

Una nova visió del paper del glicogen en el cervell

Discurs de presentació de Joan J. Guinovart
com a membre numerari de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 24 d'abril de 2017



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Una nova visió del paper
del glicogen en el cervell

Una nova visió del paper del glicogen en el cervell

Discurs de presentació de Joan J. Guinovart
com a membre numerari de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 24 d'abril de 2017

Barcelona, 2018



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP

Guinovart, Joan J. (Joan Josep), 1947- autor

Una Nova visió del paper del glicogen en el cervell. — Primera edició

Bibliografia

ISBN 9788499654065

I. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques II. Títol

1. Cervell — Metabolisme 2. Glicogen — Metabolisme

612.82.015.3:547.458.63

© Joan J. Guinovart

© 2018, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: febrer del 2018

Text revisat lingüísticament per la Unitat de Correcció del Servei Editorial de l'IEC

Disseny de la coberta: Azcunce | Ventura

Compost per fotocomposició gama, s. l.

Imprès a Service Point FMI, SA

ISBN: 978-84-9965-406-5

Dipòsit Legal: B 3404-2018

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

EL GLICOGEN CEREBRAL

Les cèl·lules emmagatzemen glucosa en forma d'un polímer ramificat anomenat *glicogen*, la funció principal del qual és actuar com a font d'energia fàcilment disponible. El glicogen acumulat en el múscul serveix per proporcionar el combustible per a la contracció durant l'activitat física. Per contra, el glicogen del fetge proporciona glucosa a la resta del cos durant els períodes de dejuni. La glicogen-sintasa (GS), l'únic enzim capaç de catalitzar la síntesi de polímers de glucosa en mamífers, té dues isoformes: una de muscular (MGS, codificada pel gen *GYS1*), que es troba en la majoria dels teixits, i una altra específica de fetge (LGS, codificada per *GYS2*). La GS catalitza el creixement de les branques exteriors de la molècula de glicogen formant enllaços glicosídics α -1,4, mentre que l'enzim ramificador introdueix els enllaços glicosídics α -1,6 que formen els punts de ramificació. L'acció coordinada d'aquests enzims dona com a resultat una molècula de glicogen correctament ramificada, que és soluble i pot ser degradada fàcilment, quan sigui necessari, per la glicogen-fosforilasa (GP) i l'enzim desramificador. Hi ha tres isoformes específiques de teixit de la GP en els mamífers: la muscular (MGP), la de fetge (LGP) i la de cervell (BGP). Cal fer notar, però, que, a més de la BGP, l'MGP també s'expressa en el cervell. La síntesi i la degradació de glicogen són processos altament regulats que contribueixen a l'homeòstasi de la glucosa. Hi ha diversos mecanismes de regulació que controlen l'activitat de la GS, incloent-hi la fosforilació en múltiples centres, l'activació al·lostèrica per la glucosa-6-fosfat i la localització intracel·lular. La proteïna d'unió al glicogen (PTG, una subunitat reguladora de la fosfatasa de proteïnes PP1) desenvolupa un paper clau en l'acti-

vació de la GS per desfosforilació (Roach *et al.*, 2012), ja que facilita la interacció entre la subunitat catalítica de la fosfatasa i la GS. L'activitat de la GP també està regulada per la fosforilació i l'activació al·lostèrica. L'MGP s'activa principalment a través de la fosforilació i, per tant, està adaptada principalment a respondre als senyals extracel·lulars. En canvi, la BGP, que és extremament sensible als augments en els nivells d'AMP, està més adaptada a proporcionar energia per a les necessitats internes (Crerar *et al.*, 1995).

El sistema nerviós central (CNS) és un cas interessant en relació amb el metabolisme del glicogen. En les etapes embrionàries, el glicogen apareix en les cèl·lules de la glia i en les neuronals, però en els adults aquest polisacàrid es troba gairebé exclusivament en els astròcits (Cataldo i Broadwell, 1986). El cervell humà conté al voltant d'1 g de glicogen (0,1 % del pes del teixit). Aquesta concentració és deu vegades menor que en el múscul esquelètic i cent vegades menor que en el fetge (Nelson *et al.*, 1968). Per tant, no és sorprenent que la contribució del glicogen del cervell com una reserva d'energia per a l'activitat a llarg termini hagi estat passada per alt, i es considera que les necessitats energètiques del cervell se satisfan per la glucosa que prové de la circulació sistèmica (Brown, 2004). No obstant això, s'ha proposat que el glicogen del cervell és una font d'energia a curt termini que dona suport a les activitats neuronals locals i específiques, com ara la formació de la memòria (Suzuki *et al.*, 2011), l'estimulació sensorial (Brown *et al.*, 2003; Cruz i Dienel, 2002; Swanson *et al.*, 1992) i els cicles de son i vigília (Franken *et al.*, 2003; Gip *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002; Scharf *et al.*, 2008). A més, el glicogen del cervell té un efecte protector sota l'estrès i en condicions com ara la hipoglucèmia (Brown *et al.*, 2003; Herzog *et al.*, 2008; Wender *et al.*, 2000), l'exercici intens (Matsui *et al.*, 2012), la isquèmia (Brown, 2004) i les convulsions (Bernard-Helary *et al.*, 2000; Cloix *et al.*, 2010). També s'accepta que les neurones —a través de neurotransmissors i neuromoduladors— estimulen la mobilització de les reserves de glicogen dels astròcits, que es converteixen en lactat, que pot ser captat i utilitzat per les neurones (Belanger *et al.*, 2011).

A fi d'aclarir de manera inequívoca el paper del glicogen en el cervell, vàrem generar un model de ratolí (*knock-out*, KO) que no expressa GS específicament en el sistema nerviós ($GYS1^{Nestin-KO}$). Vàrem analitzar la capacitat d'aprenentatge d'aquests animals i també es van verificar les diferències en les propietats electrofisiològiques de les sinapsis CA3-CA1 de l'hipocamp (Duran *et al.*, 2013). Els nostres resultats demostraren la contribució del glicogen del cervell a l'aprenentatge associatiu i als canvis relacionats amb la força sinàptica de l'hipocamp, així com a la inducció experimental de la potenciació a llarg termini (LTP) en les sinapsis de l'hipocamp. En general, hem demostrat, doncs, que la manca de GS —i, per tant, de glicogen— al cervell produeix un dèficit significatiu en la capacitat d'aprenen-

tatge i en els canvis dependents de l'activitat en la força de les sinapsis de l'hipocamp (figura 1). Aquestes observacions apunten un paper clau del glicogen del cervell.

