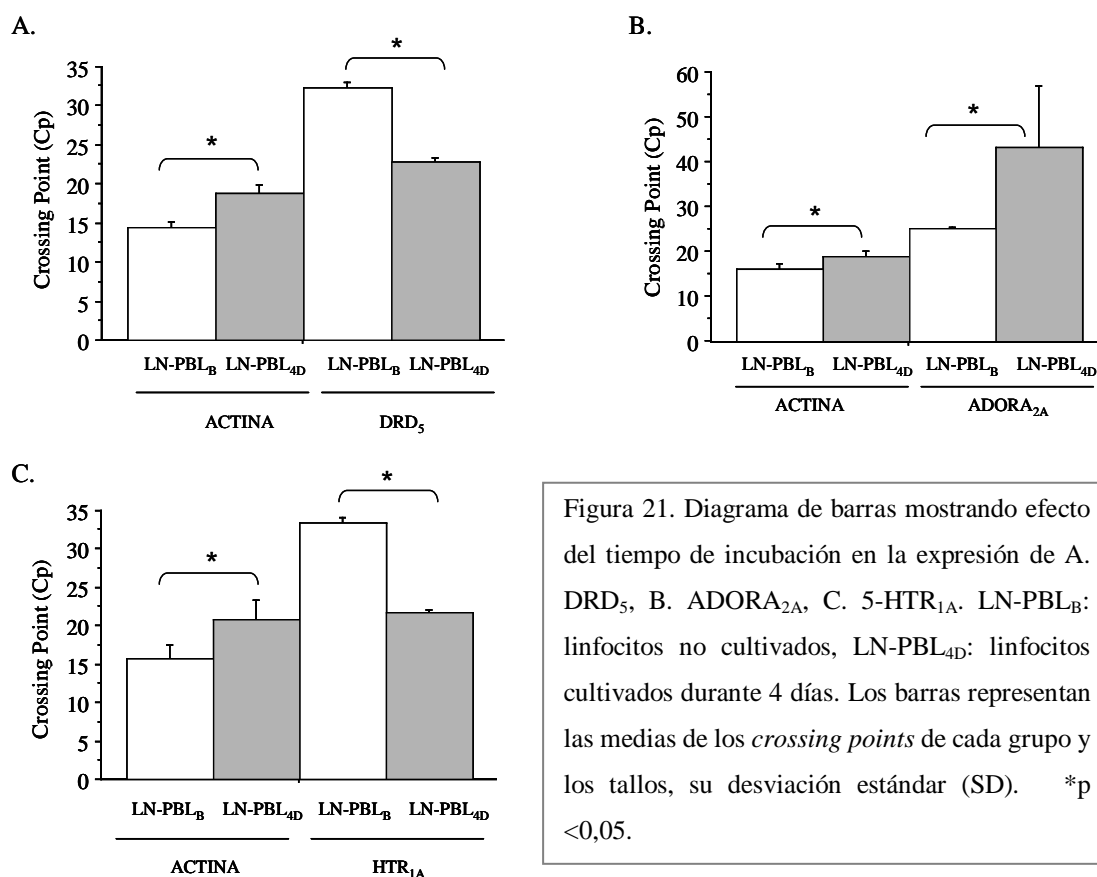
Para el caso de DRD<sub>5</sub>, las medias de los Cp determinadas para la  $\beta$ -actina de los LN-PBL<sub>B</sub> fueron significativamente diferentes ( $p=0,0001$ ) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>B</sub>): 14,484  $\pm$  0,675 vs. media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 18,687  $\pm$  1,265). Por otro lado, las medias de los Cp determinadas para el receptor de los LN-PBL<sub>B</sub> fueron significativamente superiores ( $p<0,0001$ ) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>B</sub>): 32,209  $\pm$  0,758 vs. media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 22,763  $\pm$  0,481) (Fig. 21 A). DRD<sub>5</sub> se sobreexpresó  $7,2 \cdot 10^4$  veces en los linfocitos HPRT<sup>-</sup> cultivados durante 4 días con respecto a la expresión cuantificada directamente en linfocitos HPRT<sup>-</sup>.

Para ADORA<sub>2A</sub> las medias de los Cp determinadas para la  $\beta$ -actina de los LN-PBL<sub>B</sub> fueron significativamente diferentes ( $p=0,01$ ) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>B</sub>): 15,784  $\pm$  1,522 vs. media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 18,687  $\pm$  1,265). La expresión de ADORA<sub>2A</sub>, medida en Cp, disminuye significativamente ( $p=0,0012$ ) en los linfocitos cultivados durante 4 días con respecto de la expresión medida en los linfocitos directamente (media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>B</sub>): 24,971  $\pm$  0,448 vs. media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 43,127  $\pm$  13,637) (Fig. 21 B). La expresión de este receptor disminuyó  $6,247 \cdot 10^7$  veces en

## RESULTADOS

los linfocitos HPRT<sup>-</sup> cultivados durante 4 días con respecto a la expresión cuantificada directamente en linfocitos HPRT<sup>-</sup>.

Finalmente, en el caso de 5-HTR<sub>1A</sub>, las medias de los Cp determinadas para la β-actina de los LN-PBL<sub>B</sub> fueron significativamente diferentes (p=0,0024) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (LN-PBL<sub>B</sub>): 15,703 ± 1,821 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 20,77 ± 2,509). Las medias de los Cp determinadas para el receptor de los LN-PBL<sub>B</sub> fueron significativamente superiores (p<0,0001) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (LN-PBL<sub>B</sub>): 33,429 ± 0,747 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 21,713 ± 0,407) (Fig. 21 C). Para este receptor el aumento de expresión detectado en linfocitos HPRT<sup>-</sup> cultivados durante 4 días fue de 6,1·10<sup>5</sup> respecto a la expresión cuantificada directamente en linfocitos HPRT<sup>-</sup>.



c) CÉLULAS CONTROL vs. CÉLULAS HPRT<sup>-</sup>

Al comparar los cambios de expresión producidos como efecto del tiempo de cultivo entre los linfocitos procedentes de individuos control y los linfocitos HPRT<sup>-</sup>, se observa el incremento que tiene lugar en la expresión de 5-HTR<sub>1A</sub> y DRD<sub>5</sub> en los linfocitos HPRT<sup>-</sup> respecto a la expresión cuantificada para los linfocitos control así como la disminución en la expresión de ADORA<sub>2A</sub> en los linfocitos HPRT<sup>-</sup> respecto a los linfocitos control.

Para el caso de DRD<sub>5</sub>, las medias de los Cp determinadas para la β-actina de los C-PBL<sub>4D</sub> no fueron significativamente diferentes (p=0,057) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (C-PBL<sub>4D</sub>): 16,533 ± 0,624 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 18,687 ± 1,265).

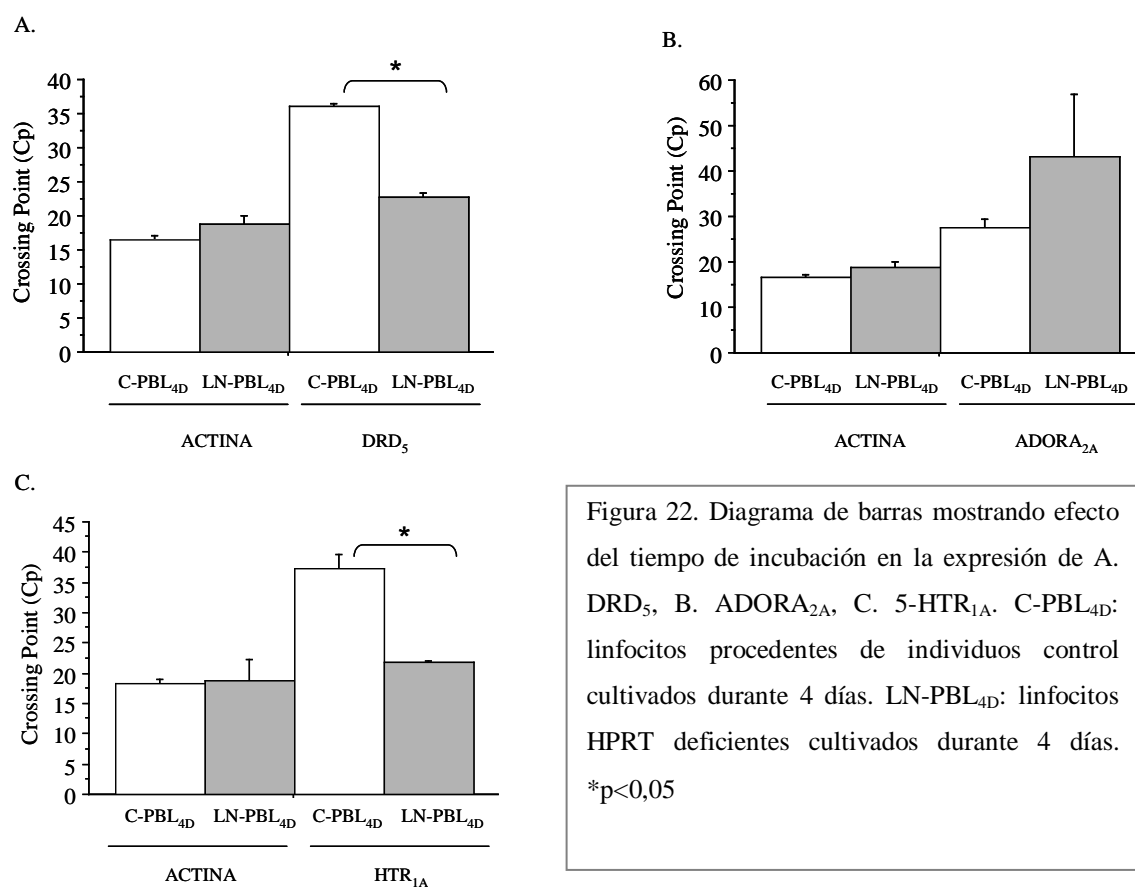
Por otro lado, las medias de los Cp determinadas para el receptor de los C-PBL<sub>4D</sub> fueron significativamente superiores (p<0,0001) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (C-PBL<sub>4D</sub>): 36,017 ± 0,446 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 22,763 ± 0,481) (Fig.22 A). El receptor DRD<sub>5</sub> se sobreexpresó 3,1·10<sup>5</sup> veces en los linfocitos HPRT<sup>-</sup> cultivados durante 4 días con respecto a la expresión cuantificada en los linfocitos control cultivados durante 4 días.

Para ADORA<sub>2A</sub>, las medias de los Cp determinadas para la β-actina de los C-PBL<sub>4D</sub> no fueron significativamente diferentes (p=0,057) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (C-PBL<sub>4D</sub>): 16,533 ± 0,624 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 18,687 ± 1,265). Por otro lado, las medias de los Cp determinadas para el receptor de los C-PBL<sub>4D</sub> fueron inferiores (p=0,1182) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (C-PBL<sub>4D</sub>): 27,350 ± 1,923 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 43,127 ± 13,637) (Fig.22 B). ADORA<sub>2A</sub> redujo su expresión 2,7·10<sup>6</sup> veces en los linfocitos HPRT<sup>-</sup> cultivados durante 4 días con respecto a la expresión cuantificada en los linfocitos control cultivados durante 4 días. Pese a las diferencias de Cp entre C-PBL<sub>4D</sub> y LN-PBL<sub>4D</sub> el p-valor es superior a 0,05. Esto es debido a que dentro de los LN-PBL<sub>4D</sub>, el 66% (8/12) está por encima de la media de los controles pero el 33% (4/12) tiene Cp que solapan con los de los controles por lo que la DS es elevada restando fuerza estadística a los datos.

Por último, para 5-HTR<sub>1A</sub>, las medias de los Cp determinadas para la β-actina de los C-PBL<sub>4D</sub> no fueron significativamente diferentes (p=0,059) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media ± DS (C-PBL<sub>4D</sub>): 18,036 ± 0,860 vs. media ± DS (LN-PBL<sub>4D</sub>): 20,777 ±

## RESULTADOS

2,509). Por otro lado, las medias de los Cp determinadas para el receptor de los C-PBL<sub>4D</sub> fueron significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) de las determinadas para los LN-PBL<sub>4D</sub> (media  $\pm$  DS (C-PBL<sub>4D</sub>):  $37,092 \pm 1,755$  vs. media  $\pm$  DS (LN-PBL<sub>4D</sub>):  $21,875 \pm 0,379$ ) (Fig.22 C). 5-HTR<sub>1A</sub> se sobreexpresó  $4,7 \cdot 10^6$  veces en los linfocitos HPRT<sup>-</sup> cultivados durante 4 días con respecto a la expresión cuantificada en los linfocitos control cultivados durante 4 días.



### 3. CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó densitometría de bandas para dar una cuantificación relativa a la proteína control de carga  $\beta$ -actina, los datos se expresan en diagramas de barras donde se enfrenta la media de cada grupo.

