

**ELS PREMIS NOBEL
DE L'ANY 2000**

**SOBRE EL
PREMI NOBEL DE MEDICINA
CONCEDIT A**

**ARVID CARLSSON,
PAUL GREENGARD I
ERIC KANDEL,**

**A CÀRREC DE
FRANCESC ARTIGAS,
JAVIER FORN I
CARLES SOLSONA**

ARVID CARLSSON

Arvid Carlsson va néixer el 25 de gener del 1923 a Uppsala (Suècia). L'any 1951 va obtenir la llicenciatura en Medicina a la Universitat de Lund. L'any 1959 ja era catedràtic (professor) al Departament de Farmacologia de la Universitat de Göteborg, on ha dut a terme la pràctica totalitat de la seva carrera científica. Des del 1989 és professor emèrit. Abans del Premi Nobel, Arvid Carlsson ha rebut més d'una vintena de premis i distincions diversos d'arreu del món, que honoren les seves aportacions al camp de la neurotransmissió. És autor d'uns 400 articles en revistes científiques, autor i editor de nombrosos llibres especialitzats en Neuroquímica i Neurofarmacologia i membre de nombroses societats científiques.

D'entre les diverses aportacions fetes per Arvid Carlsson al món de la Medicina, la més important, sens dubte, ha estat la identificació de la dopamina com un dels neurotransmissors més importants del cervell i el fet d'entendre el seu paper en el funcionament normal i patològic del sistema nerviós. La dopamina és una de les amines neurotransmissores del cervell, juntament amb l'acetilcolina, la serotonina i la noradrenalina. Té un paper molt important en diversos aspectes clau de la conducta humana: moviment, estat d'ànim, motivació i recompensa. Des del seu descobriment, l'any 1910, els científics creien que la dopamina era tan sols un producte intermediari en la síntesi d'un altre neurotransmissor, la noradrenalina. Aquestes idees van canviar radicalment amb el treball dut a terme per Arvid Carlsson durant les dècades dels cinquanta i seixanta. Diversos equips havien caracteritzat, mitjançant mètodes químics i histològics, l'existència de les amines neurotransmissores —catecolamines i serotonina— en el cervell dels mamífers. En particular, el treball dels neuroanatomistes de l'Institut Karolinska d'Estocolm (N. A. Hillarp i els seus deixebles A. Dahlström, K. Fuxe, T. Hökfelt i altres) avançaren en el coneixement de l'anatomia dels sistemes aminèrgics. Aquests estudis van proporcionar una base anatòmica on enquadrar les troballes farmacològiques de Carlsson, que va demostrar de forma clara que la

dopamina era un neurotransmissor per ell mateix en unes àrees discretes del cervell (especialment als ganglis basals o nuclis de la base) i no un precursor de la noradrenalina sense funció fisiològica. La utilització d'un alcaloide natural, la reserpina (extret de la *Rauwolfia serpentina*), va permetre Carlsson d'entendre els processos d'emmagatzematge, alliberament i metabolització de les catecolamines i la serotonina en els terminals sinàptics.

Gràcies a les seves investigacions, avui dia coneixem amb detall els processos metabòlics i funcionals que transcorren a les sinapsis del sistema nerviós central. L'aminoàcid L-tirosina es transforma en L-DOPA gràcies a l'existència de l'enzim tirosina hidroxilasa, present únicament en les neurones dopaminèrgiques i noradrenèrgiques del cervell. Un cop transformat en L-DOPA, es descarboxila ràpidament per acció d'un altre enzim, la descarboxilasa dels aminoàcids aromàtics, present en diversos tipus cel·lulars, i es transforma en dopamina. Aquesta s'emmagatzema en vesícules sinàptiques, per acció d'un transportador específic. Davant l'arribada d'un impuls nerviós, que despolaritza la membrana de l'axó, s'obren canals de Ca^{2+} dependents de voltatge i entren ions Ca^{2+} , necessaris per a la fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana del terminal nerviós, la qual cosa fa que el contingut de la vesícula es buidi a l'espai sinàptic. La dopamina actua sobre receptors específics a la membrana de la neurona postsinàptica, que formen part de complexos proteics (receptor + proteïna G + enzim o canal iònic) i indueix senyals intracel·lulars en aquesta neurona. Actualment es coneixen cinc receptors diferents dopaminèrgics, D_1 a D_5 , agrupats en dues famílies, la $D1$ (receptors D_1 i D_5) i la $D2$ (D_2 , D_3 i D_4), que es diferencien per les seves característiques farmacològiques, per les proteïnes G acoblades, i pels sistemes de transducció de senyals associats.