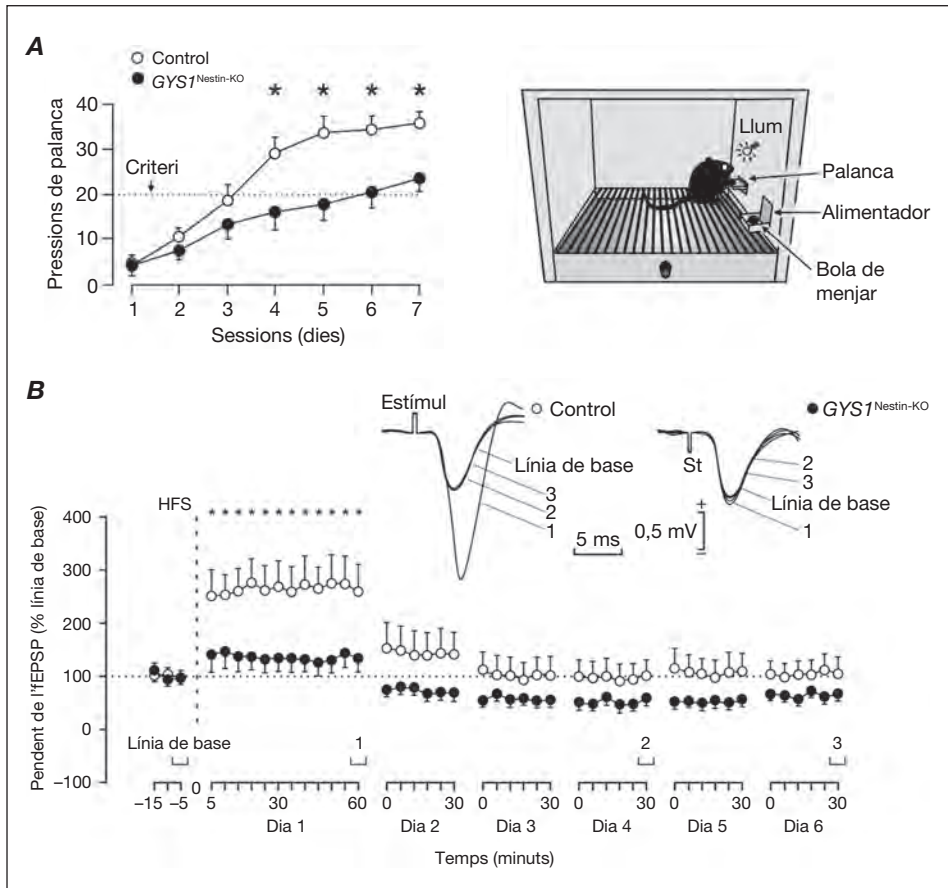


FIGURA 1. A. Alteració del comportament dels ratolins $GYS1^{Nestin-KO}$ a la caixa de Skinner. Els ratolins varen ser entrenats per pressionar una palanca per obtenir una bola de menjar. El gràfic representa les vegades que varen prémer la palanca en els primers set dies d'entrenament. La línia puntejada correspon al criteri.

B. Mesures electrofisiològiques de les sinapsis de l'hipocamp en ratolins $GYS1^{Nestin-KO}$. Es mostra el curs temporal de la potenciació a llarg termini (LTP) evocada en la sinapsi CA3-CA1, després d'una sessió d'estimulació per alta freqüència (HFS) (mitjana \pm error estàndard de la mitjana, EEM). Els exemples representatius del potencial postsinàptic excitador de camp (fEPSP) recollits en els temps indicats es representen a la part superior. Adaptat de Duran *et al.*, 2013.

EL GLICOGEN NEURONAL

Encara que el glicogen normalment no es detecta en les neurones, aquestes cèl·lules expressen MGS (Inoue *et al.*, 1988) i tenen la maquinària per sintetitzar glicogen (Vilchez *et al.*, 2007). La presència de GP en aquest tipus de cèl·lules ha estat un tema de debat. Tot i que la presència de GP a les neurones es va descriure fa molts anys (Ibrahim *et al.*, 1970; Pellegrini *et al.*, 1996), més tard s'acceptà que aquestes cèl·lules no expressen aquest enzim (Pfeiffer-Guglielmi *et al.*, 2003). Mitjançant l'ús d'un mètode altament sensible, vàrem ser capaços de demostrar que les neurones expressen la BGP i no l'MGP, mentre que els astròcits expressen ambdues isoformes (Pfeiffer-Guglielmi *et al.*, 2003). D'altra banda, també vàrem demostrar que, en contra del que generalment es pensa, les neurones tenen un metabolisme del glicogen actiu (Saez *et al.*, 2014), el qual protegeix les neurones en cultiu de la mort induïda per hipòxia i les mosques *Drosophila melanogaster* de l'estupor induït per la hipòxia (figura 2). Tanmateix, el contingut de glicogen en

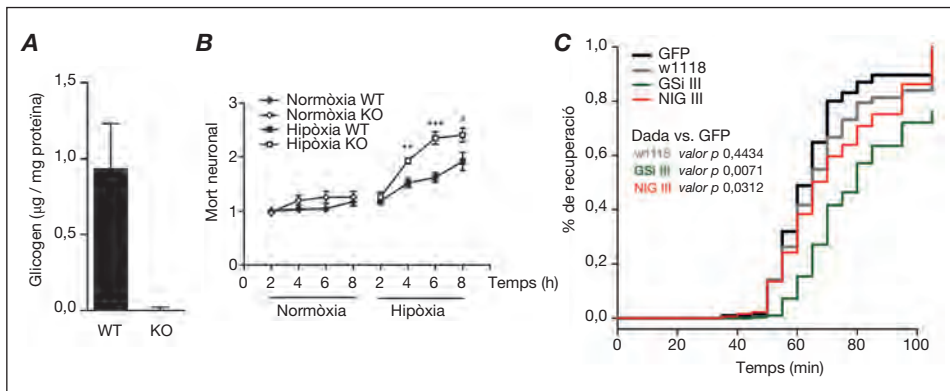


FIGURA 2. A. Les neurones sintetitzen glicogen. Mitjançant l'ús d'un nou mètode ultrasensible, es van trobar quantitats detectables de glicogen en les neurones d'animals normals (WT), però no en les cèl·lules KO per a GS. Els nivells de glicogen representen la mitjana \pm EEM.

B. La GS protegeix les neurones de la hipòxia. Mort neuronal al llarg del temps d'exposició a hipòxia (1% de O₂) a les neurones GS WT (negre) i *knock-out* (KO) (blanc).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

C. Recuperació més lenta després de l'exposició a la hipòxia en mosques transgèniques amb quantitats reduïdes de GS específicament en les neurones. El gràfic representa el temps de recuperació després de l'exposició a hipòxia de línies transgèniques de *Drosophila melanogaster* (línies de control, GFP, negre, i w1118, gris), i les línies amb GS disminuïda específicament a les neurones GSi III, verd, i NiG III, vermell). Les mosques van ser mantingudes al 0,6% de O₂ durant una hora, en la qual van entrar en un estat d'estupor. Les mosques es van exposar llavors a la tensió d'oxigen del medi ambient, i es va determinar el temps requerit per recuperar les seves funcions motores per a cada línia. Adaptat de Saez *et al.*, 2014.

les neurones es manté molt baix, la qual cosa pot explicar per què la presència d'aquest polisacàrid en aquesta població cel·lular ha estat passada per alt. Aquestes troballes canvien el punt de vista clàssic de la funció del glicogen en el cervell i revelen que el metabolisme del glicogen endogen contribueix a la supervivència de les neurones. Aquestes cèl·lules, però, han de mantenir la concentració de glicogen molt baixa, ja que la sobreacumulació d'aquest polisacàrid indueix l'apoptosi (Vilchez *et al.*, 2007). A fi d'estudiar aquest efecte, vàrem generar un model de ratolí que sobreexpressa de forma condicional una GS resistent a la inactivació, en què les serines dels centres de fosforilació han estat substituïdes per alanines específicament en les neurones de Purkinje del cerebel (mMGS-9A^{Pcp2}). Aquest enzim no pot, doncs, ser inactivat per fosforilació. L'acumulació de glicogen en les neurones de Purkinje d'aquest ratolí condueix a la pèrdua d'aquest tipus de cèl·lules, la qual cosa li provoca atàxia. En el cas de *Drosophila*, les mosques que expressen aquesta forma activa de la GS a les neurones viuen menys (figura 3) (Duran *et al.*, 2012). Aquests resultats revelen que l'acumulació de glicogen en les neurones és una causa directa de la neurodegeneració. Per tant, la concentració del polisacàrid en aquestes cèl·lules ha d'estar estrictament regulada (cal mantenir-la baixa, però funcional).