#### 3.1 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D<sub>2</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN EN CONDICIONES BASALES

La cantidad de receptor de dopamina D<sub>2</sub> cuantificada tanto en los extractos control como en los provenientes de los pacientes con el SLN fue muy heterogénea, siendo nula en algunas ocasiones en ambos grupos (Fig. 23). Esta heterogeneidad, muy probablemente, sería el motivo por el cual nos fue imposible cuantificar, a nivel de expresión, este receptor ya que las muestras usadas para tal efecto no tendrían una expresión suficiente para entrar en el rango de lo cuantificable.

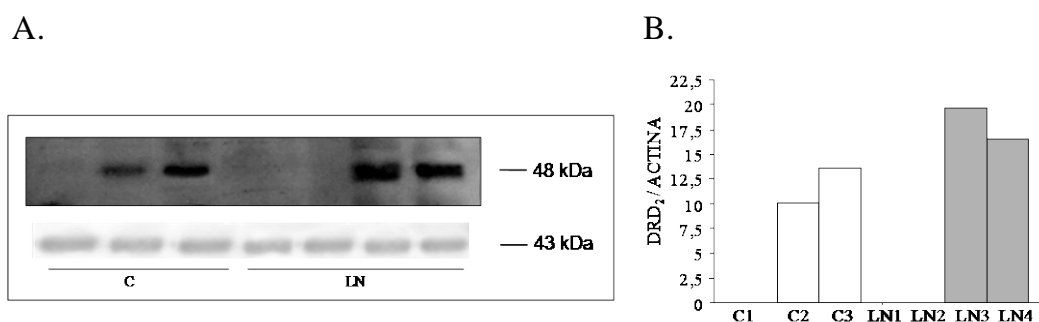


Figura 23. Western Blot A. del receptor de dopamina D<sub>2</sub> (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN). Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras.

#### 3.2 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D<sub>2</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE LINFOCITOS CONTROL CULTIVADOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE HIPOXANTINA 25 $\mu$ M

No se detectaron diferencias entre la cantidad de proteína del receptor de dopamina D<sub>2</sub> cuantificada en los extractos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia de hipoxantina 25  $\mu$ M y los provenientes de linfocitos control cultivados en ausencia de hipoxantina 25  $\mu$ M ( $0,450 \pm 0,141$  vs  $0,446 \pm 0,033$ ;  $p = 0,9711$ ) (Fig. 24).

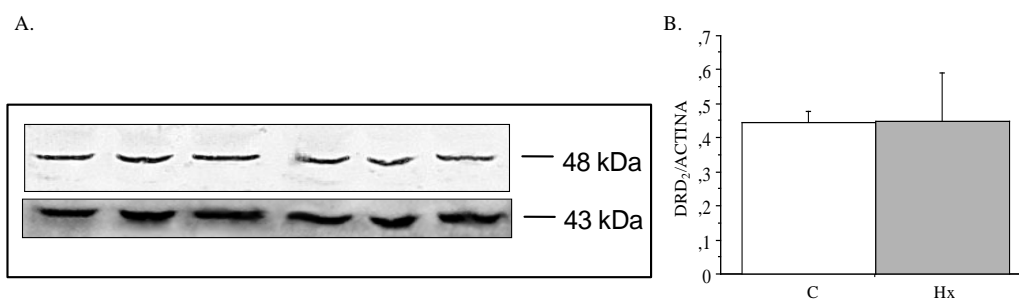


Figura 24. Western Blot A. del receptor de dopamina D<sub>2</sub> (carril superior) en extractos provenientes de linfocitos cultivados en ausencia (C) o presencia (Hx) de hipoxantina 25  $\mu$ M. Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras.

### 3.3 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D<sub>5</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN

En lo que se refiere al receptor de dopamina D<sub>5</sub>, se detectaron cantidades de proteína superiores en los extractos provenientes de los pacientes con el SLN respecto a los de los individuos control ( $3005 \pm 950$  vs.  $1017 \pm 877$ ;  $p = 0,0369$ ) tal y como sucede al cuantificar la expresión de este receptor mediante “PCR a Tiempo Real” (Ver apartado 3.1.1) (Fig. 25).

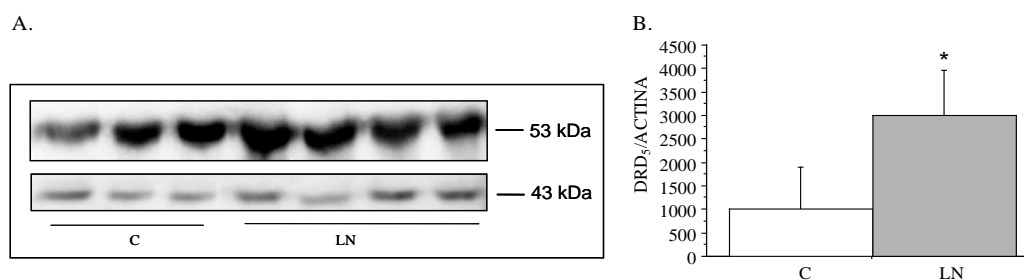


Figura 25. Western Blot A. del receptor de dopamina D<sub>5</sub> (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN). Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras. \* $p$ -valor= 0,0369.

## RESULTADOS

### 3.4 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D<sub>5</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE LINFOCITOS CONTROL CULTIVADOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE HIPOXANTINA 25 μM

No se detectaron diferencias entre la cantidad de proteína del receptor de dopamina D<sub>5</sub> cuantificada en los extractos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia de hipoxantina 25 μM y los provenientes de linfocitos control cultivados en ausencia de hipoxantina 25 μM ( $3,158 \pm 1,525$  vs  $3,418 \pm 1,855$ ;  $p= 0,846$ ) (Fig. 26).

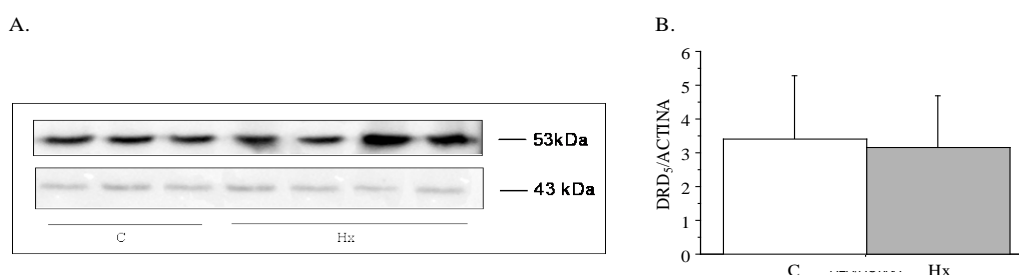


Figura 26. WESTERN BLOT A. del receptor de dopamina D<sub>5</sub> (carril superior) en extractos provenientes de linfocitos cultivados en ausencia (C) o presencia (Hx) de hipoxantina 25 μM. Como control de carga se usó la β-actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras.

### 3.5 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE DRD<sub>5</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN CULTIVADOS DURANTE 4 DÍAS

No se detectaron diferencias entre la cantidad de proteína del receptor de dopamina D<sub>5</sub> cuantificada en los extractos provenientes de linfocitos control cultivados durante 4 días y los provenientes de linfocitos de pacientes con el SLN cultivados durante el mismo período de tiempo ( $10,854 \pm 1,584$  vs  $9,168 \pm 0,959$ ;  $p= 0,19$ ) (Fig. 27).

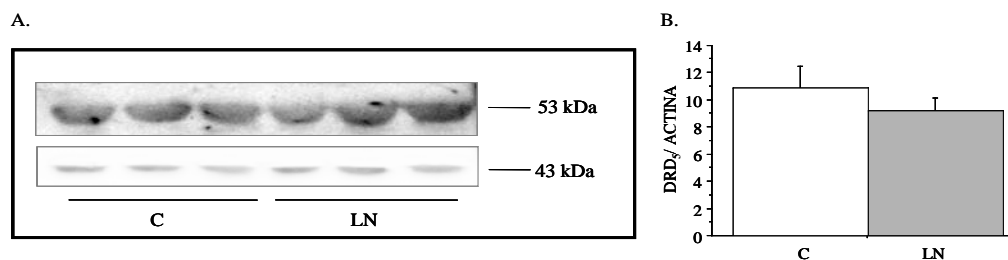


Figura 27. Western Blot A. del receptor de dopamina D<sub>5</sub> (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN) cultivados durante 4 días. Como control de carga se usó la β-actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras.

## RESULTADOS

### 3.6 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A<sub>2A</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN

Se observaron cantidades del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> superiores a la media de los C-PBL en un extracto de los provenientes de linfocitos de pacientes con el SLN y cantidades inferiores a la media de los C-PBL en tres de los extractos, (Media  $\pm$  DS: C-PBL: 6,910  $\pm$  1,899; LN-PBL: 4,025  $\pm$  3,418; p= 0,2505) lo que estaría en consonancia con los dos subgrupos observados al cuantificar la expresión del receptor mediante “PCR a Tiempo Real” (Ver apartado 3.1.3) (Fig. 29). Si subdividimos los extractos procedentes de los pacientes con el SLN en dos grupos en función de si la cantidad de proteína está por encima (LN1) o por debajo (LN2, LN3 y LN4) de la media de los controles, detectamos diferencias significativas entre el grupo por debajo de la media de los controles y la media de los controles (media  $\pm$  DS: 6,910  $\pm$  1,899 vs. 2,497  $\pm$  1,875; p= 0,049) (Fig.28).

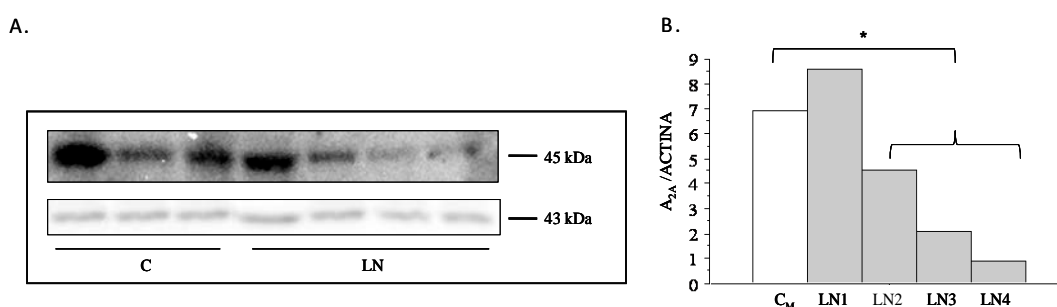


Figura 28. Western Blot A. del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN). Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras. \*p=0,049.

### 3.7 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A<sub>2A</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE LINFOCITOS CONTROL CULTIVADOS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE HIPOXANTINA 25 $\mu$ M

No se detectaron diferencias entre la cantidad de proteína del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> cuantificada en los extractos provenientes de linfocitos control cultivados en presencia de hipoxantina 25  $\mu$ M y los provenientes de linfocitos control cultivados en ausencia de hipoxantina 25  $\mu$ M (1,706  $\pm$  0,262 vs 1,466  $\pm$  0,293; p= 0,3504) (Fig. 29).



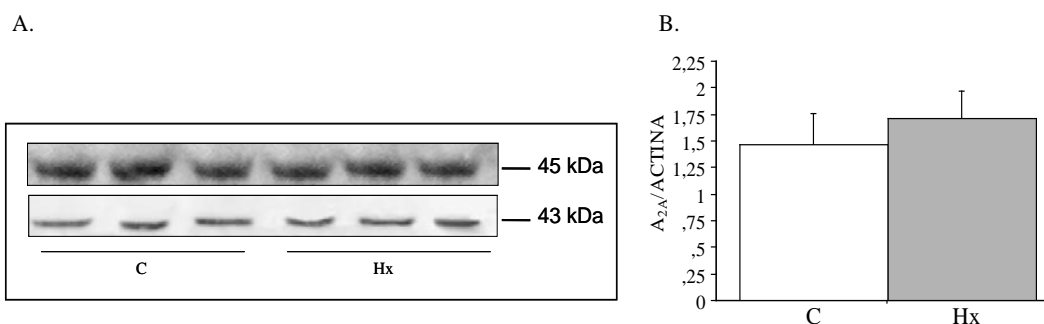


Figura 29. Western Blot A. del receptor de adenosina  $A_{2A}$  (carril superior) en extractos provenientes de linfocitos cultivados en ausencia (C) o presencia (Hx) de hipoxantina 25  $\mu$ M. Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras.

### 3.8 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE ADENOSINA $A_{2A}$ EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN CULTIVADOS DURANTE 4 DÍAS

Al cultivar los linfocitos de pacientes con el SLN y los linfocitos provenientes de individuos sanos durante 4 días, observamos que el receptor de adenosina  $A_{2A}$  sufre una drástica disminución a nivel proteico con respecto a los niveles de receptor cuantificados en los C-PBL y LN-PBL recién extraídos (Fig. 30). Este hecho está en consonancia con la reducción significativa de la expresión, cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real”, descrita anteriormente.