Al cervell dels mamífers hi ha dos sistemes dopaminèrgics diferenciats. El sistema nigroestriatal s'origina a la substància negra, àrea del mesencèfal anomenada així pel seu color fosc. La substància negra, juntament amb el nucli estriat (caudat i putàmen als primats superiors), el globus pàl·lid i el nucli subtalàmic formen part dels anomenats ganglis basals o nuclis de la base, que

tenen un paper cabdal en la regulació de l'activitat motora. La substància negra es divideix en dues parts ben diferenciades: la part compacta i la part reticulada. Les neurones dopaminèrgiques de la substància negra compacta projecten al nucli estriat, on innerven profusament les neurones estriatals. La major part de les neurones estriatals són neurones GABAèrgiques de mida mitjana, amb dendrites que tenen moltes espines, i projecten cap al globus pàl·lid (via indirecta) i cap a la substància negra (via directa). Les neurones GABAèrgiques del nucli estriat integren senyals excitadors que provenen de l'escorça i el tàlem, i senyals ascendents, que provenen dels nuclis aminèrgics del mesencèfal (sobretot, dopamina i serotonina). Els cossos de les neurones dopaminèrgiques es localitzen a la part compacta de la substància negra, mentre que la via estriatonigral arriba a la part reticulada, que conté les dendrites de les neurones dopaminèrgiques i neurones GABAèrgiques que projecten al tàlem motor, entre altres àrees. Al seu torn, les neurones del tàlem motor projecten a l'escorça motora, on regulen l'activitat de les vies motores de la medulla espinal. Normalment, les neurones GABAèrgiques de la substància negra reticulada estan actives de forma espontània, la qual cosa inhibeix les neurones dels nuclis motors del tàlem i, per tant, la sortida motora de l'escorça. L'augment d'activitat de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra compacta, a través de les seves accions a nivell del nucli estriat, atura les neurones GABAèrgiques de la substància negra reticulada, la qual cosa produeix una desinhibició del tàlem i l'escorça motora i un augment de l'activitat motriu.

La integritat d'aquest circuit còrtico-estriato-nigro-talàmic és essencial per a la regulació de l'activitat motora. Arvid Carlsson va demostrar que els ganglis basals —en especial estriat i substància negra— contenen concentracions molt altes de dopamina i que aquesta és necessària per al bon funcionament d'aquest circuit. En efecte, el tractament de rosegadors amb reserpina (que redueix dràsticament el contingut cerebral de les amines neurotransmissores) produïa fortes alteracions de la deambulació, que s'assemblaven als símptomes dels malalts de Parkinson. El tractament amb L-DOPA, aminoàcid precursor de la dopamina, revertia els efectes