LA MALALTIA DE LAFORA I EL GLICOGEN

La malaltia de Lafora (LD) és, sens dubte, la més esgarrifosa de les epilèpsies que apareixen en l'adolescència. El segell distintiu de la malaltia és l'acumulació de glicogen anormal, mal ramificat, anomenat *poliglucosà* (PG). Amb el temps, aquests agregats de glicogen anormal s'acumulen en grans inclusions neuronals anomenades *coscos de Lafora* (LB) (Cavanagh, 1999). Quan aquestes inclusions arriben a una certa mida i a un cert nombre, es produeix l'epilèpsia. A mesura que aquests agregats segueixen acumulant-se, l'epilèpsia empitjora, es torna intractable i continua fins que causa la mort. L'LD és una malaltia autosòmica recessiva causada per un dels dos gens següents: *EPM2A*, que codifica la laforina, una fosfatasa de proteïnes d'especificitat dual amb un domini funcional d'unió a carbohidrats (Minassian *et al.*, 1998; Serratosa *et al.*, 1999), i *EPM2B* (també conegut com a *NHLRC1*), que codifica la malina, una ubiquitina ligasa E3 (Chan *et al.*, 2003). Els individus amb mutacions en *EPM2A* o en *EPM2B* són neurològicament i histològicament indistingibles. Aquestes dues proteïnes formen un complex i s'ha descrit que poden regular l'acumulació de glicogen a través d'un control, dependent del proteasoma, de les proteïnes relacionades amb la síntesi del glicogen, com ara la PTG, l'MGS i l'enzim desramificador (Cheng *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2011; Vilchez *et al.*, 2007; Worby *et al.*, 2008). També s'ha demostrat que la malina promou la degradació de la laforina (Gentry *et al.*, 2005). D'altra banda, la laforina, en ser una fosfatasa, garanteix directament la qualitat del glicogen impedit-ne la

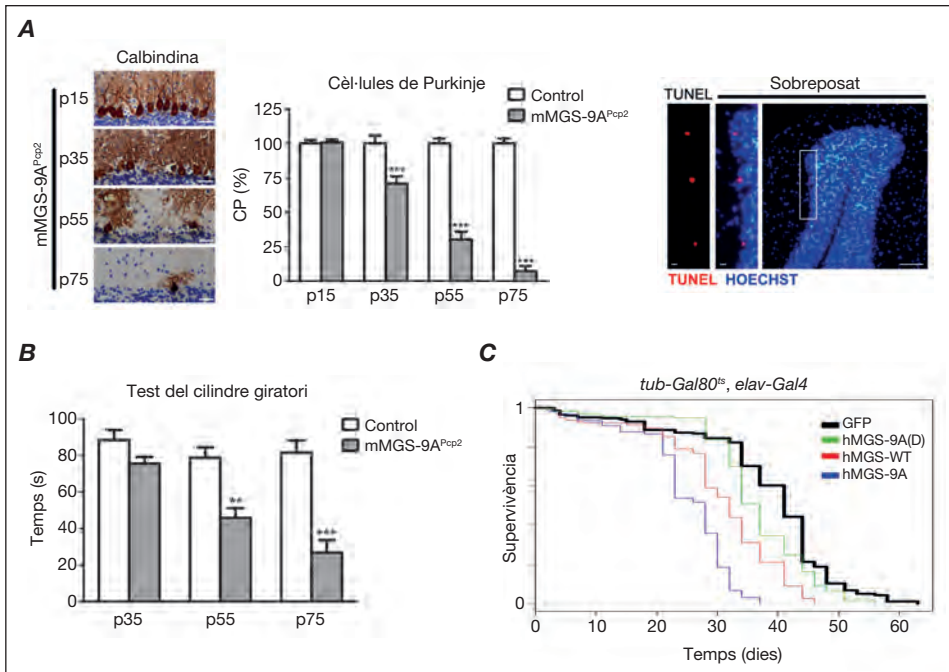


FIGURA 3. A. L'acumulació de glicogen indueix la mort neuronal en un model de ratolí que expressa una forma activa d'MGS específicament en les neurones de Purkinje (mMGS-9A^{Pcp2}). La tinció de calbindina (que marca de forma específica les neurones de Purkinje) mostra la pèrdua progressiva d'aquestes cèl·lules. El gràfic representa la quantificació de les neurones de Purkinje en les diferents edats. La tinció positiva mitjançant la prova de TUNEL identifica cèl·lules apoptòtiques a la capa de cèl·lules de Purkinje.

B. Els ratolins mMGS-9A^{Pcp2} mostren atàxia progressiva. El gràfic mostra el rendiment en el test del cilindre giratori a diferents edats per avaluar la coordinació motora.

C. Reducció de la vida de les mosques en funció de l'acumulació de glicogen específicament en les neurones. El gràfic representa les corbes de supervivència de les mosques control (GFP) o mosques que sobreexpressen l'MGS de tipus salvatge (hMGS-WT), una forma constitutivament activa d'MGS (hMGS-9A) o una forma inactiva d'MGS (hMGS-9A(D)) específicament en les neurones. Adaptat de Duran *et al.*, 2012.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

hiperfosforilació (Tagliabracci *et al.*, 2011; Turnbull *et al.*, 2010). De fet, la hiperfosforilació del glicogen és considerada una de les característiques clau en la formació dels LB (Roach, 2015). A més, s'ha descrit que la laforina i la malina participen en els sistemes de degradació cel·lulars, com ara les vies endosomal i lisosomal i l'autofàgia (Aguado *et al.*, 2010; Criado *et al.*, 2012; Knecht *et al.*, 2010; Puri *et al.*, 2012), i en l'eliminació de proteïnes mal plegades a través del sistema ubiqui-

tina-proteasoma (Garyali *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2010). Finalment, s'ha proposat que les activitats de la laforina i la malina tenen un efecte protector contra l'estrès del reticle endoplasmàtic (Liu *et al.*, 2009; Vernia *et al.*, 2009) i l'estrès tèrmic (Sengupta *et al.*, 2011). El nostre objectiu va ser estudiar si la maquinària de síntesi del glicogen, a més del seu paper en l'emmagatzematge d'energia, estava també relacionada amb aquestes respostes cel·lulars. Per tal d'obtenir un model animal d'LD que ens permetés estudiar la malaltia, vàrem generar un ratolí que no expressava malina (Malin^{KO}). Vàrem observar que aquest model reproduïa l'LD, ja que presentava agregats de poliglucosa en diversos teixits, incloent-hi el cervell. El contingut de glicogen en els cervells d'aquests animals és més del doble que en els dels animals no modificats (*wild type*, WT). Això va anar acompanyat d'una pèrdua progressiva de cèl·lules neuronals i de les resultants alteracions neurofisiològiques, és a dir, de canvis en les propietats electrofisiològiques de les sinapsis de l'hipocamp i d'un augment de la susceptibilitat a l'epilèpsia induïda per kainat (Valles-Ortega *et al.*, 2011).