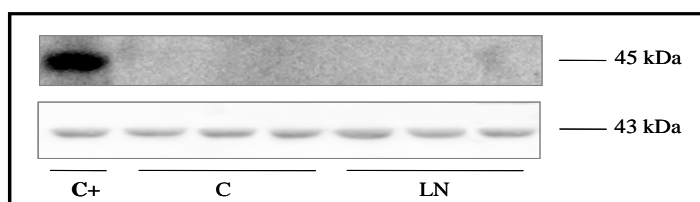


Figura 30. Western Blot del receptor de adenosina  $A_{2A}$  (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN) cultivados durante 4 días. Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). Se empleó un extracto proveniente de linfocitos control como control positivo (C+).

3.9 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE 5-HTR<sub>1A</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN

Se detectaron cantidades de proteína superiores en los extractos provenientes de los individuos control respecto de los pacientes con el SLN ( $12,599 \pm 2,178$  vs.  $6,269 \pm 0,992$ ;  $p = 0,033$ ) tal y como sucede al cuantificar la expresión de este receptor mediante “PCR a Tiempo Real” (Ver apartado 3. 1.) (Fig. 31).

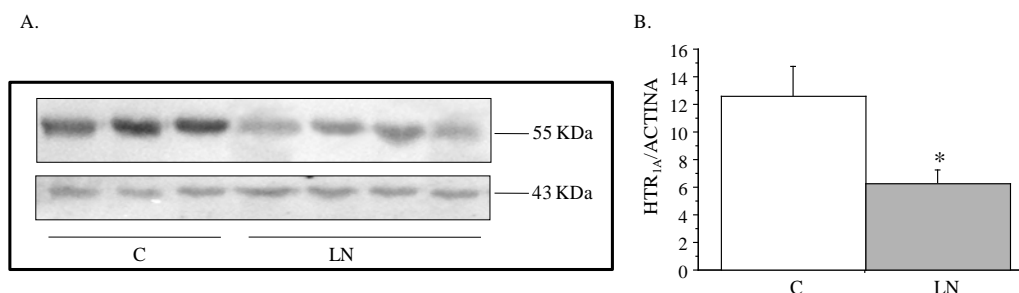


Figura 31. Western Blot A. de 5-HTR<sub>1A</sub> (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN). Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras. \* $p=0,033$

3.10 DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE 5-HTR<sub>1A</sub> EN EXTRACTOS PROTEICOS PROVENIENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y DE PACIENTES CON EL SLN CULTIVADOS DURANTE 4 DÍAS

Los extractos provenientes de linfocitos de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días presentan unos niveles de proteína significativamente superiores a los provenientes de linfocitos de individuos sanos cultivados durante 4 días ( $2,169 \pm 0,983$  vs.  $0,750 \pm 0,416$ ;  $p = 0,049$ ). Este hecho está en consonancia con la reducción significativa de la expresión, cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real”, descrita anteriormente (Fig. 32).

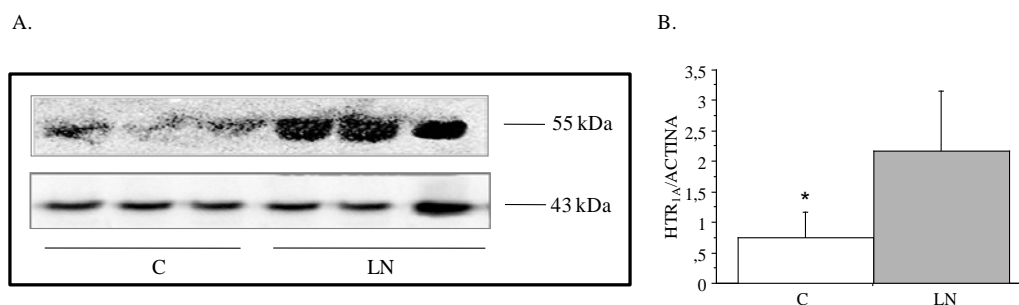


Figura 32. Western Blot A. de 5-HTR<sub>1A</sub> (carril superior) en extractos de individuos control (C) y de pacientes con el SLN (LN) cultivados durante 4 días. Como control de carga se usó la  $\beta$ -actina (carril inferior). B. Se realizó densitometría de bandas para determinar la cantidad de proteína relativa y se representó mediante diagrama de barras. \* $p=0,049$

4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP CÍCLICO (AMPc) EN CONDICIONES BASALES Y EN PRESENCIA DEL AGONISTA SKF-38393

4.1 ESTIMULACIÓN DE C-PBL y LN-PBL CON FORSKOLINA

La incubación de los linfocitos procedentes de individuos control (C-PBL) y de los linfocitos procedentes de pacientes con SLN (LN-PBL) con el activador de la AC forskolina a una concentración de 1 mM durante 1 hora, produjo un aumento significativo de la concentración de AMPc en el medio en los linfocitos control ( $48,789 \pm 7,345$  vs.  $250 \pm 160,18$ ;  $p= 0,0463$ ). En los linfocitos de pacientes con SLN la estimulación con forskolina ocasionó un aumento similar de los niveles de AMPc, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo ( $46,962 \pm 4,395$  vs.  $138,950 \pm 81,719$ ;  $p= 0,063$ ) (Fig. 33).

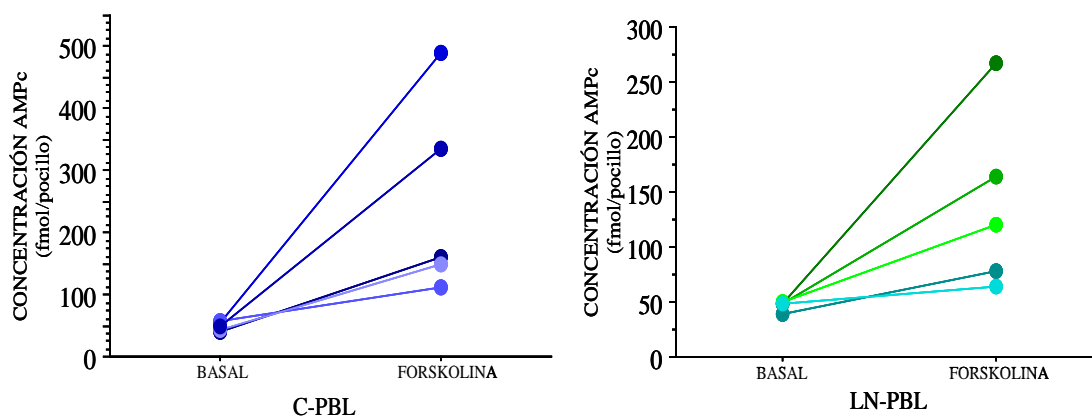


Figura 33. Representación gráfica de las concentraciones de AMPc detectadas mediante enzoinmunoensayo en linfocitos de individuos control (izquierda) y en linfocitos provenientes de pacientes con el SLN (derecha) en condiciones basales y tras estimulación con el activador de la AC forskolina.

Así, el porcentaje de aumento de AMPc tras estimulación con forskolina (% de AMPc basal) no fue significativamente diferente entre linfocitos control y de pacientes con LN (Aumento C-PBL:  $406\% \pm 280\%$ ; aumento LN-PBL:  $193\% \pm 165\%$ ;  $p= 0,1813$ ) (Fig. 34).

## RESULTADOS

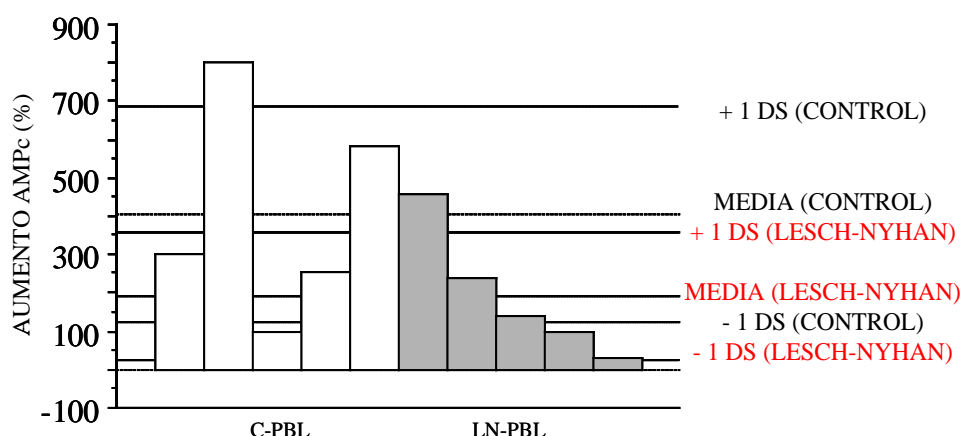


Figura 34. Aumento de AMPc en C-PBL y en LN-PBL tras estimulación con forskolina. El aumento está expresado en porcentaje respecto al AMPc cuantificado en condiciones basales.

### 4.2 ESTIMULACIÓN DE C-PBL y LN-PBL CON SKF 38393

Como se observa en la figura 40, la concentración de SKF 38393 a la que se obtuvo una estimulación máxima fue 0,1  $\mu\text{M}$ . El tiempo de incubación al que se obtuvo una estimulación máxima fue de 2 horas (Fig. 35).

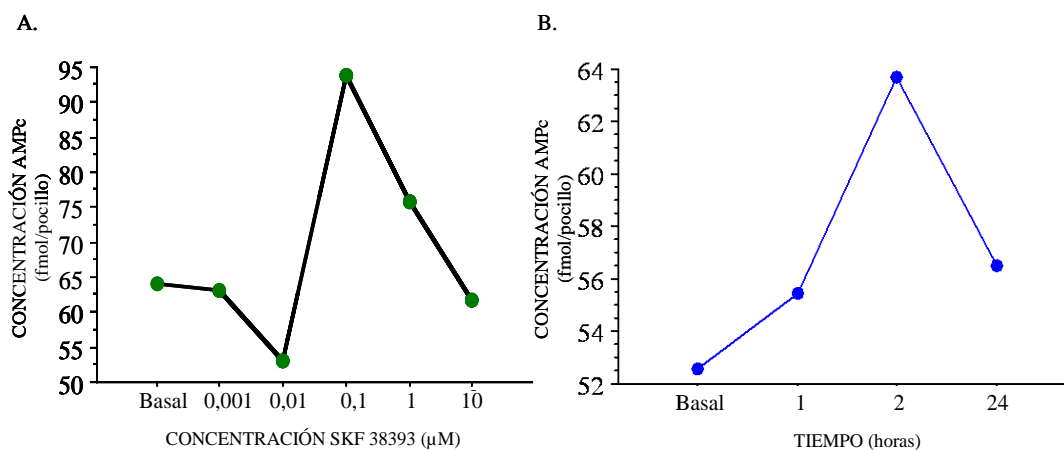


Figura 35. A. Determinación de la concentración de SKF 38393 y B. tiempo de incubación en los que se determinó la máxima concentración de AMPc.

La incubación de los linfocitos con el agonista de los receptores de dopamina tipo D<sub>1</sub> SKF 38393 0,1  $\mu\text{M}$  durante 2 horas, produjo un aumento significativo en la concentración de AMPc en el medio tanto en los procedentes de individuos control (C-PBL en condiciones

## RESULTADOS

basales y C-PBL estimulados: media  $\pm$  DS:  $43,966 \pm 6,85$  vs  $52,100 \pm 4,941$ ;  $p= 0,0044$ ) como entre los procedentes de pacientes con SLN (LN-PBL sin estimular y estimulados: media  $\pm$  DS:  $44,688 \pm 4,937$  vs  $46,296 \pm 4,459$ ;  $p= 0,04$ ) (Fig. 36).

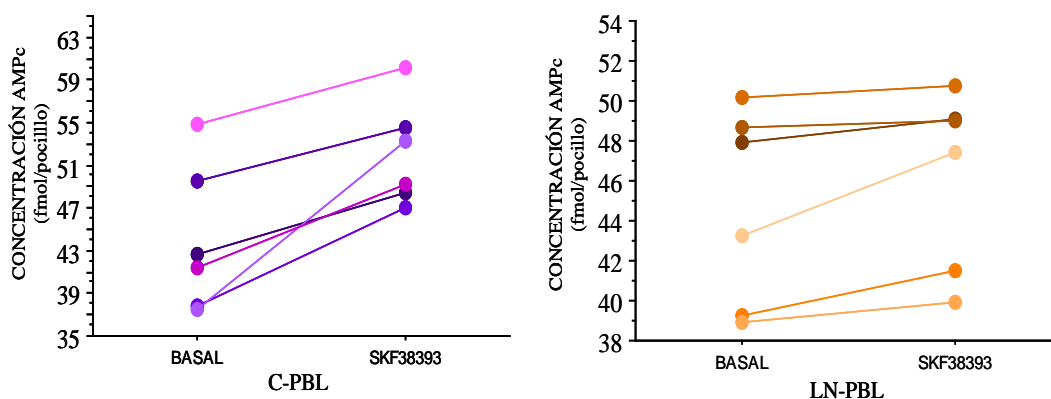


Figura 36. Representación gráfica de las concentraciones de AMPc detectadas mediante enzoinmunoensayo en linfocitos de individuos control (izquierda) y en linfocitos provenientes de pacientes con el SLN (derecha) en condiciones basales y tras estimulación con el agonista de los receptores tipo D<sub>1</sub> SKF 38393.