de la reserpina i normalitzava el contingut cerebral de dopamina. Així, doncs, semblava existir una relació directa entre manca de dopamina i simptomatologia de la malaltia de Parkinson. Aquesta observació, reforçada amb la constatació que la dopamina era veritablement un neurotransmissor al cervell dels mamífers, va dur O. Hornykiewicz, un neuròleg de Viena, a proposar que el mal de Parkinson era degut a un dèficit funcional de la neurotransmissió dopaminèrgica i a emprar la L-DOPA com a tractament per a la malaltia de Parkinson. Avui dia sabem que aquesta malaltia és deguda a una degeneració de les neurones dopaminèrgiques de la substància negra compacta. Per raons encara desconegudes, aquestes neurones sofreixen un procés de mort cel·lular, cosa que produeix una reducció dràstica de la quantitat de dopamina al nucli estriat. La manca de dopamina produeix la simptomatologia típica d'aquesta malaltia: tremolors, rigidesa muscular i lentitud de moviments. Gràcies a diverses innovacions tecnològiques, com ara les tècniques de neuroimatge (per exemple, la tomografia per emissió de positrons; *PET scanning*), avui dia es pot observar el dèficit de dopamina al nucli estriat de malalts de Parkinson i els efectes del tractament. Malgrat que el tractament de la malaltia amb L-DOPA no és l'ideal (presenta tolerància al cap d'un temps i es produeixen acinèsies sobtades), és ara per ara, més de trenta anys després del seu descobriment, el tractament d'elecció per a aquesta malaltia neurodegenerativa.

L'altre gran sistema dopaminèrgic existent al cervell és el que s'origina en una altra àrea del mesencèfal, l'àrea tegmental ventral. A diferència de les neurones de la substància negra, aquestes altres projecten cap a regions de l'escorça i del sistema límbic implicades en funcions superiors, com l'atenció, la cognició, la memòria i la regulació dels estats d'ànim. Aquest sistema se subdivideix en dos (mesolímbic i mesocortical), segons les àrees innervades (tubercle olfatori, nucli *accumbens*, amígdala per al mesolímbic i escorça prefrontal per al mesocortical), però a efectes funcionals se solen tractar com un de sol, ateses les relacions existents entre ambdós. Des d'un punt de vista neuroquímic i farmacològic, els sistemes originats a la substància negra i a l'àrea teg-

mental ventral no presenten grans diferències, tan sols en la distribució dels subtipus de receptors de dopamina en cadascuna d'aquestes àrees.

Si el sistema dopaminèrgic originat a la substància negra és important per a una malaltia neurològica —la malaltia de Parkinson—, el de l'àrea tegmental ventral és cabdal per al control de la conducta humana, tant normal com patològica. En efecte, substàncies emprades com a drogues d'abús, com l'amfetamina i els seus derivats més moderns (MDMA o èxtasi), són potents alliberadors de la dopamina. En aquest camp, les conseqüències dels estudis d'Arvid Carlsson han estat tant o més importants que en el camp dels trastorns del moviment. La identificació de la dopamina com a neurotransmissor va iniciar el desenvolupament d'agonistes i antagonistes de les seves accions. La identificació de la clorpromazina i l'haloperidol com a antagonistes no selectius dels receptors dopaminèrgics va obrir unes perspectives insospitades en el tractament de l'esquizofrènia. Aquestes i altres substàncies són emprades encara avui en el tractament de la simptomatologia de l'esquizofrènia i altres trastorns psicòtics. El seu efecte clínic és una reducció de la simptomatologia positiva (al·lucinacions auditives o visuals, pensaments i comportaments aberrants, etc.) amb poc efecte, però, sobre la simptomatologia negativa (manca d'interès, poca relació social, pèrdua de l'afectivitat, etc.). A més, el bloqueig mantingut dels receptors dopaminèrgics produeix importants efectes secundaris (discinècies tardanes) que sovint obliguen a retirar el tractament. Aquests problemes han fet sorgir una nova generació de fàrmacs antipsicòtics, anomenats «atípics», amb accions preferentment antiserotoninèrgiques. Durant els darrers anys, i malgrat la seva situació de professor emèrit, Arvid Carlsson està treballant activament en la superació d'aquests problemes, desenvolupant nous fàrmacs i estudiant possibles noves dianes terapèutiques (per exemple, els receptors D₃). En particular, durant la darrera dècada, Carlsson i el seu equip han estat estudiant les interaccions del glutamat (principal neurotransmissor excitador del cervell) i la dopamina a fi de dissenyar noves estratègies de tractament que minimitzin els efectes nocius del tractament amb els fàrmacs antipsicò-