No obstant això, tot i l'acumulació aberrant de glicogen en l'LD, encara no hi havia evidència directa de si aquesta era la causa de la malaltia. Aquesta manca de causalitat clara es complica més pel fet que a la malina i a la laforina se'ls ha atribuït una gran varietat de funcions cel·lulars, esmentades anteriorment. A fi de determinar si l'acumulació de glicogen és el principal responsable de la neurodegeneració observada en ratolins KO de malina —i, per tant, en l'LD—, es van generar i analitzar ratolins KO de malina que no podien sintetitzar glicogen en el cervell, ja que també eren KO per a la GS (Malin^{KO} + MGS^{KO}) (Duran *et al.*, 2014). Com era d'esperar, els cervells d'aquests animals no acumulaven LB. Mitjançant l'ús d'aquests models, vàrem demostrar que l'acumulació de glicogen és, de fet, responsable de la neurodegeneració, ja que els animals Malin^{KO} + MGS^{KO} no van mostrar l'augment dels marcadors de neurodegeneració, els canvis en les propietats electrofisiològiques o la susceptibilitat a l'epilèpsia induïda per kainat presents en el model KO de malina (figura 4). També vàrem generar animals KO de malina amb una expressió reduïda d'MGS, en què només s'havia suprimit un dels dos al·lels del gen de la GS (Malin^{KO} + MGS^{het}). Curiosament, hi va haver una clara reducció en el nombre d'LB presents en els cervells d'aquests animals (figura 4). D'altra banda, i en concordança amb el menor nombre d'LB, el fenotip neurodegeneratiu va ser rescatat parcialment en els animals Malin^{KO} + MGS^{het}. Aquesta fou una observació clau, ja que implica que l'LD es pot evitar simplement mitjançant la inhibició de la síntesi de glicogen i que el 50 % d'inhibició seria suficient per prevenir la progressió d'aquesta malaltia. Sorprenentment, el deteriorament de l'autofàgia descrit en models de ratolí LD també va ser rescatat en els animals doble KO. Per contra, l'augment de glicogen *per se* induïa un deteriorament de l'autofàgia, ja que els cervells dels animals que expressaven GS resistent a la inactivació van mostrar marcadors de l'autofàgia alterats (Duran *et al.*, 2014). En con-

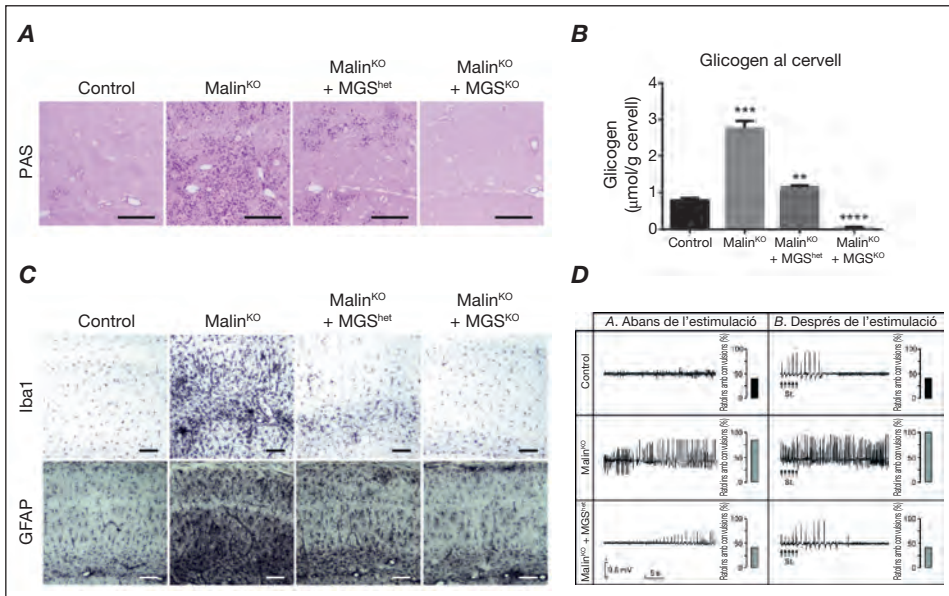


FIGURA 4. A. L'MGS és indispensable per a la formació dels LB. La tinció de l'àcid periòdic-reactiu de Schiff (PAS) mostra que els agregats acumulats en els cervells dels ratolins Malin^{KO} són absents en els Malin^{KO} + MGS^{KO} i reduïts en gran mesura en els cervells Malin^{KO} + MGS^{het}.

B. El gràfic representa la determinació bioquímica de la concentració de glicogen en el cervell. Els cervells Malin^{KO} + MGS^{KO} estan desproveïts de glicogen, i la concentració del polisacàrid és clarament reduïda en el cervell de Malin^{KO} + MGS^{het}.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

C. La neurodegeneració es rescata en els ratolins Malin^{KO} que no poden sintetitzar glicogen en el cervell. Les tincions de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) i Iba1, com a marcadors de la neurodegeneració, augmenten en els ratolins Malin^{KO} en comparació amb els controls, la qual cosa indica la degeneració neuronal. Aquesta tinció es normalitza en els animals Malin^{KO} + MGS^{KO} i es normalitza parcialment en els animals Malin^{KO} + MGS^{het}.

D. L'augment de la susceptibilitat a l'epilèpsia induïda per kainat també depèn de l'MGS. Es van dur a terme enregistraments potencials del camp local de l'hipocamp (LFP) trenta minuts després de la injecció de kainat, abans i després de l'estimulació. El percentatge dels ratolins que presenten convulsions dins de cada grup s'il·lustra a la dreta dels enregistraments. Els animals Malin^{KO} van mostrar major susceptibilitat, que es va normalitzar en els animals Malin^{KO} + MGS^{het}. Adaptat de Duran *et al.*, 2014.

junt, aquests resultats indiquen que l'alteració en l'autofàgia observada en els cervells dels KO de malina és una conseqüència de l'acumulació de glicogen. Altres treballs han corroborat el paper causal del glicogen en la neurodegeneració observada en models animals d'LD. En primer lloc, l'eliminació de la PTG també pot prevenir la manifestació de l'LD, tant en el KO de malina com en el de laforina (Turnbull *et al.*, 2011, 2014). A més, l'animal doble KO de laforina i de GS està

desproveït d'LB, i no presenta les típiques alteracions neurològiques inherents a l'LD (Pederson *et al.*, 2013; Turnbull *et al.*, 2011, 2014).