Sin embargo, el porcentaje de aumento de AMPc tras estimulación con SKF 38393 (% de AMPc basal) fue significativamente menor en los linfocitos de pacientes con LN que en los control, (media  $\pm$  DS:  $3,7\% \pm 3,4\%$ ; vs  $19,7\% \pm 12,1\%$ ;  $p= 0,01$ ; rango de tanto % a tanto% en control y LN) (Fig. 37).

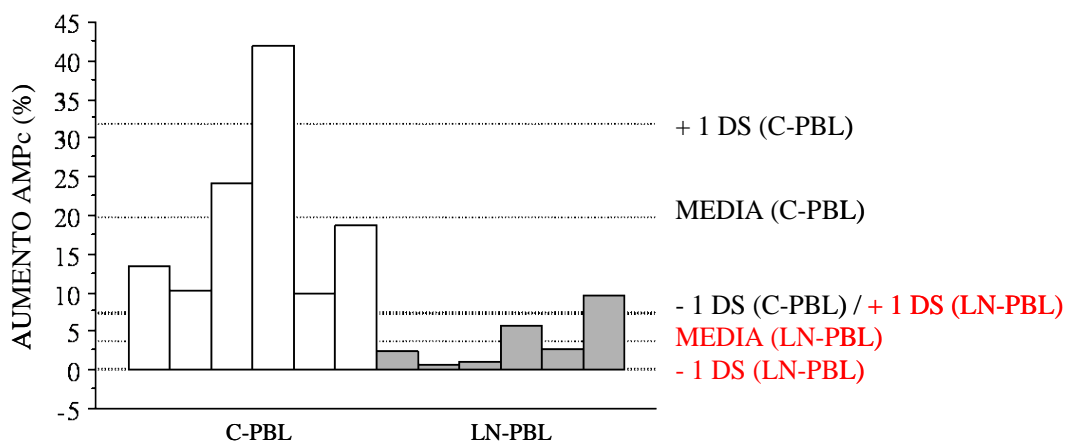


Figura 37. Aumento de AMPc en C-PBL y en LN-PBL tras estimulación con SKF 38393. El aumento está expresado en porcentaje respecto al AMPc cuantificado en condiciones basales.

## ***DISCUSIÓN***

En este trabajo hemos analizado la expresión de los receptores de adenosina (ADORA<sub>2A</sub> y ADORA<sub>2B</sub>), los receptores de dopamina (tipo 1 y tipo 2), el receptor de serotonina (5-HTR<sub>1A</sub>) y el transportador de dopamina (DAT) en linfocitos de sangre venosa periférica (PBL) procedentes de pacientes con SLN y de sujetos control. A su vez, se ha cuantificado la proteína de ADORA<sub>2A</sub>, de los receptores de dopamina DRD<sub>2</sub> y DRD<sub>5</sub> y del receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> en PBL procedentes de pacientes con SLN y de sujetos control.

La presencia y función de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> en los PBL está bien caracterizada, no obstante, no conocemos estudios previos en los que se haya cuantificado la expresión de estos receptores mediante “PCR a Tiempo Real”. La expresión del receptor A<sub>2A</sub> en PBL se ha detectado en estudios funcionales (acumulación de AMPc) y por citometría de flujo (Koshiba *et al.*, 1999). La expresión del receptor A<sub>2B</sub> en PBL se ha detectado mediante inmunohistoquímica (Mirabet *et al.*, 1999) y por ensayos de unión a radioligando (Gessi *et al.*, 2005). En este trabajo, hemos confirmado la presencia en PBL de ambos receptores, A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub>, mediante “PCR a Tiempo Real”.

La expresión de los receptores de dopamina en PBL se ha comprobado mediante citometría de flujo (McKeena *et al.*, 2002) y mediante “PCR a Tiempo Real” (Ostadali *et al.*, 2004; Kirillova *et al.*, 2008). Nosotros hemos detectado la expresión de todos los receptores tipo 2 (DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub> y DRD<sub>4</sub>) y la expresión del receptor DRD<sub>5</sub>, perteneciente a la familia de receptores de dopamina tipo 1 y la expresión del transportador DAT en PBL. Pese a ser detectable, el receptor DRD<sub>2</sub>, no pudo ser cuantificado debido a que se hallaba en el límite por debajo del cual la cuantificación no es significativa.

La existencia de receptores serotoninérgicos en los linfocitos fue demostrada por Eliseeva y Stefanovich en 1982 (Eliseeva y Stefanovich, 1982). La presencia de la mayoría de los receptores de serotonina en las células del sistema inmune se demostró principalmente mediante métodos farmacológicos.

Sólo la presencia de 5-HTR<sub>1A</sub> en células T (Aune *et al.*, 1993), y 5-HTR<sub>7</sub> en células B y del transportador de serotonina en las células B (Lesch *et al.*, 1996) fueron determinadas mediante Northern Blot o PCR.

En este trabajo se ha detectado la expresión, mediante “PCR a Tiempo Real”, de los receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> en PBL. La expresión de los receptores

5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> fue detectable pero no cuantificable mediante “PCR a Tiempo Real” y sólo pudimos analizar, tanto a nivel de expresión del ARNm como a nivel proteico, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en linfocitos procedentes de individuos sanos así como en linfocitos HPRT<sup>-</sup>.

Por tanto, los PBL poseen receptores de adenosina, dopamina, serotonina y transportador de dopamina y pueden servir de modelo para estudiar las alteraciones de estos neurotransmisores en células HPRT<sup>-</sup>.

Hemos analizado estos receptores en dos condiciones: basales y tras incubación durante 4 días. Los linfocitos HPRT<sup>-</sup> incubados durante 4 días tienen que sobrevivir en el medio de cultivo sin actividad HPRT y en ellos se pueden acumular ciertas sustancias o pueden ser deficitarias otras, lo que puede diferenciarles aún más de los linfocitos normales.

En condiciones basales hemos observado que los linfocitos HPRT<sup>-</sup> presentan una mayor expresión de receptores de dopamina DRD<sub>5</sub>, una alteración en la expresión de ADORA<sub>2A</sub> (García *et al.*, 2009) y un descenso significativo de la expresión de 5-HTR<sub>1A</sub>. Estas modificaciones de la expresión se correlacionan con los niveles proteicos determinados para cada receptor.

Respecto a los receptores de adenosina, en resumen, los cambios de expresión entre células normales y HPRT<sup>-</sup> son pequeños, aunque significativos. Bertelli y colaboradores, en 2006, examinaron la expresión de ADORA<sub>1</sub>, ADORA<sub>2A</sub> y ADORA<sub>2B</sub> en el cerebro de un modelo murino del SLN mediante “PCR a Tiempo Real” (Bertelli *et al.*, 2006) y encontraron que, en comparación con los ratones control, el ratón Hprt<sup>-</sup>, mostraba un incremento del 95% en la expresión del receptor ADORA<sub>1</sub> así como una disminución del 15% en la expresión del receptor ADORA<sub>2A</sub> no observando alteración alguna en la expresión del receptor ADORA<sub>2B</sub>.

Debido a que los receptores de adenosina A<sub>1</sub> no se expresan en linfocitos, no pudimos confirmar los resultados de estos autores pero nuestros resultados respecto a la expresión de ADORA<sub>2A</sub> confirmarían la expresión anormal del receptor descrita en el modelo animal ya que, el 67% (8/12) de los pacientes analizados presentaban una disminución en los niveles de receptor de un 39% respecto a los controles. Por otro lado, no hemos encontrado explicación a los niveles elevados de receptor encontrados en algunos de nuestros



pacientes. No encontramos diferencias ni clínicas, ni bioquímicas ni enzimáticas ni moleculares ni asociadas al tratamiento entre ambos grupos. Como comentaremos más adelante, esta disminución se confirmó en todos los pacientes tras incubar 4 días los linfocitos HPRT<sup>-</sup>.

En nuestro laboratorio, se ha descrito que la hipoxantina, a una concentración de 25  $\mu$ M, incrementaba los niveles de AMPc en los linfocitos (Torres *et al.*, 2004). En este trabajo no encontramos un efecto significativo de la incubación con hipoxantina en la expresión de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> de los linfocitos control. Por tanto, el incremento de los niveles de AMPc descritos podrían deberse al efecto de la hipoxantina en el transporte de adenosina lo que provocaría un incremento en los niveles extracelulares de adenosina, tal y como postulábamos en trabajos anteriores (Torres *et al.*, 2004).

El hecho de que la expresión del receptor DRD<sub>5</sub>, cuantificada por “PCR a Tiempo Real”, sea significativamente superior en los PBL de pacientes con el SLN que en los PBL procedentes de individuos control está en consonancia con el incremento en los receptores de dopamina demostrado mediante inmunohistoquímica en un estudio *post mortem* realizado en dos pacientes con el SLN en el que se analizaron el *putamen* y el núcleo caudado (Saito y Takashima, 2000). Este es el primer trabajo que apoya la hipótesis de la hipersensibilidad dopaminérgica en la deficiencia de HPRT usando células vivas procedentes de pacientes.

Ferrari y colaboradores describieron, en el año 2008, y mediante “PCR a Tiempo Real”, una expresión del receptor DRD<sub>5</sub> incrementada en PBL procedentes de pacientes con el síndrome de Tourette (Ferrari *et al.*, 2008) estando esta expresión correlacionada con la severidad del trastorno compulsivo. Este síndrome comparte varios síntomas con el trastorno obsesivo-compulsivo, el déficit de atención y la hiperactividad con los que está asociado (Carter *et al.*, 1994; Kurlan *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2001).

Estudios farmacológicos y de imagen apuntan a que alteraciones en los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos podrían tener un papel clave en la patogénesis del síndrome de Tourette (Albin y Mink, 2006). Por tanto, podríamos especular sobre una posible relación entre la sobreexpresión del receptor DRD<sub>5</sub> cuantificada en PBL y los trastornos obsesivo-compulsivo y de hiperactividad.

El principal mecanismo por el cual la dopamina se retira de las sinapsis es a través del transportador DAT. Debido a este hecho, se ha implicado a DAT en varias enfermedades tales como el déficit de atención y hiperactividad (Yang *et al.*, 2007), el trastorno bipolar (Greenwood *et al.*, 2001), la depresión (Laasonen-Balk *et al.*, 1999) y el alcoholismo (Ueno *et al.*, 1999). Aunque los estudios de imagen realizados mediante PET apuntan a una reducción en los niveles de transportador de dopamina en los pacientes con el SLN (Wong *et al.*, 1996), nosotros no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de DAT en C-PBL y LN-PBL. Debido a estos resultados tan contradictorios, sería necesario realizar estudios funcionales para confirmar o descartar una posible anomalía en este transportador.

En lo que se refiere a la expresión cuantificada para 5-HTR<sub>1A</sub>, nosotros hemos detectado una expresión significativamente disminuida en los linfocitos provenientes de pacientes con el SLN respecto a la expresión cuantificada en los linfocitos procedentes de individuos sanos en condiciones basales. 5-HTR<sub>1A</sub> no sólo contribuye a la modulación dinámica de la actividad serotoninérgica, estando implicado en funciones como la cognición y la emoción, además se cree que tiene un papel clave en la migración neuronal, el sobrecrecimiento de las neuritas y la formación de las sinapsis inherentes al proceso de neurodesarrollo (Savitz *et al.*, 2009).

Se ha implicado a este receptor con varias enfermedades psiquiátricas: estudios farmacológicos, *post-mortem*, de imagen y genéticos han relacionado la depresión con el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Savitz *et al.*, 2009). Sargent y colaboradores, en el año 2000, describieron una amplia reducción (corteza frontal, temporal y límbica) de la unión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> al antagonista [<sup>11</sup>C] WAY-100635 en pacientes con depresión (Sargent *et al.*, 2010).

Hirvonen y colaboradores llegaron a una conclusión similar, ya que describieron una reducción de entre 9 y 25 % de unión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> al antagonista en amplias regiones del cerebro en individuos con depresión (Hirvonen *et al.*, 2008).

