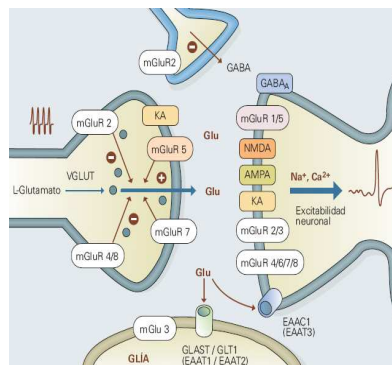


Título:

Marcadores de disfunción sináptica en el síndrome de Rett

.....



**Fundació Sant Joan de Déu
Hospital Sant Joan de Déu Barcelona**

Data 20/11/09

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| 1. Descripción del proyecto | 2 |
| 2. Datos del centro solicitante..... | 2 |
| 3. Datos del equipo investigador Sant Joan de Déu | 2 |
| 4. Relevancia social y científica | 3 |
| 5. Beneficios científicos y técnicos del proyecto | 4 |
| 6. Objetivo principal | 5 |
| 7. Objetivos secundarios..... | 6 |
| 8. Hipótesis de trabajo | 7 |
| 9. Metodología | 8 |
| 10. Presupuesto general..... | 11 |
| 11. Plan de trabajo detallado | 12 |
| 12. Bibliografía | 13 |
| 13. Historial científico del grupo..... | 14 |
| 15.1. Proyectos de investigación..... | 14 |
| 15.2. Bibliografía..... | 14 |
| 14. Presupuesto detallado | 15 |

INVESTIGACIÓN:

| 1.- DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO | |
|------------------------------|---|
| Título: | Marcadores de disfunción sináptica en el síndrome de Rett |
| Área: | Neurociencias |
| Palabras Claves: | Síndrome de Rett, sinapsis neuronal, neurotransmisores, líquido cefalorraquídeo, sinapto-proteómica, biomarcadores sinápticos |

| 2.- DATOS DEL CENTRO SOLICITANTE | | |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Nombre o razón social: Fundació Sant Joan de Déu (En colaboración con Hospital Sant Joan de Déu Barcelona) | | |
| C.I.F: G-62978689 | | |
| Representante legal: Dr. Josep M. Haro | | |
| Representante a efectos de comunicación: Mercè Tura | | |
| Domicilio: C/ Santa Rosa 39-57. Cuarta Planta Edificio Docente Sant Joan de Déu | | |
| Ciudad: Esplugues de Llobregat | C. Postal: 08950 | |
| Provincia: Barcelona | | |
| Teléfono: 93 600 97 51 | Fax: 93 600 97 71 | E-Mail: jmharo@fsjd.org |

3.- DATOS DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN DE SANT JOAN DE DÉU

| EQUIPO DE INVESTIGADORES HSJD (Ver Anexo II: Historial Científico Técnico) | | |
|--|--|--|
| Investigadores Principales | Angels García Cazorla/ Mercè Pineda | Neurología |
| Otros Investigadores | Aida Ormazábal (*) Rafael Artuch (*) Judith Armstrong (**) | Bioquímica (*), Hospital Sant Joan de Déu CIBER-ER (**) |
| Becarios predoctorales | Ana Roche Sofía Duarte | Neurología HSJD (*) |
| Técnico | Ana Pérez Rosado | FIS / Fundació Sant Joan de Déu |
| EQUIPO DE APOYO FSJD | | |
| Dr. Josep Maria Haro | Director Fundación San Juan de Dios | |
| Mercè Tura | Área de Marketing y Captación de Fondos | |
| Marta López | Área de Soporte Técnico | |

4.- RELEVANCIA SOCIAL Y CIENTÍFICA

El cerebro procesa información transmitiendo señales en la sinapsis, lo cual conecta a las neuronas mediante complejos circuitos de comunicación. Toda la información que se procesa en el sistema nervioso tiene que ver con la sinapsis y casi todas las anomalías de la función cerebral, están relacionadas de manera directa o indirecta con el funcionamiento de la sinapsis.