EL GLICOGEN I L'ENVELLIMENT

Una característica rellevant del CNS és l'acumulació de *corpora amylacea* (CA). Els CA són PG presents en els cervells dels humans vells, encara que estiguin sans, i en els d'altres mamífers. Els CA comparteixen diverses característiques amb els LB, incloent-hi la seva composició de polisacàrids insolubles i poc ramificats (revisat a Cavanagh, 1999). És interessant constatar que l'acumulació de CA es veu reforçada per diverses condicions d'estrès, com l'anòxia (Abe i Yagishita, 1995) i la isquèmia (Botez i Rami, 2001), algunes condicions neuropatològiques, com ara l'epilèpsia (Das *et al.*, 2011; Erdamar *et al.*, 2000; Loiseau *et al.*, 1992, 1993; Radhakrishnan *et al.*, 2007), l'esquizofrènia, la síndrome de Down, la malaltia d'Alzheimer (Cavanagh, 1999; Cisse *et al.*, 1993; Nishi *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2000; Singhrao *et al.*, 1993), i altres condicions neurodegeneratives (Kosaka *et al.*, 1981; Nishi *et al.*, 2003; Robitaille *et al.*, 1980). Sorprenentment, la importància de l'acumulació de PG en relació amb l'envelliment s'ha passat per alt. No se sap si l'acumulació progressiva d'aquests agregats en les neurones és perjudicial per a la funció neurològica i la supervivència. Per això, vàrem comparar la distribució, la composició de proteïnes i la localització cel·lular de PG en els cervells de ratolins vells (és a dir, els anomenats CA en humans) amb els que es troben en un model d'LD (LB), és a dir, el ratolí Malin^{KO} (Sinadinos *et al.*, 2014). Les nostres observacions indicaren que en els cervells dels ratolins vells s'acumulen agregats basats en glicogen que són similars als LB pel que fa a la localització i per la presència d'una sèrie de proteïnes metabòliques i de resposta a l'estrès. Per tant, l'acumulació de CA relacionada amb l'edat s'assembla a les primeres etapes de la deposició massiva de glicogen observat en models animals d'LD. Endemés, per tal d'analitzar el paper d'MGS i el glicogen en la formació de CA durant l'envelliment, es va estudiar el model de ratolí MGS^{KO}. Aquest animal no va generar CA amb l'envelliment, la qual cosa indica que es requereix la síntesi de glicogen per formar-se (figura 5). Per tant, arribarem a la conclusió que l'MGS i, probablement, altres proteïnes relacionades amb el metabolisme del glicogen tenen un paper crucial en els fenòmens d'envelliment del cervell, i que els CA i els LB són etapes diferents d'un mateix procés fisiopatològic. Més sorprenent va ser encara el fet que en els cervells dels animals MGS^{KO} no es va detectar cap dels agregats de diverses proteïnes de resposta a l'estrès, incloent-hi α -sinucleïna, Hsp70 i ubiquitina, presents en els cervells dels ratolins WT vells i en els KO de malina. Aquesta important troballa, completament inesperada, del nostre treball indica que la síntesi de glicogen està implicada causalment en la formació d'agregats de proteïnes.

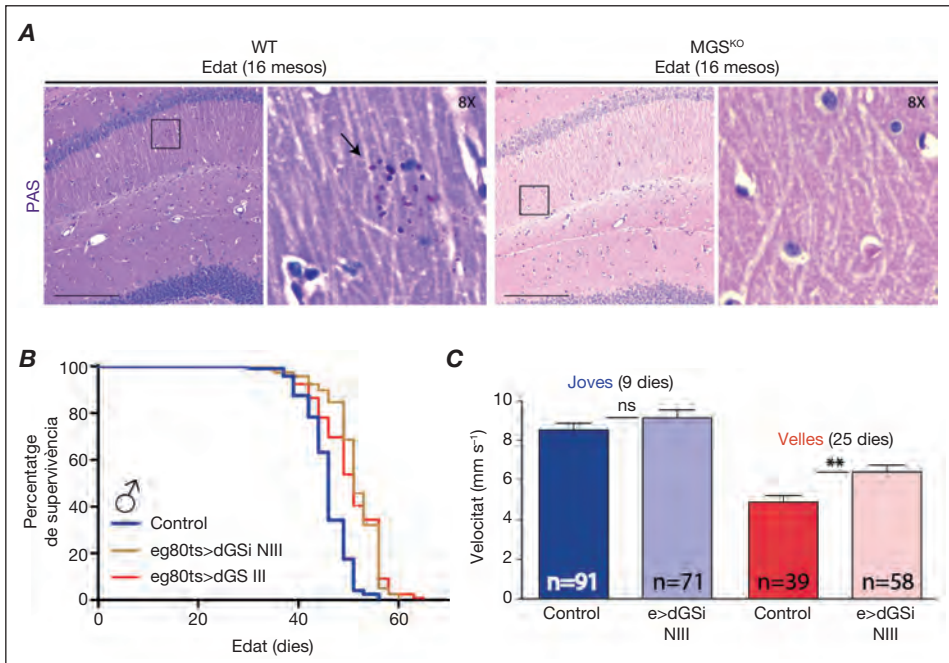


FIGURA 5. A. L'acumulació de CA dependent de l'envelliment requereix MGS. Els cervells dels ratolins normals de setze mesos d'edat mostren CA per tinció de PAS, mentre que els cervells dels MGS^{KO} de la mateixa edat no ho fan.

B. Increment de la vida de les mosques mascles amb una expressió reduïda de GS específicament en les neurones. El gràfic representa les corbes de supervivència de línies amb una expressió reduïda de GS específicament en les neurones (eg80ts>dGSi NIII i eg80ts>dGS III).

C. Millora de l'activitat locomotora en mosques mascles velles amb una expressió reduïda de GS específicament en les neurones. El gràfic representa la velocitat mitjana d'escalada de mosques joves i velles, control i modificades. Adaptat de Sinadinos *et al.*, 2014.

** $p < 0,01$

L'augment de l'acumulació d'aquests marcadors en els cervells dels ratolins joves KO de malina és consistent amb aquesta proposta. Sobre la base de les nostres observacions, proposem que l'acumulació progressiva de glicogen en les neurones és un fenomen molt estès en la població humana envellida que contribueix a la disminució neurològica, i que l'LD resultant de mutacions rares en la malina i la laforina augmenta dràsticament la velocitat d'aquest procés. Reforçant aquesta idea vàrem demostrar que, en *Drosophila*, una reducció en l'acumulació de glicogen neuronal té un efecte beneficiós, ja que redueix el declivi funcional relacionat amb l'edat. En el cas de *Drosophila* també s'acumula glicogen en els processos neuronals durant el ràpid envelliment, i les mosques de més edat, d'una manera similar