tics clàssics. Ateses les relacions existents entre dopamina i glutamat als circuits dels ganglis basals esmentats anteriorment, aquests estudis també tenen implicacions en la teràpia de la malaltia de Parkinson. Així, Carlsson i els seus col·laboradors han observat que l'MK-801, antagonista dels receptors glutamatèrgics NMDA, reverteix la reducció de l'activitat motriu induïda per substàncies que buiden les neurones de dopamina. Una altra observació important és que la fenciclidina (*angel... angel dust*), emprada com a droga d'abús, produeix quadres esquizofrènics, igual que l'abús continuat d'amfetamina. La fenciclidina és un antagonista no competitiu del receptor NMDA, mentre que l'amfetamina allibera dopamina. Així, doncs, existeix una relació funcional entre ambdós sistemes que ha possibilitat el disseny de noves molècules amb acció sobre els receptors de glutamat que són actives en models animals de Parkinson (per exemple, degeneració induïda per 6-OHDA o MPTP) i d'esquizofrènia.

Hi ha una dita en Medicina que afirma que les dues maneres més comunes de ser famosos són donar nom a una malaltia (per exemple Alois Alzheimer) o identificar una substància amb funcions fisiològiques o patològiques. Sens dubte, Arvid Carlsson no ha donat nom a cap malaltia, però passarà a la posteritat pel seu descobriment de la dopamina com a neurotransmissor fonamental per al bon funcionament del cervell humà i per les possibilitats que aquest fet ha obert en el tractament de malalties tan devastadores com el Parkinson o l'esquizofrènia.

APROXIMACIÓ INTERDISCIPLINÀRIA DE PAUL GREENGARD A L'ESTUDI DE LA COMUNICACIÓ NEURONAL

1. BREU CURRÍCULUM DE PAUL GREENGARD

Paul Greengard va néixer a Nova York l'11 de desembre de 1925. Després d'estudiar al Hamilton College, va obtenir un doctorat en Neurofisiologia al departament de Biofísica de la Universitat Johns Hopkins el 1953. Després d'uns quants anys de permanència a l'Institut de Psiquiatria i a l'Institut Nacional per a la Recerca Mèdica de Londres, on treballà en enzimologia i metabolisme del sistema nerviós, va tornar als Estats Units. Entre 1958 i 1959 va estar al Laboratori de Bioquímica Clínica dels Instituts Nacionals de la Salut a Bethesda, Maryland, i entre 1959 i 1967 va treballar en la indústria farmacèutica com a director del departament de Bioquímica dels laboratoris de recerca Geigy. El 1968 va ser nomenat professor del Departament de Farmacologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Yale. El 1983 va ser nomenat *Vincent Astor Professor* de la Universitat Rockefeller, on dirigeix fins avui el Laboratori de Neurociència Molecular i Cel·lular. L'any 2000 li ha estat concedit el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina juntament amb Arvid Carlsson i Eric Kandel pels seus treballs sobre comunicació neuronal.

Hi ha dos períodes ben diferenciats en la seva producció científica: abans de 1968 i després de 1968. En la seva època postdoctoral va publicar alguns treballs sobre neurofisiologia, neuroquímica i metabolisme intermediari del teixit nerviós. Destaquen alguns articles en col·laboració amb J. M. Ritchie en què van estudiar el mecanisme d'acció dels anestèsics locals i van establir que era la forma catiònica de l'anestèsic la que inhibia el transport de sodi. Durant l'època en què va ser director de Geigy va publicar diversos treballs sobre el metabolisme hepàtic i la síntesi d'aldosterona *in vitro*. Va ser a partir de 1968, l'any en què va arribar a Yale com a professor, quan va concentrar tots els seus esforços en els estudis dels mecanismes de comunicació neuronal i va iniciar una intensa i productiva activitat científica

que ha estat premiada l'any 2000 amb la concessió del Premi Nobel.