Existen numerosos datos en la literatura médica que refuerzan la idea de que el síndrome de Rett puede ser considerado como una sinaptopatía, es decir una enfermedad cuya fisiopatología se centra fundamentalmente en la sinapsis neuronal. Esto no sólo implica que los niveles de diferentes neurotransmisores (dopaminérgicos, serotoninérgicos, gabaérgicos) pueden estar alterados, sino que diversas proteínas alojadas en la sinapsis y relacionadas directa o indirectamente con éstos van a presentar un funcionamiento anómalo.

Si analizamos el tema detenidamente, nos encontramos con los siguientes aspectos principales:

1) Neurotransmisión serotoninérgica y su relación con el BDNF (brain derived neurotrophic factor)

El BDNF es una molécula que puede ser determinada en LCR y sangre, y que posee numerosas funciones en el desarrollo neuronal, en particular contribuye al crecimiento dendrítico, maduración de las espinas sinápticas, sinaptogénesis y plasticidad neuronal. Estos efectos tróficos son muy importantes para la neurotransmisión serotoninérgica. Por otra parte, se ha demostrado que el MECP2 tiene un papel fundamental en la transcripción del BDNF. Monteggia et al utilizaron un ratón knock-out para BDNF y pudieron demostrar una pérdida de función del receptor serotoninérgico 5HT1-A. Podríamos pues hipotetizar que pacientes con síndrome de Rett debido a pérdida de función en el gen MECP2, tendrían anomalías en la vía de señalización serotoninérgica y por tanto, consecuencias negativas para el desarrollo neuronal. Un par de estudios sobre aminas biógenas en LCR, hallaron niveles bajos de metabolitos de la serotonina en algunas de las pacientes (Pineda et al, Temudo et al). No obstante, salvo en modelos animales, no existen datos sobre receptores serotoninérgicos y su relación con el BDNF. Ambos marcadores pueden ser estudiados en LCR.

2) Neurotransmisión gabaérgica

Existen datos recientes sobre el efecto regulador del gen MECP2 en subunidades del receptor GABA_A mediante metilación del DNA. Por otra parte, Meridhan y colaboradores, han demostrado un desequilibrio entre neurotransmisores excitadores e inhibidores en el ratón knock-out para MECP2, lo cual aparece responsable de las principales anomalías conductuales en estos animales. En este estudio, se observa una clara depresión de la neurotransmisión gabaérgica (y no glicinérgica), debido probablemente a una disminución en la liberación presináptica de GABA y disminución en la expresión de las subunidades 2 y 4 del receptor GABA_A

En LCR pueden ser determinados el neurotransmisor GABA y receptores del mismo, así como transportadores. Hasta la fecha, no se han realizado estudios de estos marcadores en pacientes afectos de síndrome de Rett.

3) Neurotransmisión dopaminérgica

En estudios realizados en tejido cerebral, se ha podido demostrar una disminución de dopamina y sus metabolitos desde el neocórtex a los ganglios basales. Además el número de receptores dopaminérgicos D2 están disminuidos en putamen.

Trastornos como las estereotipias, conductas hiperactivas y de auto-agresión, así como trastornos del movimiento (disonías, síntomas sugestivos de parkinsonismo, que suceden en pacientes mayores), parecen tener una base en una disfunción dopaminérgica. Por otra parte, los metabolitos de la dopamina se han estudiado en el LCR de pacientes, resultando en algunos casos alterados.

Para acabar de comprender el funcionamiento dopaminérgico, podemos determinar en LCR diferentes proteínas relacionadas con la dopamina: el transportador de dopamina (DAT), el transportador de monoaminas (VMAT) y la alfa-sinucleína.

4) Plasticidad neuronal

En un modelo de ratón disfuncionante para MECP2, se ha podido demostrar una composición anómala en los sinaptosomas y densidad postsináptica, así como en el BDNF.