als ratolins, presenten grànuls de glicogen en els processos neuronals (Sinadinos *et al.*, 2014). Disminuint de manera específica la GS de les neurones es redueix l'acumulació de PG, es millora la capacitat de l'aparell locomotor en les mosques velles i, almenys els mascles, viuen més (figura 5). En conjunt, les nostres dades indiquen que l'acumulació de glicogen en les neurones durant l'envelliment és un procés conservat evolutivament des de les mosques fins als mamífers. També hem identificat l'acumulació de PG neuronal com un factor que contribueix al deteriorament neuronal durant l'envelliment en *Drosophila* i apuntem la síntesi de glicogen com un possible objectiu per abordar el deteriorament del sistema nerviós relacionat amb l'edat. Mitjançant la utilització d'eines genètiques potents, hem demostrat que el glicogen neuronal és important per a la funció cerebral i que, en contra de la creença general, les neurones tenen un metabolisme del glicogen actiu, tot i que han de mantenir els nivells del polisacàrid sota control perquè una sobreacumulació en causa la neurodegeneració. Aquest és el cas de l'LD, una forma devastadora de l'epilèpsia i potser també de la disminució funcional relacionada amb l'envelliment a través de la generació de CA. La investigació addicional en les implicacions del metabolisme del glicogen al cervell ajudarà a aclarir els mecanismes patològics que condueixen al deteriorament del cervell en l'envelliment normal i en algunes malalties neurològiques. A més, les estratègies terapèutiques per inhibir la síntesi de glicogen poden oferir una cura potencial per a l'LD i un enfocament per abordar el deteriorament del sistema nerviós relacionat amb l'envelliment.

AGRAÏMENTS

Agraïxo al doctor Jordi Duran (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona) el seu ajut en la preparació d'aquest text.

Aquest treball és una adaptació al català de l'article «Brain glycogen in health and disease», de J. Duran i J. J. Guinovart, publicat el 2015 a *Molecular Aspects of Medicine*, 46, p. 70-77. [DOI: 10.1016/j.mam.2015.08.007]

Aquesta investigació fou finançada pel Ministeri d'Economia, Indústria i Competitivitat (SAF2014-54525-P), la Fundació Areces (CIVP16A1862) i el CIBER de Diabetis i Malalties Metabòliques Associades (ISCIII).

REFERÈNCIES

- ABE, H.; YAGISHITA, S. (1995). «Massive appearance of corpora amylacea in postnatal anoxic encephalopathy». *Clin. Neuropathol.*, 14 (4), p. 207-210.
- AGUADO, C.; SARKAR, S.; KOROLCHUK, V. I.; CRIADO, O.; VERNIA, S.; BOYA, P.; SANZ, P.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; KNECHT, E.; RUBINSZTEIN, D. C. (2010). «Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy». *Hum. Mol. Genet.*, 19 (14), p. 2867-2876.
- BELANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. (2011). «Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation». *Cell Metab.*, 14 (6), p. 724-738.
- BERNARD-HELARY, K.; LAPOUBLE, E.; ARDOUREL, M.; HEVOR, T.; CLOIX, J. F. (2000). «Correlation between brain glycogen and convulsive state in mice submitted to methionine sulfoximine». *Life Sci.*, 67 (14), p. 1773-1781.
- BOTEZ, G.; RAMI, A. (2001). «Immunoreactivity for Bcl-2 and C-Jun/AP1 in hippocampal corpora amylacea after ischaemia in humans». *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 27 (6), p. 474-480.
- BROWN, A. M. (2004). «Brain glycogen re-awakened». *J. Neurochem.*, 89 (3), p. 537-552.
- BROWN, A. M.; TEKKOK, S. B.; RANSOM, B. R. (2003). «Glycogen regulation and functional role in mouse white matter». *J. Physiol.*, 549 (Pt 2), p. 501-512.
- CATALDO, A. M.; BROADWELL, R. D. (1986). «Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes». *J. Neurocytol.*, 15 (4), p. 511-524.
- CAVANAGH, J. B. (1999). «Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases». *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 29 (2-3), p. 265-295.
- CHAN, E. M.; YOUNG, E. J.; IANZANO, L.; MUNTEANU, I.; ZHAO, X.; CHRISTOPOULOS, C. C.; AVANZINI, G.; ELIA, M.; ACKERLEY, C. A.; JOVIC, N. J.; BOHLEGA, S.; ANDERMANN, E.; ROULEAU, G. A.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; MINASSIAN, B. A.; SCHERER, S. W. (2003). «Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy». *Nat. Genet.*, 35 (2), p. 125-127.
- CHENG, A.; ZHANG, M.; GENTRY, M. S.; WORBY, C. A.; DIXON, J. E.; SALTIEL, A. R. (2007). «A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease». *Genes Dev.*, 21 (19), p. 2399-2409.
- CISSE, S.; PERRY, G.; LACOSTE-ROYAL, G.; CABANA, T.; GAUVREAU, D. (1993). «Immunochemical identification of ubiquitin and heat-shock proteins in corpora amylacea from normal aged and Alzheimer's disease brains». *Acta Neuropathol.*, 85 (3), p. 233-240.
- CLOIX, J. F.; TAHI, Z.; BOISSONNET, A.; HEVOR, T. (2010). «Brain glycogen and neurotransmitter levels in fast and slow methionine sulfoximine-selected mice». *Exp. Neurol.*, 225 (2), p. 274-283.
- CRERAR, M. M.; KARLSSON, O.; FLETTERICK, R. J.; HWANG, P. K. (1995). «Chimeric muscle and brain glycogen phosphorylases define protein domains governing isozyme-specific responses to allosteric activation». *J. Biol. Chem.*, 270 (23), p. 13748-13756.
- CRIADO, O.; AGUADO, C.; GAYARRE, J.; DURAN-TRIO, L.; GARCIA-CABRERO, A. M.; VERNIA, S.; SAN MILLÁN, B.; HEREDIA, M.; ROMÁ-MATEO, C.; MOURON, S.; JUANA-LÓPEZ, L.; DOMÍNGUEZ, M.; NAVARRO, C.; SERRATOSA, J. M.; SANCHEZ, M.; SANZ, P.; BOVOLENTA, P.; KNECHT, E.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S. (2012). «Lafora bodies