2. ANTECEDENTS CIENTÍFICS I OBJECTIUS DE LES SEVES RECERQUES

La línia de recerca iniciada el 1968 per Greengard sobre els mecanismes de comunicació neuronal es va basar fonamentalment en coneixements previs sobre la transmissió dopaminèrgica en el sistema nerviós central i sobre la funció de l'AMP cíclic i de la fosforilació de proteïnes en la transmissió de senyals.

El descobriment realitzat pel grup de Brodie el 1955 del fet que la reserpina produeix la desaparició total dels dipòsits neuronals de serotonina (Pletscher *et al.*, 1955) va marcar l'inici de la psicofarmacologia moderna. Feia pocs anys que la reserpina, un alcaloide d'origen natural, havia estat introduït en la terapèutica, i havia despertat un enorme interès entre els farmacòlegs i els psiquiatres per les seves propietats tranquil·litzants i antipsicòtiques. També s'havia observat que els pacients sotmesos a tractaments prolongats presentaven sovint trastorns motors de tipus extrapiramidal similars als que caracteritzen la malaltia de Parkinson. El dramàtic efecte de la reserpina sobre els nivells de serotonina, un neurotransmissor cerebral, feia pensar que els efectes depressors centrals de la reserpina eren conseqüència d'aquest efecte bioquímic. Però l'any següent es va descobrir que la reserpina també buidava els dipòsits cerebrals de noradrenalina i dopamina (Holzhaner i Vogt, 1958). Aquestes troballes van marcar l'inici d'una prolongada disputa científica entre els grups de Brodie i els de Carlsson sobre si la responsable dels efectes depressius de la reserpina era la depleció de serotonina o la de catecolamines. És curiós que, gairebé cinquanta anys després d'aquestes descobertes, la controvèrsia encara no estigui resolta. Durant molts anys els fàrmacs utilitzats com a antidepressius han actuat sobre la transmissió noradrenèrgica, però en el darrer decenni els nous fàrmacs antidepressius actuen sobre mecanismes serotoninèrgics, i el substrat

bioquímic de la depressió endògena continua essent una incògnita. Tanmateix, coneixem molt bé el mecanisme dels efectes motors de tipus parkinsonià que produeix la reserpina. Aquests coneixements són deguts en bona part a les recerques de Carlsson, que va demostrar (1957) que l'administració de DOPA, un precursor de les catecolamines, però no la de 5-hidroxitriptòfan, un precursor de la serotonina, antagonitza els efectes motors produïts per l'administració de reserpina. El descobriment del fet que la dopamina es trobava al cervell, localitzada als ganglis basals (Carlsson, 1959) tant en els animals com en els humans, va fer ressaltar la importància clínica d'aquestes descobertes. La troballa fonamental de Hornykiewicz i dels seus col·laboradors de la desaparició gairebé total de dopamina als ganglis basals en els malalts parkinsonians, a causa de la degeneració de la projecció dopaminèrgica des de la substància negra, va donar suport a la hipòtesi de Carlsson d'utilitzar DOPA en el tractament de la malaltia de Parkinson. Els primers assaigs clínics van tenir un èxit rotund i van determinar la introducció de la levodopa en la terapèutica.

El segon pilar de les recerques de Greengard fou el descobriment del paper de l'AMP cíclic com a segon missatger. Estudiant el mecanisme d'acció glicogenolítica de l'adrenalina en cèl·lules hepàtiques, Sutherland i Rall van realitzar el 1957 el transcendent descobriment del fet que quan les membranes de les cèl·lules hepàtiques eren exposades a l'adrenalina es formava un factor termostable que, en ser afegit al citoplasma de les cèl·lules hepàtiques, era capaç de reproduir l'efecte de l'adrenalina i produir la conversió de glicogen en glucosa. Aquest factor es va identificar com el 3,5'-monofosfat d'adenosina o AMP cíclic, un nucleòtid químicament relacionat amb l'ATP. Es va identificar un enzim unit a la membrana, l'adenilat ciclasa, que, en ser activat, converteix l'ATP en AMP cíclic, el qual al seu torn té una vida mitjana curta i és degradat per una fosfodiesterasa a 5'-AMP.