En lo que se refiere a los modelos animales, el ratón *knockout* para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> muestra una reducción en el comportamiento exploratorio y un fenotipo de ansiedad (Heisler *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Olivier *et al.*, 2001; Klemenhagen *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha descrito, mediante “PCR a Tiempo Real”, una expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> anormal en linfocitos de sangre venosa periférica de pacientes con esquizofrenia ya que se cuantificó una sobreexpresión del receptor en hombres y una expresión disminuida en mujeres respecto a la expresión cuantificada en individuos control (Wang *et al.*, 2010).

La incubación de los PBL durante varios días ocasiona cambios en la expresión de los receptores, variables según el tipo de receptor, en las células control. Estos cambios se sitúan en un rango que oscila entre un descenso del 4 % del basal en la expresión de los receptores de serotonina tras 96 horas, hasta un incremento del 242 % del basal de los receptores de adenosina tras 96 horas. Los mecanismos de estos cambios en la expresión nos son desconocidos. Estudios realizados mediante técnicas de *microarray* tanto en células mesenquimales como en linfocitos T encuentran cambios significativos de la expresión génica con el tiempo de cultivo o número de subcultivos (Schallmoser *et al.*, 2010).

La mayoría de los genes cuya expresión está alterada se relacionan con la inducción de apoptosis y con vías de señalización reguladas por el factor de crecimiento transformante  $\beta$ , el factor de crecimiento epidérmico, fos y  $\beta$ -catenina, vías que se encuentran alteradas en las células que han permanecido más tiempo en cultivo. Estos cambios de expresión se relacionan con el establecimiento del fenotipo senescente. En concreto, Mazzatti y colaboradores encontraron un incremento mayor de 3 veces en la expresión del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> en linfocitos T asociado a un mayor tiempo de cultivo (Mazzatti *et al.*, 2007), dato que está en consonancia con nuestros resultados.

Sin embargo, tras 4 días de incubación, los linfocitos HPRT<sup>-</sup> presentan una expresión de los receptores de adenosina, serotonina y dopamina analizados completamente diferentes que las células control. Así, los PBL HPRT<sup>-</sup> presentan una mayor expresión de receptores de dopamina D<sub>5</sub> y una disminución en la expresión de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> lo que confirma los hallazgos encontrados en condiciones basales. Sin embargo presentan un incremento significativo de la expresión de 5-HTR<sub>1A</sub>.

En el caso de 5-HTR<sub>1A</sub>, éste se expresa alrededor de  $6 \cdot 10^5$  veces más tras 4 días de cultivo y el de dopamina DRD<sub>5</sub> unas  $7 \cdot 10^4$  veces más tras 4 días de cultivo. El descenso de expresión de los receptores de adenosina es de  $6 \cdot 10^7$  veces aproximadamente. Una de las

características bioquímicas más llamativas de las células HPRT<sup>-</sup> es que excretan al medio una gran cantidad de hipoxantina que no puede ser reutilizada y que es capaz de interferir con el transporte de adenosina y la función de sus receptores (Prior *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la expresión de los receptores de dopamina D<sub>5</sub> o D<sub>2</sub>, de adenosina A<sub>2A</sub> o de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> no se modifican por el exceso de hipoxantina en el medio en células HPRT<sup>+</sup>. Estos resultados se confirman a nivel proteico, no existiendo diferencias significativas en las cantidades de proteína de cada receptor entre los PBL incubados con o sin hipoxantina. Por tanto las diferencias de expresión de las células “senescentes” HPRT<sup>-</sup> respecto a las células control no parecen ser debidas al exceso de hipoxantina sino a otras alteraciones metabólicas ocasionadas por la deficiencia enzimática.

En linfocitos se ha descrito que la inhibición de 5-HTR<sub>1B</sub> conduce a la apoptosis celular mientras que los antagonistas de 5-HTR<sub>1A</sub> inhiben la proliferación celular (Yin *et al.*, 2006). Podemos suponer que los dramáticos cambios de expresión del receptor de serotonina en linfocitos HPRT<sup>-</sup> estén en relación con la lucha de células metabólicamente deficientes frente a la apoptosis. Serán necesarios más estudios para confirmar estas suposiciones.

Cuando cuantificamos la proteína mediante la técnica de Western Blot, encontramos correlación entre la proteína detectada para el receptor de dopamina D<sub>5</sub> en linfocitos procedentes de individuos sanos y linfocitos de pacientes con el SLN y la expresión del ARNm de dicho receptor. Por tanto, podemos concluir que el ARNm sintetizado como consecuencia de la sobreexpresión de este receptor anteriormente descrita es funcional y se traduce a proteína. También encontramos una correlación entre la cantidad de proteína determinada para ADORA<sub>2A</sub> y para 5-HTR<sub>1A</sub> en linfocitos procedentes de individuos sanos y en linfocitos provenientes de pacientes con el SLN y la expresión del ARNm obtenida para estos receptores mediante “PCR a Tiempo Real”. Por tanto, en condiciones basales la expresión alterada de dichos receptores descrita en los linfocitos provenientes de pacientes con el SLN con respecto a los linfocitos de individuos sanos se confirmaría a nivel proteico. Para DRD<sub>2</sub> no encontramos diferencias significativas entre la proteína cuantificada en los linfocitos provenientes de individuos sanos y los linfocitos de pacientes con el SLN.

En lo que se refiere a la determinación de proteína en extractos provenientes de linfocitos de sangre venosa periférica tanto de individuos control como de pacientes con el SLN cultivados durante 4 días, detectamos una disminución en la cantidad de proteína de ADORA<sub>2A</sub>, tanto en los C-PBL como en los LN-PBL, lo que estaría en consonancia con la disminución de la expresión del ARNm cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real”. En el caso de 5-HTR<sub>1A</sub>, la proteína reproduce el patrón de expresión, es decir, un aumento significativo del receptor en los extractos provenientes de linfocitos de pacientes con el SLN siendo el aumento cuantificado a nivel proteico muy inferior al determinado mediante “PCR a Tiempo Real”, por lo que gran parte del ARNm sintetizado no es traducido a proteína debido, probablemente, al gran coste energético que supondría para la célula. Sin embargo, en el caso de DRD<sub>5</sub>, no detectamos diferencias significativas entre la cantidad de proteína estimada en los extractos procedentes de individuos control y la proteína cuantificada en los extractos procedentes de linfocitos HPRT. Parece que la sobreexpresión del receptor no puede mantenerse a nivel proteico.

Nuestros resultados demuestran que, aunque la mayor parte de las veces los cambios de expresión se correlacionan con cambios en la cantidad de proteína, no siempre es así. Este hecho subraya la importancia de confirmar los cambios de expresión a nivel proteico.

Esta ausencia de correlación cantidad de proteína-nivel de ARNm ha sido descrita en varias ocasiones. En el año 2009, Molina-Arcas y colaboradores describieron una ausencia de correlación entre la cantidad de proteína, cuantificada mediante Western Blot, del transportador de nucleósidos hENT1 en células B de leucemia linfóide y la expresión de su ARNm, cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real”. También describieron una ausencia de correlación entre la cantidad de proteína determinada para este transportador y la funcionalidad del mismo (Molina-Arcas *et al.*, 2009). Estos datos indican la importancia de examinar la expresión, cantidad de proteína y función de la misma, tal y como hemos hecho en este trabajo, para alcanzar conclusiones fisiopatológicas.

La tabla 7 presenta un resumen de los hallazgos más relevantes en cuanto a los cambios de expresión y cantidad de proteína cuantificados en ADORA<sub>2A</sub>, de dopamina DRD<sub>5</sub> y de serotonina 5-HTR<sub>1A</sub> tanto en PBL procedentes de pacientes con SLN como en PBL procedentes de individuos control.

## DISCUSIÓN

Tabla 7. Resumen de los hallazgos más relevantes, en cuanto a los cambios de expresión y cantidad de proteína, cuantificados en ADORA<sub>2A</sub>, DRD<sub>5</sub> y HTR<sub>1A</sub> en PBL procedentes de pacientes con SLN y en PBL procedentes de individuos control.

<u>Receptor</u>	<u>Basal SLN vs. C</u>		<u>Cultivo 4 días SLN vs. C</u>		<u>Hipoxantina 25 µM</u>	
	<u>Expresión</u>	<u>Proteína</u>	<u>Expresión</u>	<u>Proteína</u>	<u>Expresión</u>	<u>Proteína</u>
<u>ADORA<sub>2A</sub></u>	↑ n=4 ↓ n=8	↑ n=1 ↓ n=3	↓↓	↓↓	=	=
<u>DRD<sub>5</sub></u>	↑	↑	↑↑	=	=	=
<u>5-HTR<sub>1A</sub></u>	↓	↓	↑↑	↑		

Desde el punto de vista funcional estudios previos realizados en nuestro laboratorio no habían encontrado alteraciones en los niveles de AMPc en respuesta a un agonista del receptor de adenosina (Torres *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo hemos detectado que, tras estimular con forskolina 1 mM a los linfocitos de sangre venosa de individuos control y de pacientes con el SLN, se produce, como era de esperar, un aumento de AMPc y este aumento de AMPc es menor, sin llegar a ser significativo, en el caso de los linfocitos procedentes de pacientes con el SLN.

Además, empleando el agonista específico para receptores de dopamina tipo D<sub>1</sub> SKF 38393 a una concentración de 0,1 µM detectamos diferencias significativas entre el aumento de AMPc producido en respuesta al agonista en los linfocitos provenientes de individuos sanos y el aumento de AMPc cuantificado en los linfocitos de pacientes con el SLN tras ser estimulados con el agonista SKF38393.

Estos resultados apoyarían la hipótesis de que, en los linfocitos procedentes de pacientes con el SLN, el receptor de dopamina D<sub>5</sub> está afectado a nivel funcional. Por tanto, es posible que la sobreexpresión cuantificada, así como el aumento en los niveles de proteína del receptor, se deban a un mecanismo compensatorio para intentar subsanar el mal funcionamiento de dicho receptor.

Como limitaciones de esta tesis doctoral, queremos señalar que el principal inconveniente de nuestro estudio a la hora de obtener conclusiones sobre la fisiopatología de las manifestaciones del SLN es el tipo de células empleado para cuantificar la expresión de los receptores de adenosina, dopamina, serotonina y del transportador de dopamina. Desafortunadamente, los modelos animales no reproducen las manifestaciones motoras y conductuales del SLN y no hay células procedentes de cerebro de pacientes con SLN disponibles. Aún así, y de acuerdo con la hipótesis del biomarcador periférico mencionada anteriormente, podríamos asumir que la expresión de estos receptores en PBL sería reflejo de la expresión de estos receptores en el cerebro. Hay varios resultados que apoyan esta hipótesis: En la enfermedad de Parkinson, se ha descrito una relación entre la gravedad de la enfermedad y la disminución de la expresión de DRD<sub>3</sub> en linfocitos de sangre venosa periférica (Nagai *et al.*, 1996). También en linfocitos de pacientes con Alzheimer, se ha observado una disminución en la expresión del receptor D<sub>3</sub>. Kirilova y colaboradores encontraron una correlación entre la expresión de los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> en linfocito periférico y en el cerebro (Kirillova *et al.*, 2008). Padín y colaboradores, en 2006, demostraron la hipótesis del biomarcador periférico en plaquetas de rata. En este trabajo, se estudió la regulación mediada por olanzapina tanto de 5-HTR<sub>2A</sub> como de DRD<sub>3</sub> en el sistema nervioso central de rata y en células sanguíneas después de tratarlas con esta sustancia en períodos de 24 y 48 horas y durante 16 días (Padín *et al.*, 2006). Este estudio demostró una regulación de ambos receptores paralela entre el sistema nervioso central y las células sanguíneas apoyando el uso de las células de la sangre como marcador periférico para el estudio de enfermedades mentales. También se han propuesto los linfocitos como marcadores serotoninérgicos para diagnóstico y farmacoterapia individualizada en la esquizofrenia (Wang *et al.*, 2010).

## DISCUSIÓN

---

En resumen, nuestros resultados confirman la hipótesis de que la patogenia de las alteraciones del síndrome de Lesch-Nyhan estaría relacionada con un desequilibrio de neurotransmisores, más que por la afectación aislada de uno solo. El acúmulo de hipoxantina, secundario a la deficiencia de HPRT, ocasionaría una disminución del transporte de adenosina, al competir con ella por sus transportadores. Esto a su vez ocasiona un aumento de la cantidad de adenosina que puede unirse al receptor lo que promueve una disminución de la expresión de los receptores de adenosina. La alteración en el receptor de adenosina, asociado a los receptores de dopamina y serotonina, modificaría la expresión y función de estos receptores ocasionando una hipersensibilidad de los receptores de dopamina y un descenso en el número de receptores de serotonina. Todo ello contribuiría a las alteraciones motoras y del comportamiento en los pacientes con el SLN.