- and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy». *Hum. Mol. Genet.*, 21 (7), p. 1521-1533.
- CRUZ, N. F.; DIENEL, G. A. (2002). «High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22 (12), p. 1476-1489.
- DAS, A.; BALAN, S.; MATHEW, A.; RADHAKRISHNAN, V.; BANERJEE, M.; RADHAKRISHNAN, K. (2011). «Corpora amylacea deposition in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy: A new role for an old gene?». *Indian J. Hum. Genet.*, 17 (Suppl. 1), S41-47.
- DURAN, J.; GRUART, A.; GARCÍA-ROCHA, M.; DELGADO-GARCÍA, J. M.; GUINOVAR, J. J. (2014). «Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease». *Hum. Mol. Genet.*, 23 (12), p. 3147-3156.
- DURAN, J.; SAEZ, I.; GRUART, A.; GUINOVAR, J. J.; DELGADO-GARCÍA, J. M. (2013). «Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 33 (4), p. 550-556.
- DURAN, J.; TEVY, M. F.; GARCÍA-ROCHA, M.; CALBÓ, J.; MILÁN, M.; GUINOVAR, J. J. (2012). «Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice». *EMBO Mol. Med.*, 4 (8), p. 719-729.
- ERDAMAR, S.; ZHU, Z. Q.; HAMILTON, W. J.; ARMSTRONG, D. L.; GROSSMAN, R. G. (2000). «Corpora amylacea and heat shock protein 27 in Ammon's horn sclerosis». *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59 (8), p. 698-706.
- FRANKEN, P.; GIP, P.; HAGIWARA, G.; RUBY, N. F.; HELLER, H. C. (2003). «Changes in brain glycogen after sleep deprivation vary with genotype». *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285 (2), R413-419.
- GARYALI, P.; SIWACH, P.; SINGH, P. K.; PURI, R.; MITTAL, S.; SENGUPTA, S.; PARIHAR, R.; GANESH, S. (2009). «The malin-laforin complex suppresses the cellular toxicity of misfolded proteins by promoting their degradation through the ubiquitin-proteasome system». *Hum. Mol. Genet.*, 18 (4), p. 688-700.
- GENTRY, M. S.; WORBY, C. A.; DIXON, J. E. (2005). «Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102 (24), p. 8501-8506.
- GIP, P.; HAGIWARA, G.; RUBY, N. F.; HELLER, H. C. (2002). «Sleep deprivation decreases glycogen in the cerebellum but not in the cortex of young rats». *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 283 (1), R54-59.
- HERZOG, R. I.; CHAN, O.; YU, S.; DZIURA, J.; MCNAY, E. C.; SHERWIN, R. S. (2008). «Effect of acute and recurrent hypoglycemia on changes in brain glycogen concentration». *Endocrinology*, 149 (4), p. 1499-1504.
- IBRAHIM, M. Z.; ATLAN, H.; MIQUEL, J.; CASTELLANI, P. (1970). «Synthetic and hydrolytic enzymes of glycogen in the normal and the irradiated rat brain». *Radiat. Res.*, 43 (2), p. 341-356.
- INOUE, N.; MATSUKADO, Y.; GOTO, S.; MIYAMOTO, E. (1988). «Localization of glycogen synthase in brain». *J. Neurochem.*, 50 (2), p. 400-405.
- KNECHT, E.; AGUADO, C.; SARKAR, S.; KOROLCHUK, V. I.; CRIADO-GARCÍA, O.; VERNIA, S.; BOYA, P.; SANZ, P.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; RUBINSZTEIN, D. C. (2010). «Impaired autophagy in Lafora disease». *Autophagy*, 6 (7), p. 991-993.

- KONG, J.; SHEPEL, P. N.; HOLDEN, C. P.; MACKIEWICZ, M.; PACK, A. I.; GEIGER, J. D. (2002). «Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep». *J. Neurosci.*, 22 (13), p. 5581-5587.
- KOSAKA, K.; MATSUSHITA, M.; OYANAGI, S.; UCHIYAMA, S.; IWASE, S. (1981). «Pallido-nigro-luysial atrophy with massive appearance of corpora amylacea in the CNS». *Acta Neuropathol.*, 53 (2), p. 169-172.
- LIU, Y.; WANG, Y.; WU, C.; ZHENG, P. (2009). «Deletions and missense mutations of EPM2A exacerbate unfolded protein response and apoptosis of neuronal cells induced by endoplasmic reticulum stress». *Hum. Mol. Genet.*, 18 (14), p. 2622-2631.
- LOISEAU, H.; MARCHAL, C.; VITAL, A.; VITAL, C.; ROUGIER, A.; LOISEAU, P. (1992). «Occurrence of polyglucosan bodies in temporal lobe epilepsy». *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 55 (11), p. 1092-1093.
- (1993). «Polysaccharide bodies: an unusual finding in a case of temporal epilepsy. Review of the literature». *Rev. Neurol.*, 149 (3), p. 192-197.
- MATSUI, T.; ISHIKAWA, T.; ITO, H.; OKAMOTO, M.; INOUE, K.; LEE, M. C.; FUJIKAWA, T.; ICHITANI, Y.; KAWANAKA, K.; SOYA, H. (2012). «Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise». *J. Physiol.*, 590 (3), p. 607-616.
- MINASSIAN, B. A.; LEE, J. R.; HERBRICK, J. A.; HUIZENGA, J.; SODER, S.; MUNGALL, A. J.; DUNHAM, I.; GARDNER, R.; FONG, C. Y.; CARPENTER, S.; JARDIM, L.; SATISHCHANDRA, P.; ANDERMANN, E.; SNEAD, O. C., 3rd; LOPES-CENDES, I.; TSUI, L. C.; DELGADO-ESCUETA, A. V.; ROULEAU, G. A.; SCHERER, S. W. (1998). «Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy». *Nat. Genet.*, 20 (2), p. 171-174.
- NELSON, S. R.; SCHULZ, D. W.; PASSONNEAU, J. V.; LOWRY, O. H. (1968). «Control of glycogen levels in brain». *J. Neurochem.*, 15 (11), p. 1271-1279.
- NISHI, K.; TANEGASHIMA, A.; YAMAMOTO, Y.; USHIYAMA, I.; IKEMOTO, K.; YAMASAKI, S.; NISHIMURA, A.; RAND, S.; BRINKMANN, B. (2003). «Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology». *Leg. Med. Tokyo*, 5 (3), p. 117-131.
- NISHIMURA, A.; IKEMOTO, K.; SATOH, K.; YAMAMOTO, Y.; RAND, S.; BRINKMANN, B.; NISHI, K. (2000). «The carbohydrate deposits detected by histochemical methods in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal formation of patients with schizophrenia, Down's syndrome and dementia, and aged person». *Glycoconj. J.*, 17 (11), p. 815-822.
- PEDERSON, B. A.; TURNBULL, J.; EPP, J. R.; WEAVER, S. A.; ZHAO, X.; PENCEA, N.; ROACH, P. J.; FRANKLAND, P.; ACKERLEY, C. A.; MINASSIAN, B. A. (2013). «Inhibiting glycogen synthesis prevents Lafora disease in a mouse model». *Ann. Neurol.*, 74 (2), p. 297-300.
- PELLEGGRI, G.; ROSSIER, C.; MAGISTRETTI, P. J.; MARTIN, J. L. (1996). «Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase». *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 38 (2), p. 191-199.
- PETIT, J. M.; TOBLER, I.; ALLAMAN, I.; BORBELY, A. A.; MAGISTRETTI, P. J. (2002). «Sleep deprivation modulates brain mRNAs encoding genes of glycogen metabolism». *Eur. J. Neurosci.*, 16 (6), p. 1163-1167.
- PFEIFFER-GUGLIELMI, B.; FLECKENSTEIN, B.; JUNG, G.; HAMPRECHT, B. (2003). «Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies». *J. Neurochem.*, 85 (1), p. 73-81.