En cuanto a marcadores de plasticidad y aprendizaje, además del ya mencionado BDNF, podemos caracterizar en LCR la expresión de los receptores AMPA y NMDA, así como de diferentes neuroquinas

(moduladores de la plasticidad sináptica), marcadores de proliferación dendrítica (MAP2) y el péptido beta-amiloide (APP) que en niños tiene una función esencial en plasticidad sináptica.

5.- BENEFICIOS CIENTÍFICOS Y TÉCNICOS DEL PROYECTO

El hecho de describir cómo se expresan determinadas proteínas de la sinapsis neuronal ("up/down regulation") en el síndrome de Rett y qué relación establecen entre ellas, es ya algo totalmente novedoso y no descrito previamente en la literatura. Los resultados de este estudio pueden contribuir a la comprensión de la fisiopatología del síndrome de Rett y a diseñar posibles estrategias neuroprotectoras.

6.- OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal es describir factores implicados en la proteómica sináptica del síndrome de Rett a través de la medición de una serie de proteínas o biomarcadores en LCR.

7.- OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1) **Establecer correlaciones en la expresión de las diferentes proteínas analizadas para describir posibles "sistemas de funcionamiento sináptico"**
- 2) **Relacionar los resultados hallados con los diferentes fenotipos clínicos, bioquímicos (de neurotransmisores) y moleculares.**
- 3) **Diseñar en trabajos posteriores, posibles estrategias terapéuticas a partir de los resultados hallados.**

8.-HIPÓTESIS DE TRABAJO

La medición de una serie de proteínas que participan en diferentes funciones de la sinapsis neuronal, nos permitiría definir un "mapa" o sistema biológico de disfunción sináptica en el síndrome de Rett. La cuantificación de estas proteínas y su interrelación podría aportar nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad, además de contribuir a una mejor comprensión de los diferentes fenotipos clínicos y moleculares. Por último, los resultados de este estudio, podrían contribuir a diseñar nuevas estrategias terapéuticas

9.- MÉTODOLÓGIA

A partir de 20 muestras de LCR, correspondientes a pacientes afectas de sde de Rett confirmado genéticamente, y 20 muestras control (muestras de LCR de pacientes que acudan a urgencias por sospecha de infección de SNC posteriormente no confirmada), se analizarán por técnicas de Western blot, las siguientes proteínas:

- 1) Marcadores de volumen neuronal y glial: ENE (enolasa neuronal específica) y GFAP (glial fibrillar acidic protein) respectivamente.
- 2) Marcadores de proliferación dendrítica: MAP2 (miotubular associated protein)
- 3) Marcadores de función serotoninérgica: receptor 5HT1 y transportador SERT
- 4) Marcadores de función gabaérgica: cuantificación del neurotransmisor GABA, receptor GABA_A y transportador GABAT
- 5) Marcadores de función dopaminérgica: receptor D2, transportadores DAT y VMAT, proteína de vesícula sináptica alfa-sinucleína.
- 6) Marcadores de plasticidad neuronal: BDNF, APP, receptores AMPA y NMDA

Se realizará una base de datos y se aplicarán cálculos estadísticos necesarios mediante el programa SPSS.

10.- PRESUPUESTO GENERAL

En estas 40 muestras en total se van a estudiar con 15 anticuerpos diferentes en el caso del LCR. El presupuesto necesario para estas 40 muestras incubadas con esos 15 ac. Primarios es el siguiente:

1 - Necesitamos hacer 5 geles por Ac Primario para correr las 40 muestras , eso supone un gasto de 50ul por Ac. Primario.

2 - Vamos a utilizar 15 Ac. Primarios diferentes y vamos a correr las 40 muestras en un total de 5 geles, por lo tanto vamos a necesitar hacer un total de 75 geles .

3 - Marcador de peso molecular necesario 6ul x 75 geles = 450ul

4 - Ac. Secundario utilizado 3ul x 75 membranas = 225ul (Mouse y Rabbit)

5 - Acrilamida necesaria para 75 geles = 600 ml

6 - Necesitamos 45 films y 37.5 ml de ECL para las 75 membranas y reactivos como glicina, tris, metanol, temed , tween , etc.