## ***CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

---

1. Los PBL poseen receptores de adenosina (ADORA<sub>2A</sub>, ADORA<sub>2B</sub>), dopamina (DRD<sub>2</sub>, DRD<sub>3</sub>, DRD<sub>4</sub> y DRD<sub>5</sub>), serotonina (5-HTR<sub>1A</sub>, 5-HTR<sub>2C</sub> y 5-HTR<sub>1B</sub>) y transportador de dopamina, que pueden servir de modelo para estudiar las alteraciones de estos neurotransmisores en células HPRT<sup>-</sup>.

2. La expresión de DRD<sub>5</sub>, cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real” está incrementada en los linfocitos de pacientes con SLN respecto a linfocitos procedentes de individuos control (García *et al.*, 2009) en condiciones basales. Esta sobreexpresión se confirma e incrementa tras 4 días de cultivo. Este es el primer trabajo que apoya la hipótesis de la hipersensibilidad dopaminérgica en la deficiencia de HPRT usando células vivas procedentes de pacientes.

3. En los linfocitos HPRT<sup>-</sup>, en condiciones basales, cuantificamos una expresión de ADORA<sub>2A</sub> descendida en 8 de 12 pacientes (67%) e incrementada en el resto (4/12) respecto a la expresión cuantificada en los linfocitos procedentes de individuos control (García *et al.*, 2009). Tras 4 días de cultivo, la expresión está significativamente descendida en todos los pacientes.

4. La expresión de 5-HTR<sub>1A</sub>, cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real”, se halló significativamente disminuida en los linfocitos procedentes de pacientes con el SLN respecto a linfocitos procedentes de individuos control en condiciones basales.

5. La expresión de 5-HTR<sub>1A</sub>, cuantificada mediante “PCR a Tiempo Real”, presenta un incremento significativo en los linfocitos procedentes de pacientes con SLN respecto a linfocitos procedentes de individuos control tras incubación durante 4 días. Este incremento podría estar en relación con la lucha de unas células metabólicamente deficientes frente a la apoptosis, aunque serán necesarios más estudios para confirmar estas suposiciones.

6. La expresión de los receptores de dopamina D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub>, del transportador de dopamina DAT, y de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> no se modifica por el exceso de hipoxantina en el medio en células HPRT<sup>+</sup>.

## CONCLUSIONES

---

7. En células control, el cultivo de los PBL durante varios días ocasiona cambios en la expresión de los receptores, variables según el tipo de receptor.

8. En condiciones basales, los cambios de expresión para los receptores de dopamina D<sub>5</sub>, de adenosina A<sub>2A</sub> y de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, detectados mediante “PCR a Tiempo Real”, entre los extractos de linfocitos procedentes de individuos sanos y HPRT<sup>-</sup> se confirman mediante la cuantificación de proteína por la técnica de Western Blot.

9. Tras 4 días de cultivo, el descenso de expresión de los receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, en PBL procedentes de pacientes con SLN frente a PBL control, se confirma mediante la cuantificación de proteína por la técnica de Western Blot.

10. Tras 4 días de cultivo se produce un aumento en la cantidad de proteína de 5-HTR<sub>1A</sub> en linfocitos HPRT<sup>-</sup>, cuantificado por la técnica de Western Blot, muy inferior al aumento de expresión determinado mediante “PCR a Tiempo Real”.

11. Tras 4 días de cultivo, los niveles de proteína cuantificados para DRD<sub>5</sub> en linfocitos HPRT<sup>-</sup> no reproducen el incremento hallado en la expresión del receptor determinado mediante “PCR a Tiempo Real”.

12. DRD<sub>5</sub>, en los linfocitos procedentes de pacientes con el SLN, está afectado a nivel funcional. La sobreexpresión cuantificada así como el aumento en los niveles de proteína del receptor podrían estar en relación con un mecanismo compensatorio para intentar contrarrestar el mal funcionamiento de dicho receptor.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

ÁLAVA MA, DEBELL KE, CONTI A, HOFFMAN T, BONVINI E. 1992. Increased intracellular cyclic AMP inhibits inositol phospholipid hydrolysis induced by perturbation of the T cell receptor/CD3 complex but not by G-protein stimulation. Association with protein kinase A-mediated phosphorylation of phospholipase C-gamma 1. *Biochem J*, 284, 189-99.

ALBIN RL, MINK JW. 2006. Recent advances in Tourette syndrome research. *Trends Neurosci*, 29, 175-82.

AL-KHALIDI UA, CHAGLIASSIAN TH. 1965. The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem J*, 97, 318-20.

ARAL B, DE SAINT BASILE G, AL-GARAWI S, KAMOUN P, CEBALLOS-PICOT I. 1996. Novel nonsense mutation in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene and nonrandom X-inactivation causing Lesch-Nyhan syndrome in a female patient. *Hum Mutat*, 7, 52-8.

ARCH JR, NEWSHOLME EA. 1978. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem. J*, 174, 965-77.

ARHAKIS A, TOPOUZELIS N, KOTSIOMITI E, KOTSANOS N. 2010. Effective treatment of self-injurious oral trauma in Lesch-Nyhan syndrome: a case report. *Dent Traumatol*, 26, 496-500.

AUNE TM, MCGRATH KM, SARR T, BOMBARA MP, KELLEY KA. 1993. Expression of 5HT<sub>1A</sub> receptors on activated human T cells. Regulation of cyclic AMP levels and T cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. *J Immunol*, 151, 1175-83.

AZMITIA EC, SEGAL M. 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 179, 641-67.

BAVARESCO CS, CHIARANI F, MATTÉ C, WAJNER M, NETTO CA, DE SOUZA WYSE AT. 2005. Effect of hypoxanthine on Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase activity and some parameters of oxidative stress in rat striatum. *Brain Res*, 1041, 198-204.

BAVARESCO CS, CHIARANI F, DURINGON E, FERRO MM, CUNHA CD, NETTO CA, WYSE AT. 2007. Intra-striatal injection of hypoxanthine reduces striatal serotonin content and impairs spatial memory performance in rats. *Metab Brain Dis* 22, 67-76.

BECKER MA, KIM M. 1987. Regulation of purine synthesis de novo in human fibroblasts by purine nucleotides and phosphoribosylpyrophosphate. *J Biol Chem*, 262, 14531-37.

BERTELLI M, CECCHIN S, LAPUCCI C, JACOMELLI G, JINNAH HA, PANDOLFO M, MICHELI V. 2006. Study of the adenosinergic system in the brain of HPRT *knockout* mouse (Lesch-Nyhan disease). *Clin Chim Acta*, 373, 104-07.

BESSER MJ, GANOR Y, LEVITE M. 2005. Dopamine by itself activates either D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> or D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both. *J Neuroimmunol*, 169, 161-71.

BLAKELY RD. 2001. Neurobiology Dopamine's reversal of fortune. *Science*, 293, 2407-09.

BOYLE JA, RAIVIO KO, ASTRIN KH, SCHULMAN JD, GRAF ML, SEEGMILLER JE, JACOBSEN CB. (1970). Lesch-Nyhan syndrome: preventive control by prenatal diagnosis. *Science*, 169, 688-89.

BOYUM 1964. Separation of white blood cells. *Nature*, 204, 793-94.

BRADFORD M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Bioch*, 72, 1-2.

BREESE GR, CRISWELL HE, DUNCAN GE, MUELLER RA. 1990. A dopamine deficiency model of Lesch-Nyhan disease--the neonatal-6-OHDA-lesioned rat. *Brain Res. Bull*, 25, 477-84.

BROSH S, BOER P, KUPFER B, DE VRIES A, SPERLING O. 1976. *De novo* synthesis of purine nucleotides in human peripheral blood leukocytes Excessive activity of the pathway in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Clin Invest*, 58, 289-97.

BURNSTOCK G. 2009. Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res*, 42, 3-8.

BUSTIN SA, NOLAN T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 15, 155-66. Revisión.

CARTER AS, PAULS DL, LECKMAN JF, COHEN DJ. 1994. A prospective longitudinal study of Gilles de la Tourette's syndrome. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 33, pp. 377-85.

CASTELLS S, CHAKRABARTI C, WINSBERG BG, HURWIC M, PEREL JM, NYHAN WL. 1979. Effects of L-5-hydroxytryptophan on monoamine and amino acids turnover in the Lesch-Nyhan syndrome. *J Autism Dev Disord*, 9, 95-103.

CEBALLOS-PICOT I, MOCKEL L, POTIER MC, DAUPHINOT L, SHIRLEY TL, TORERO-IBAD R, FUCHS J, JINNAH HA. 2009. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 18, 2317-27.

CHRISTIE R, BAY C, KAUFMAN IA, BAKAY B, BORDEN M, NYHAN WL. 1982. Lesch-Nyhan disease: clinical experience with nineteen patients. *Dev Med Child Neurol*, 24, 293-306.

COCCARO EF. 1989. Central serotonin and impulsive aggression. *Br J Psychiatry Suppl*, 8, 52-62.

COOK EH JR, CHARAK DA, ARIDA J, SPOHN JA, ROIZEN NJ, LEVENTHAL BL. 1994. Depressive and obsessive-compulsive symptoms in hyperserotonemic parents of children with autistic disorder. *Psychiatry Res*, 52, 25-33.

CRISTINI S, NAVONE S, CANZI L, ACERBI F, CIUSANI E, HLADNIK U, DE GEMMIS P, ALESSANDRI G, COLOMBO A, PARATI E, INVERNICI G 2010. Human neural stem cells: a model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects. *Hum Mol Genet*, 19, 1939-50.

CRISWELL H, MUELLER RA, BREESE GR. 1998. Assessment of purine-dopamine interactions in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: evidence for pre- and postsynaptic influences by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther*, 244, 493-500.

CUNHA RA, FERRÉ S, VAUGEOIS JM, CHEN JF. 2008. Potential therapeutic interest of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des* 14, 1512-24.

CURTO R, VOIT EO, SORRIBAS A, CASCANTE M. 1998. Mathematical models of purine metabolism in man. *Math Biosci*, 151, 1-49.

DAW ND, KAKADE S, DAYAN P. 2002. Opponent interactions between serotonin and dopamine. *Neural Netw*, 15, 603-16.

DI CHIARA G, CAMBA R, SPANO PF. 1971. Evidence for inhibition by brain serotonin of mouse killing behaviour in rats. *Nature*, 233, 272-3.

DI GIOVANNI G, ESPOSITO E, DI MATTEO V. 2010. Role of serotonin in central dopamine dysfunction. *CNS Neurosci Ther*, 16, 179-94.

DE GREGORIO L, NYHAN WL, SERAFIN E, CHAMOLES NA. 2000. An unexpected affected female patient in a classical Lesch-Nyhan family. *Mol Genet Metab*, 69, 263-68.

DE GREGORIO L, JINNAH HA, HARRIS JC, NYHAN WL, SCHRETLEN DJ, TROMBLEY LM, O'NEILL JP. 2005. Lesch-Nyhan disease in a female with a clinically normal monozygotic twin. *Mol Genet Metab*, 85, 70-7.

EDWARDS NL, PUIG JG, MATEOS FA. 1986. The effect of allopurinol on cerebral spinal fluid (CSF) purines in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency syndromes. *Adv Exp Med Biol*, 195, 465-69.

ELISEEVA LS, STEFANOVICH LE. 1982. Specific binding of serotonin by blood leukocytes and peritoneal cells in the mouse. *Biokhimiia*, 47, 810-13

EMMERSON BT, THOMPSON L. 1973. The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Q J Med* 42, 423-40.

ENGLE SJ, WOMER DE, DAVIES PM, BOIVIN G, SAHOTA A, SIMMONDS HA, STAMBROOK PJ, TISCHFIELD JA. 1996. HPRT-APRT-deficient mice are not a model for lesch-nyhan syndrome. *Hum Mol Genet* 5, 1607-10.

ERNST M, ZAMETKIN AJ, MATOCHIK JA, PASCUALVACA D, JONS PH, HARDY K, HANKERSON JG, DOUDET DJ, COHEN RM. 1996. Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch-Nyhan disease. *N Engl J Med*, 334, 1568-72.

ERNST PB, GARRISON JC, THOMPSON LF. 2010. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol*, 185, 1993-98. Revisión.

FAHN S, COHEN G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*, 32, 804-12.

FAIRBANKS LD, JACOMELLI G, MICHELI V, SLADE T, SIMMONDS HA. 2002. Severe pyridine nucleotide depletion in fibroblasts from Lesch-Nyhan patients. *Biochem J*, 15, 265-72.

FEDELE DE, LI T, LAN JQ, FREDHOLM BB, BOISON D. 2006. Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol*, 200, 184-90.