- PURI, R.; SUZUKI, T.; YAMAKAWA, K.; GANESH, S. (2012). «Dysfunctions in endosomal-lysosomal and autophagy pathways underlie neuropathology in a mouse model for Lafora disease». *Hum. Mol. Genet.*, 21 (1), p. 175-184.
- RADHAKRISHNAN, A.; RADHAKRISHNAN, K.; RADHAKRISHNAN, V. V.; MARY, P. R.; KESAVADAS, C.; ALEXANDER, A.; SARMA, P. S. (2007). «Corpora amylacea in mesial temporal lobe epilepsy: clinico-pathological correlations». *Epilepsy Res.*, 74 (2-3), p. 81-90.
- RAO, S. N.; MAITY, R.; SHARMA, J.; DEY, P.; SHANKAR, S. K.; SATISHCHANDRA, P.; JANA, N. R. (2010). «Sequestration of chaperones and proteasome into Lafora bodies and proteasomal dysfunction induced by Lafora disease-associated mutations of malin». *Hum. Mol. Genet.*, 19 (23), p. 4726-4734.
- ROACH, P. J. (2015). «Glycogen Phosphorylation and Lafora disease». *Mol. Aspects Med.*, 46, p. 78-84.
- ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; HURLEY, T. D.; TAGLIABRACCI, V. S. (2012). «Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes». *Biochem. J.*, 441 (3), p. 763-787.
- ROBITAILLE, Y.; CARPENTER, S.; KARPATI, G.; DIMAURO, S. D. (1980). «A distinct form of adult polyglucosan body disease with massive involvement of central and peripheral neuronal processes and astrocytes: a report of four cases and a review of the occurrence of polyglucosan bodies in other conditions such as Lafora's disease and normal ageing». *Brain*, 103 (2), p. 315-336.
- SAEZ, I.; DURAN, J.; SINADINOS, C.; BELTRAN, A.; YANES, O.; TEVY, M. F.; MARTÍNEZ-PONS, C.; MILÁN, M.; GUINOVART, J. J. (2014). «Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 34 (6), p. 945-955.
- SCHARF, M. T.; NAIDOO, N.; ZIMMERMAN, J. E.; PACK, A. I. (2008). «The energy hypothesis of sleep revisited». *Prog. Neurobiol.*, 86 (3), p. 264-280.
- SENGUPTA, S.; BADHWAR, I.; UPADHYAY, M.; SINGH, S.; GANESH, S. (2011). «Malin and laforin are essential components of a protein complex that protects cells from thermal stress». *J. Cell Sci.*, 124 (13), p. 2277-2286.
- SERRATOSA, J. M.; GÓMEZ-GARRE, P.; GALLARDO, M. E.; ANTA, B.; BERNABÉ, D. B. de; LINDHOUT, D.; AUGUSTIJN, P. B.; TASSINARI, C. A.; MALAFOSSE, R. M.; TOPCU, M.; GRID, D.; DRAVET, C.; BERKOVIC, S. F.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S. (1999). «A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2)». *Hum. Mol. Genet.*, 8 (2), p. 345-352.
- SHARMA, J.; RAO, S. N.; SHANKAR, S. K.; SATISHCHANDRA, P.; JANA, N. R. (2011). «Lafora disease ubiquitin ligase malin promotes proteasomal degradation of neuronatin and regulates glycogen synthesis». *Neurobiol. Dis.*, 44 (1), p. 133-141.
- SINADINOS, C.; VALLES-ORTEGA, J.; BOULAN, L.; SOLSONA, E.; TEVY, M. F.; MARQUEZ, M.; DURAN, J.; LOPEZ-IGLESIAS, C.; CALBÓ, J.; BLASCO, E.; PUMAROLA, M.; MILÁN, M.; GUINOVART, J. J. (2014). «Neuronal glycogen synthesis contributes to physiological aging». *Aging Cell*, 13 (5), p. 935-945.
- SINGHRAO, S. K.; NEAL, J. W.; NEWMAN, G. R. (1993). «Corpora amylacea could be an indicator of neurodegeneration». *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 19 (3), p. 269-276.
- SUZUKI, A.; STERN, S. A.; BOZDAGI, O.; HUNTLEY, G. W.; WALKER, R. H.; MAGISTRETTI, P. J.; ALBERINI, C. M. (2011). «Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation». *Cell*, 144 (5), p. 810-823.

- SWANSON, R. A.; MORTON, M. M.; SAGAR, S. M.; SHARP, F. R. (1992). «Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography». *Neuroscience*, 51 (2), p. 451-461.
- TAGLIABRACCI, V. S.; HEISS, C.; KARTHIK, C.; CONTRERAS, C. J.; GLUSHKA, J.; ISHIHARA, M.; AZADI, P.; HURLEY, T. D.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. (2011). «Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease». *Cell Metab.*, 13 (3), p. 274-282.
- TURNBULL, J.; EPP, J. R.; GOLDSMITH, D.; ZHAO, X.; PENCEA, N.; WANG, P.; FRANKLAND, P. W.; ACKERLEY, C. A.; MINASSIAN, B. A. (2014). «PTG protein depletion rescues malin-deficient Lafora disease in mouse». *Ann. Neurol.*, 75 (3), p. 442-446.
- TURNBULL, J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ZHAO, X.; CORTEZ, M. A.; PENCEA, N.; TIBERIA, E.; PILIGUIAN, M.; ROACH, P. J.; WANG, P.; ACKERLEY, C. A.; MINASSIAN, B. A. (2011). «PTG depletion removes Lafora bodies and rescues the fatal epilepsy of Lafora disease». *PLOS Genet.*, 7 (4), e1002037.
- TURNBULL, J.; WANG, P.; GIRARD, J. M.; RUGGIERI, A.; WANG, T. J.; DRAGINOV, A. G.; KAMEKA, A. P.; PENCEA, N.; ZHAO, X.; ACKERLEY, C. A.; MINASSIAN, B. A. (2010). «Glycogen hyperphosphorylation underlies Lafora body formation». *Ann. Neurol.*, 68 (6), p. 925-933.
- VALLES-ORTEGA, J.; DURAN, J.; GARCIA-ROCHA, M.; BOSCH, C.; SAEZ, I.; PUJADAS, L.; SERAFIN, A.; CAÑAS, X.; SORIANO, E.; DELGADO-GARCÍA, J. M.; GRUART, A.; GUINOVART, J. J. (2011). «Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease». *EMBO Mol. Med.*, 3 (11), p. 667-681.
- VERNIA, S.; RUBIO, T.; HEREDIA, M.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; SANZ, P. (2009). «Increased endoplasmic reticulum stress and decreased proteasomal function in Lafora disease models lacking the phosphatase laforin». *PLOS One*, 4 (6), e5907.
- VILCHEZ, D.; ROS, S.; CIFUENTES, D.; PUJADAS, L.; VALLÈS, J.; GARCÍA-FOJEDA, B.; CRIADO-GARCÍA, O.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, E.; MEDRAÑO-FERNÁNDEZ, I.; DOMÍNGUEZ, J.; GARCÍA-ROCHA, M.; SORIANO, E.; RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S.; GUINOVART, J. J. (2007). «Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy». *Nat. Neurosci.*, 10 (11), p. 1407-1413.
- WENDER, R.; BROWN, A. M.; FERN, R.; SWANSON, R. A.; FARRELL, K.; RANSOM, B. R. (2000). «Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter». *J. Neurosci.*, 20 (18), p. 6804-6810.
- WORBY, C. A.; GENTRY, M. S.; DIXON, J. E. (2008). «Malin decreases glycogen accumulation by promoting the degradation of protein targeting to glycogen (PTG)». *J. Biol. Chem.*, 283 (7), p. 4069-4076.