El cálculo aproximado es el siguiente:

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| • 15 anticuerpo primarios | 400 x 15 = 6000€ |
| • 1 Marcador de peso molecular | 2 x 250 = 200€ |
| • 4 Ac. Secundarios (Mouse/ Rabbit) | 4 x 150€ = 600€ |
| • Films + ECL | 534€ |
| • Acrilamida 6 x 100 ml | 180€ |
| • Bradford | 200€ |
| • Glycina | 200€ |
| • Tris-HCl | 400€ |
| • Otros | 400€ |



TOTAL

8714€

Este total no incluye que se tenga que repetir alguno de los Westerns debido a errores o dificultades técnicas.

11.- PLAN DE TRABAJO DETALLADO

El proyecto lo realizará por entero el equipo de investigación de neurología de Sant Joan de Déu, ya mencionado inicialmente.

Constará de los siguientes pasos:

- 1-Selección de pacientes y muestras de LCR, según información que ya disponemos en nuestras bases de datos.
- 2-Recopilación de muestras control de LCR que se obtendrán del laboratorio de urgencias de nuestro hospital (aquellos LCR en los que se haya descartado patología infecciosa y de niños sin patología neurológica).
- 3-Puesta a punto de la técnica para cada anticuerpo
- 4-Realización de Westerns blot para cada proteína en cada paciente y control respectivo
- 5-Cuantificación de las proteínas por técnicas de densitometría
- 6-Introducción de los resultados en bases de datos
- 7-Establecimiento de valores de referencia
- 8-Análisis de los resultados (programa SPSS, aplicación de procedimientos estadísticos)
- 9-Publicación de resultados.

El tiempo necesario para realizar este estudio depende de la velocidad en que consigamos muestras de LCR de control (hemos de disponer de un repertorio de edades que sea similar al de los pacientes) y de las limitaciones técnicas que puedan surgir con el uso de anticuerpos aún no utilizados por nuestro equipo, pero calculamos un período aproximado de un año (desde el inicio hasta la redacción de los primeros trabajos)

12.- BIBLIOGRAFIA

Medrihan L, Tantalaki E, Aramuni G, Sargsyan V, Dudanova I, Missler M, Zhang W. Early defects of GABAergic synapses in the brain stem of a MeCP2 mouse model of Rett syndrome. J Neurophysiol 99: 112–121, 2008

Temudo T, Rios M, Prior C, Carrilo I et AL Evaluation of CSF neurotransmitters and folate in 25 patients with Rett disorder and effects of treatment. Brain Dev. 2009 Jan;31(1):46-51. Epub 2008 Jun 24.

Wenk GL Alterations in dopaminergic function in Rett syndrome.

Neuropediatrics. 1995 Apr;26(2):123-5.

Roux JC, Villard L. Biogenic amines in Rett syndrome: The usual aspects.

Ormazabal A, Artuch R, Vilaseca MA, Aracil A, Pineda M.

Cerebrospinal fluid concentrations of folate, biogenic amines and pterins in Rett syndrome: treatment with folinic acid.

Neuropediatrics. 2005 Dec;36(6):380-5.

13.- LIMITACIONES DEL TRABAJO

Al trabajar con LCR, la posibilidad de hacer todas estas determinaciones depende de la cantidad de éste de la cual se disponga y del contenido de proteínas totales que contenga. Esto quiere decir, que en algunas de las muestras de las que ya disponemos, es posible que no se puedan determinar alguno de los marcadores.

Estos son estudios muy novedosos. Aunque teóricamente todas estas proteínas se pueden hallar en el LCR, y algunas de ellas ya se han determinado en nuestro laboratorio, muy pocas han sido descritas en trabajos previos en la literatura., por lo cual es posible que existan dificultades técnicas con alguno de los marcadores. En este caso, el marcador en cuestión se eliminará del estudio.