FERRARI M, TERMINE C, FRANCIOTTA D, CASTIGLIONI E, PAGANI A, LANZI G, MARINO F, LECCHINI S, COSENTINO M, BALOTTIN U. 2008. Dopaminergic receptor D5 mRNA expression is increased in circulating lymphocytes of Tourette syndrome patients. *J Psychiatr Res*, 43, 24-9.



FERRÉ S, CORTÉS R, ARTIGAS F. 1994. Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats. *J Neurosci*, 14, 4839-46.

FERRER I, COSTELL M, GRISOLÍA S. 1982. Lesch-Nyhan syndrome-like behavior in rats from caffeine ingestion: changes in HGPRTase activity, urea and some nitrogen metabolism enzymes. *FEBS Lett*, 141, 275-78.

FINGER S, HEAVENS RP, SIRINATHSINGHJI DJ, KUEHN MR, DUNNETT SB. 1988. Behavioral and neurochemical evaluation of a transgenic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *J Neurol Sci*, 86, 203-13.

FRANCO R, FERRÉ S, AGNATI L, TORVINEN M, GINÉS S, HILLION J, CASADÓ V, LLEDÓ P, ZOLI M, LLUIS C, FUXE K. 2000. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*, 23, 50-9.

FREDHOLM BB, ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G, DALY JW, HARDEN TK, JACOBSON KA, LEFF P, WILLIAMS M. 1994. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*, 46, 143-56.

FREDHOLM BB, ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G, DUBYAK GR, HARDEN TK, JACOBSON KA, SCHWABE U, WILLIAMS M. 1997. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18, 79-82.

FREDHOLM BB, CHEN JF, CUNHA RA, SVENNINGSSON P, VAUGEOIS JM. 2005. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 63, 191-270.

FUXÉ K, UNGERSTEDT U. 1974. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med Biol*, 52, 48-54.

FUXÉ K, FERRÉ S, ZOLI M, AGNATI LF. 1998. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Rev*, 26, 258-73.

GAINETDINOV RR, JONES SR, CARON MG. 1999. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol Psychiatry*, 46, 303-11.

GARCÍA MG, PUIG JG, TORRES RJ. 2009. Abnormal adenosine and dopamine receptor expression in lymphocytes of Lesch-Nyhan patients. *Brain Behav Immun*, 23, 1125-31.

CESSI S, VARANI K, MERIGHI S, CATTABRIGA E, PANCALDI C, SZABADKAI Y, RIZZUTO R, KLOTZ KN, LEUNG E, MAC LENNAN S, BARALDI PG, BOREA PA. 2005. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A<sub>2B</sub> receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [3H] MRE 2029-F20. *Mol Pharmacol*, 67, 2137-47.

GINGRICH JA, CARON MG. 1993. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci*, 16, 299-321. Revisión.

GIROS B, JABER M, JONES SR, WIGHTMAN RM, CARON MG. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, 379, 606-12.

GOLDSTEIN M, ANDERSON LT, REUBEN R, DANCIS J. 1985. Self-mutilation in Lesch-Nyhan disease is caused by dopaminergic denervation. *Lancet*, 1, 338-39.

GOLDSTEIN M, KUGA S, SHIMIZU Y, MELLER E. 1986. The pathophysiological functions mediated by D<sub>1</sub> dopamine receptors. *Adv Exp Med Biol*, 204, 189-95.

GREENWOOD TA, ALEXANDER M, KECK PE, MCELROY S, SADOVNICK AD, REMICK RA, KELSOE JR. 2001. Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet*, 105, 145-51.

GUIBINGA GH, HSU S, FRIEDMANN T. 2010. Deficiency of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dysregulates neurogenesis. *Mol Ther*, 18, 54-62.

HARRIS JC. 2010. Advances in understanding behavioral phenotypes in neurogenetic syndromes. *Am J Med Genet*, 154, 389-99.

HAUSER RA, SCHWARZSCHILD MA. 2005. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists for Parkinson's disease: rationale, therapeutic potential and clinical experience. *Drugs Aging*, 22, 471-82.

HEISLER LK, CHU HM, BRENNAN TJ, DANA O JA, BAJWA P, PARSONS LH, TECOTT LH. 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 15049-54.

HILLION J, CANALS M, TORVINEN M, CASADO V, SCOTT R, TERASMAA A, HANSSON A, WATSON S, OLAH ME, MALLOL J, CANELA EI, ZOLI M, AGNATI LF, IBANEZ CF, LLUIS C, FRANCO R, FERRE S, FUXE K. 2002. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *J Biol Chem*, 277, 18091-97.

HIRVONEN J, KARLSSON H, KAJANDER J, LEPOLA A, MARKKULA J, RASHAKALA H, NÅGREN K, SALMINEN JK, HIETALA J. 2008. Decreased brain serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor availability in medication-naive patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [carbonyl-11C] WAY-100635. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11, 465-76.

HOOPER M, HARDY K, HANDYSIDE A, HUNTER S, MONK M. 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 326, 292-5.

HOYER D, CLARKE DE, FOZARD JR, HARTIG PR, MARTIN GR, MYLECHARANE EJ, SAXENA PR, HUMPHREY PP. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, 46, 157-203.

HUSSAIN SP, DULEY JA, CONNOLLY GP. 1999. Purine and pyrimidine levels in cultured skin fibroblasts from control and Lesch-Nyhan patients. *Cell Mol Biol*, 4, 377-378.

JANKOVIC J, CASKEY TC, STOUT JT, BUTLER IJ. 1988. Lesch-Nyhan syndrome: a study of motor behavior and cerebrospinal fluid neurotransmitters. *Ann Neurol*, 23, 466-69.

JINNAH HA, WOJCIK BE, HUNT M, NARANG N, LEE KY, GOLDSTEIN M, WAMSLEY JK, LANGLAIS PJ, FRIEDMANN T. 1994. Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *J Neurosci* 14, 1164-75.

JINNAH HA, FRIEDMANN T. 2001. Lesch-Nyhan disease and its variants. En: Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AL, et al., (Eds.). *The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease*. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill. pp. 2537-70.

JINNAH HA, CEBALLOS-PICOT I, TORRES RJ, VISSER JE, SCHRETLEN DJ, VERDU A, LARÓVERE LE, CHEN CJ, COSSU A, WU CH, SAMPAT R, CHANG SJ, DE KREMER RD, NYHAN W, HARRIS JC, REICH SG, PUIG JG, LESCH-NYHAN DISEASE INTERNATIONAL STUDY GROUP. 2010. Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Brain*, 133, 671-89.

JOHNSON GG, EISENBERG LR, MIGEON BR. 1979. Human and mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: dimers and tetramers. *Science*, 203, 174-76.

- KEBABIAN JW, CALNE DB. 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93-6.
- KELLEY WN, GREENE ML, ROSENBLOOM FM, HENDERSON JF, SEEGMILLER JE. 1969. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in gout. *Ann Intern Med*, 70, 155-206.
- KIRILLOVA GP, HRUTKAY RJ, SHURIN MR, SHURIN GV, TOURKOVA IL, VANYUKOV MM. 2008. Dopamine receptors in human lymphocytes: radioligand binding and quantitative RT-PCR assays. *J Neurosci Methods* 174, 272-80.
- KISH SJ, FOX IH, KAPUR BM, LLOYD K, HORNYKIEWICZ O. 1985. Brain benzodiazepine receptor binding and purine concentration in Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Res*, 336, 117-23.
- KLEMENHAGEN KC, GORDON JA, DAVID DJ, HEN R, GROSS CT. 2006. Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. *Neuropsychopharmacology*, 31, 101-11.
- KOSHIBA M, ROSIN DL, HAYASHI N, LINDEN J, SITKOVSKY MV. 1999. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Mol Pharmacol* 55, 614-24.
- KOSTRZEWA RM, READER TA, DESCARRIES L. 1998. Serotonin neural adaptations to ontogenetic loss of dopamine neurons in rat brain. *J Neurochem*, 70, 889-98.
- KUEHN MR, BRADLEY A, ROBERTSON EJ, EVANS MJ. 1987. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 326, 295-98.
- KURLAN R, COMO PG, MILLER B, PALUMBO D, DEELEY C, ANDRESEN EM, EAPEN S, MCDERMOTT MP. 2002. The behavioral spectrum of tic disorders: a community-based study. *Neurology*, 59, 414-20.
- KWAK YT, KOO MS, CHOI CH, SUNWOO I. 2001. Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients. *BMC Med Genet*, 2, 3.
- LAASONEN-BALK T, KUIKKA J, VIINAMÄKI H, HUSSO-SAASTAMOINEN M, LEHTONEN J, TIIHONEN J. 1999. Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacology*, 144, 282-85.

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15, 680-85.

LANDOLT HP. 2008. Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans?. *Biochem Pharmacol*, 75, 2070-79.

LARA DR, DALL'IGNA OP, GHISOLFI ES, BRUNSTEIN MG. 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30, 617-29.

LEDENT C, VAUGEOIS JM, SCHIFFMANN SN, PEDRAZZINI T, EL YACOUBI M, VANDERHAEGHEN JJ, COSTENTIN J, HEATH JK, VASSART G, PARMENTIER M. 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Nature*, 388, 674-78.

LESCH KP, BENDEL D, HEILS A, SABOL SZ, GREENBERG BD, PETRI S, BENJAMIN J, MÜLLER CR, HAMER DH, MURPHY DL. 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274, 1527-31.

LESCH M, NYHAN WL. 1964. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med*, 36, 561-70.

LEVITE M. 2001. Nervous immunity: neurotransmitters, extracellular K<sup>+</sup> and T-cell function. *Trends Immunol*, 22, 2-5.

LEVITE M. 2008. Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 460-71.

LLOYD KG, HORNYKIEWICZ O, DAVIDSON L, SHANNAK K, FARLEY I, GOLDSTEIN M, SHIBUYA M, KELLEY WN, FOX IH. 1981. Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome. *N Eng J Med*, 305, 1106-11.

LÓPEZ JM. 2008. Is ZMP the toxic metabolite in Lesch-Nyhan disease?. *Med Hypotheses*, 71,657-63.

ŁUKASIEWICZ S, BŁASIAK E, FARON-GÓRECKA A, POLIT A, TWORZYDŁO M, GÓRECKI A, WASYLEWSKI Z, DZIEDZICKA-WASYLEWSKA M. 2007. Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A<sub>2A</sub> and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol Rep*, 59, 379-92.

LUKASIEWICZ S, POLIT A, KĘDRACKA-KROK S, WĘDZONY K, MAĆKOWIAK M, DZIEDZICKA-WASYLEWSKA M. 2010. Hetero-dimerization of serotonin 5-HT(2A) and dopamine D(2) receptors. *Biochim Biophys Acta* 1803, 1347-58.

LUTHMAN J, FREDRIKSSON A, SUNDSTRÖM E, JONSSON G, ARCHER T. 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res*, 33, 267-77.

MAZZATTI DJ, WHITE A, FORSEY RJ, POWELL JR, PAWELEC G. 2007. Gene expression changes in long-term culture of T-cell clones: genomic effects of chronic antigenic stress in aging and immunosenescence. *Aging Cell*, 6, 155-63.

MCCREANOR GM, HARKNESS RA. 1995. Lesch-Nyhan syndrome and its pathogenesis: normal nicotinamide-adenine dinucleotide but reduced ATP concentrations that correlate with reduced poly (ADP-ribose) synthetase activity in HPRT-deficient lymphoblasts. *J Inherit Metab Dis*, 18, 737-47.

MCKENNA F, MCLAUGHLIN PJ, LEWIS BJ, SIBBRING GC, CUMMERSON JA, BOWEN-JONES D, MOOTS RJ. 2002. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol*, 132, 34-40.

MESSINA E, MICHELI V, GIACOMELLO A. 2005. Guanine nucleotide depletion induces differentiation and aberrant neurite outgrowth in human dopaminergic neuroblastoma lines: a model for basal ganglia dysfunction in Lesch-Nyhan disease. *Neurosci Lett*, 375, 97-100.

MIRABET M, HERRERA C, CORDERO OJ, MALLOL J, LLUIS C, FRANCO R. 1999. Expression of A<sub>2B</sub> adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation. *J Cell Sci* 112, 491-502.

MITCHELL IJ, COOPER AJ, GRIFFITHS MR. 1999. The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Prog Neurobiol*, 59, 691-719. Revisión.

MIZUNO T. 1986. Long-term follow-up of ten patients with Lesch-Nyhan syndrome. *Neuropediatrics*, 17, 158-61.

MOLINA-ARCAS M, CASADO FJ, PASTOR-ANGLADA M. 2009. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* 7, 426-34. Revisión.

MOUKHLES H, BOSLER O, BOLAM JP, VALLÉE A, UMBRIACO D, GEFFARD M, DOUCET G. 1997. Quantitative and morphometric data indicate precise cellular

interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience*, 76, 1159-71.

NAGAI Y, UENO S, SAEKI Y, SOGA F, HIRANO M, YANAGIHARA T. 1996. Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 46, 791-95.

NAVARRO JF, ROMERO C, MALDONADO E. 2000. Effects of N6-cyclohexyl adenosine (cha) on isolation-induced aggression in male mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 22, 43-6.

NYHAN WL. 1976. Behavior in the Lesch--Nyhan syndrome. *J Autism Child Schizophr*, 6, 235-52.

NYHAN WL. 2000. Dopamine function in Lesch-Nyhan disease. *Environ. Health Perspect* 108, 409-11. Revisión.

NYHAN WL. 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol Genet Metab*, 86, 25-33.

OGASAWARA N, STOUT JT, GOTO H, SONTA S, MATSUMOTO A, CASKEY CT. (1989). Molecular analysis of a female Lesch-Nyhan patient. *J Clin Invest*, 84, 1024-27.

OKADA M, NUTT DJ, MURAKAMI T, ZHU G, KAMATA A, KAWATA Y, KANEKO S. 2001. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci*, 21, 628-40.

OLIVIER B, PATTIJ T, WOOD SJ, OOSTING R, SARNYAI Z, TOTTH M. 2001. The 5-HT(1A) receptor knockout mouse and anxiety. *Behav Pharmacol*, 12, 439-50. Revisión.

OSTADALI MR, AHANGARI G, ESLAMI MB, RAZAVI A, ZARRINDAST MR, AHMADKHANIHA HR, BOULHARI J. 2004. The Detection of Dopamine Gene Receptors (DRD<sub>1</sub>-DRD<sub>5</sub>) Expression on Human Peripheral Blood Lymphocytes by Real Time PCR. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 3, 169-74.

PADÍN JF, RODRÍGUEZ MA, DOMÍNGUEZ E, DOPESO-REYES IG, BUCETA M, CANO E, SOTELO E, BREA J, CARUNCHO HJ, ISABEL CADAVID M, CASTRO M, ISABEL LOZA M. 2006. Parallel regulation by olanzapine of the patterns of expression of 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>3</sub> receptors in rat central nervous system and blood cells. *Neuropharmacology*, 51, 923-32.

PATEL PI, NUSSBAUM RL, GRAMSON PE, LEDBETTER DH, CASKEY CT, CHINAULT AC. 1984. Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome. *Somat Cell Mol Genet*, 10, 483-93.

PFAFFL MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, 45.

PINTO CS, JINNAH HA, SHIRLEY TL, NYHAN WL, SEIFERT R. 2005. Altered membrane NTPase activity in Lesch-Nyhan disease fibroblasts: comparison with HPRT knockout mice and HPRT-deficient cell lines. *J Neurochem* 93, 1579-86.

POPOLI P, BLUM D, MARTIRE A, LEDENT C, CERUTI S, ABBRACCHIO MP. 2007. Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol*, 81, 331-48.

PRIOR C, TORRES RJ, PUIG JG. 2007. Hypoxanthine decreases equilibrative type of adenosine transport in lymphocytes from Lesch-Nyhan patients. *Eur J Clin Invest*, 37, 905-11.

PUIG JG, TORRES RJ, MATEOS FA, RAMOS TH, ARCAS JM, BUÑO AS, O'NEILL P. 2001. The spectrum of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency Clinical experience based on 22 patients from 18 Spanish families. *Medicine*, 80, 102-12.

PULL I, MCILWAIN H. 1972. Adenine derivatives as neurohumoral agents in the brain The quantities liberated on excitation of superfused cerebral tissues. *Biochem J*, 130, 975-81.

RAMBOZ S, OOSTING R, AMARA DA, KUNG HF, BLIER P, MENDELSON M, MANN JJ, BRUNNER D, HEN R. 1998. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci*, 95, 14476-81.

RASMUSSEN R. 2001. Quantification on the LightCycler. En Meuer, S, Wittwer, C y Nakagawara, K (eds), *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, pp. 21-34.

RICHTER A, HAMANN M. 2001. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists in a genetic animal model of primary paroxysmal dystonia. *Br J Pharmacol*, 134, 343-52.

RINAT C, ZOREF-SHANI E, BEN-NERIAH Z, BROMBERG Y, BECKER-COHEN R, FEINSTEIN S, SPERLING O, FRISHBERG Y. 2006. Molecular, biochemical, and



genetic characterization of a female patient with Lesch-Nyhan disease. *Mol Genet Metab*, 87, 249-52.

ROSENBLOOM FM, HENDERSON JF, KELLY WN, SEEGMILLER JE. 1968. Accelerated purine biosynthesis de novo in skin fibroblasts deficient in hypoxanthine--guanine phosphoribosyltransferase activity. *Biochim Biophys Acta* 166, 258-60.

SAITO Y, ITO M, HANAOKA S, OHAMA E, AKABOSHI S, TAKASHIMA S. 1999. Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a postmortem study. *Neuropediatrics*, 30, 66-71.

SAITO Y, TAKASHIMA S. 2000. Neurotransmitter changes in the pathophysiology of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Dev*, 22, 122-31. Revisión.

SALIM H, FERRÉ S, DALAL A, PETERFREUND RA, FUXE K, VINCENT JD, LLEDO PM. 2000. Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D<sub>2</sub> receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 74, 432-39.

SAMANIN R, GARATTINI S. 1975. The serotonergic system in the brain and its possible functional connections with other aminergic systems. *Life Sci*. 17, 1201-19.

SAMII A, NUTT JG, RANSOM BR. 2004. Parkinson's disease. *Lancet*, 363, 1783-93.

SARGENT PA, RABINER EA, BHAGWAGAR Z, CLARK L, COWEN P, GOODWIN GM, GRASBY PM. (2010). 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in euthymic bipolar patients using positron emission tomography with [carbonyl-(11)C]WAY-100635. *J Affect Disord*, 123, 77-80.

SAUGSTAD OD, MARKLUND SL. 1988. High activities of erythrocyte glutathione peroxidase in patients with the Lesch-Nyhan syndrome. *Acta Med. Scand*, 224, 281-85.

SAVITZ J, LUCKI I, DREVETS WC. 2009. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*, 88, 17-31. Revisión.

SCHALLMOSER K, BARTMANN C, ROHDE E, BORK S, GUELLY C, OBENAUF AC, REINISCH A, HORN P, HO AD, STRUNK D, WAGNER W. 2010. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*, 95, 867-74.

SCHWARZSCHILD MA, AGNATI L, FUXE K, CHEN JF, MORELLI M. 2006. Targeting adenosine A<sub>2A</sub> receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 29, 647-54.

SEEMAN P, VAN TOL HH. 1994. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 15, 264-70. Revisión.

SHIRLEY TL, LEWERS JC, EGAMI K, MAJUMDAR A, KELLY M, CEBALLOS-PICOT I, SEIDMAN MM, JINNAH HA. 2007. A human neuronal tissue culture model for Lesch-Nyhan disease. *J Neurochem*, 101, 841-53.

SIBLEY DR, MONSMA FJ JR. 1992. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 13, 61-9.

SILVERSTEIN FS, JOHNSTON MV, HUTCHINSON RJ, EDWARDS NL. 1985. Lesch-Nyhan syndrome: CSF neurotransmitter abnormalities. *Neurology*, 35, 907-11.

SODHI MS, SANDERS-BUSH E. 2004. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol* 59:111-74.

SONG S, FRIEDMANN T. 2007. Tissue-specific aberrations of gene expression in HPRT-deficient mice: functional complexity in a monogenic disease?. *Mol Ther*, 15, 1432-43.

SPENCER T, BIEDERMAN J, COFFEY B, GELLER D, FARAONE S, WILENS T. 2001. Tourette disorder and ADHD. *Adv Neurol*, 85, 57-77. Revisión.

STOUT JT, CASKEY CT. 1985. HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annu Rev Genet*, 19, 127-48.

SWEETMAN L, BORDEN M, KULOVICH S, KAUFMAN I, NYHAN WL. 1977. Altered excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid and glycine in patients with the Lesch-Nyhan disease. *Adv Exp Med Biol*, 76A, 398-404.

TAKAHASHI RN, PAMPLONA FA, PREDIGER RD. 2008. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Front Biosci*, 13, 2614-32.

TORRES RJ, DEANTONIO I, PRIOR C, PUIG JG. 2004. Adenosine transport in HPRT deficient lymphocytes from Lesch-Nyhan disease patients. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23, 1193-96.

TORRES RJ, PUIG JG. 2007. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2, 48.

UENO S, NAKAMURA M, MIKAMI M, KONDOH K, ISHIGURO H, ARINAMI T, KOMIYAMA T, MITSUSHIO H, SANO A, TANABE H. 1999. Identification of a novel polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene and the significant association with alcoholism. *Mol Psychiatry*, 4, 552-57.

USHIJIMA I, KATSURAGI T, FURUKAWA T. 1984. Involvement of adenosine receptor activities in aggressive responses produced by clonidine in mice. *Psychopharmacology*, 83, 335-39.

VAN BOCKSTAELE EJ, CESTARI DM, PICKEL VM. 1994. Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Res*, 647, 307-22.

VAN DER KOOY D, HATTORI T. 1980. Single subthalamic nucleus neurons project to both the globus pallidus and substantia nigra in rat. *J Comp Neurol*, 192, 751-68.

VISSER JE, BÄR PR, JINNAH HA. 2000. Lesch-Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Res Rev*, 32, 449-75.

VISSER JE, SMITH DW, MOY SS, BREESE GR, FRIEDMANN T, ROTHSTEIN JD, JINNAH HA. 2002. Oxidative stress and dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Brain Res Dev*, 133, 127-39.

WANG G, HU C, JIANG T, LUO J, HU J, LING S, LIU M, XING G. 2010. Overexpression of serotonin receptor and transporter mRNA in blood leukocytes of antipsychotic-free and antipsychotic-naïve schizophrenic patients: gender differences. *Schizophr Res*, 121, 160-71.

WEINBERGER DR, BERMAN KF, SUDDATH R, TORREY EF. 1992. Evidence of dysfunction of a prefrontal-limbic network in schizophrenia: a magnetic resonance imaging and regional cerebral blood flow study of discordant monozygotic twins. *Am J Psychiatry*, 149, 890-97.

WEINTRAUB D, COMELLA CL, HORN S. 2008. Parkinson's disease - Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Mnag Care*, 14, 40-48.

WILSON JM, TARR GE, MAHONEY WC, KELLEY WN. 1982. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. Complete amino acid sequence of the erythrocyte enzyme. *J Biol Chem*, 257, 10978-85.

WONG DF, HARRIS JC, NAIDU S, YOKOI F, MARENCO S, DANNALS RF, RAVERT HT, YASTER M, EVANS A, ROUSSET O, BRYAN RN, GJEDDE A, KUHAR MJ, BREESE GR. 1996. Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, 93, 5539-43.

WU CL, MELTON DW. 1993. Production of a model for Lesch-Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nat Genet*, 3 (3):235-40.

WU X, WAKAMIYA M, VAISHNAV S, GESKE R, MONTGOMERY C JR, JONES P, BRADLEY A, CASKEY CT. 1994. Hyperuricemia and urate nephropathy in urate oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, 91, 742-46.

YAN Z. 2002. Regulation of GABAergic inhibition by serotonin signaling in prefrontal cortex: molecular mechanisms and functional implications. *Mol Neurobiol*, 26, 203-16.

YANG B, CHAN RC, JING J, LI T, SHAM P, CHEN RY. 2007. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144, 541-50.

YIN J, ALBERT RH, TRETIAKOVA AP, JAMESON BA. 2006. 5-HT<sub>1B</sub> receptors play a prominent role in the proliferation of T-lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 181, 68-8.

***ANEXO A***

Durante la realización de esta tesis doctoral, la doctoranda ha participado en la realización de los siguientes artículos:

- García MG, Torres RJ, Prior C, Puig JG. 2008. Normal HPRT coding region in complete and partial HPRT deficiency. *Mol Genet Metab*, 94, 167-72.
- García MG, Puig JG, Torres RJ. 2009. Abnormal Adenosine and Dopamine Receptor expression in lymphocytes of Lesch Nyhan patients. *Brain Behavior and Immunity*, 23, 1125-31.
- Torres RJ, García MG, Puig JG. 2010. Partial HPRT deficiency phenotype and incomplete splicing mutation. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 29, 295-300.
- García MG, Torres RJ, Puig JG. 2010. Methylation status of HPRT1 promoter in HPRT deficiency with normal coding region. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 29, 301-5.
- Rosa Torres Jiménez, Marta García García y Juan García Puig. 2010. Fenotipo variante del síndrome de Lesch-Nyhan. *Med Clin (Barc)*, 136, 63–66.
- García MG, Torres RJ, Puig JG. 2011. Adenosine, dopamine and serotonin misbalance in lymphocytes from Lesch Nyhan patients. *Brain Behavior and Immunity*. Enviado.