Durant molts anys es va desconèixer el mecanisme per mitjà del qual l'AMP cíclic activa la glicogenòlisi. El 1968 Krebs i els seus col·laboradors van descobrir (Walsh *et al.*, 1968) una proteïna-cinasa que s'activava per concentracions baixes d'AMP cíclic.

La proteïna-cinasa dependent de l'AMP cíclic conté dues subunitats reguladores i dues subunitats catalítiques. Quan l'AMP cíclic s'uneix a l'enzim té lloc un canvi de conformació i s'alliberen les dues subunitats catalítiques amb activitat enzimàtica. Aquestes unitats catalítiques poden fosforilar grups hidroxil de residus de treonina i serina, i d'aquesta manera activen diversos enzims.

Després del descobriment de Krebs, Greengard i els seus col·laboradors van demostrar que la proteïna-cinasa dependent de l'AMP cíclic es troba àmpliament distribuïda en tots els teixits d'espècies animals distintes i allhora en van detectar una elevada concentració al cervell (Miyamoto *et al.*, 1968; Kno i Greengard, 1969). Aquest fet va portar Greengard a emetre la hipòtesi que la unitat reguladora de la proteïna-cinasa és l'únic receptor de l'AMP cíclic i que tots els efectes de l'AMP cíclic es produeixen per l'activació de proteïnes-cinases. D'altra banda, van trobar que la proteïna-cinasa estava concentrada a les fraccions sinàptiques del cervell. Això els va induir a proposar que al cervell l'AMP cíclic no solament podria tenir accions metabòliques similars a les descobertes en altres òrgans, sinó també altres processos moleculars lligats a funcions neuronals específiques, com ara la transmissió sinàptica o el creixement neuronal. Greengard va iniciar un seguit de recerques sistemàtiques per identificar, caracteritzar i purificar les cinases cerebrals dependents de l'AMP cíclic, les fosfatases que alliberen els fosfats incorporats, així com enzims que regulen els nivells d'AMP cíclic, l'adenilat ciclasa i la fosfodiesterasa. En les seves investigacions va dedicar una atenció especial a la recerca i caracterització de proteïnes neuronals regulades per mecanismes de fosforilació. Un enfocament repetidament emprat ha estat la identificació de proteïnes que es fosforilen per estímuls específics, i a continuació caracteritzar aquestes proteïnes amb relació a les seves propietats bioquímiques, anatòmiques i fisiològiques.

Per a la seva recerca, Greengard ha usat un enfocament interdisciplinari, combinant sovint tècniques electrofisiològiques amb tècniques de bioquímica i de biologia molecular.

La importància dels processos de fosforilació en mecanis-

mes neuronals es va confirmar en un seguit d'experiments en animals amb un sistema nerviós simple que permet l'estudi cel·lular dels reflexos neuronals. Un d'aquests models és el cargol marí *Aplysia*, amb el qual Eric Kandel ha realitzat una gran part de les seves recerques amb què ha demostrat que els fenòmens de sensibilització i habituació davant un estímul tenen com a substrat variacions en l'alliberament del neurotransmissor. Doncs bé, en col·laboració amb Greengard, Kandel va poder demostrar que la injecció intraneuronal de la subunitat catalítica de la proteïna-cinasa AMP cíclic dependent regula diferents tipus de canals de K⁺ i modifica l'alliberament del neurotransmissor, efecte que s'ha relacionat amb la memòria a curt i a llarg termini (Castellucci *et al.*, 1980).

3. LA MEVA TROBADA AMB GREENGARD I ELS ANYS DE COL·LABORACIÓ

20

L'octubre de 1968, amb una beca postdoctoral, vaig anar a treballar durant dos anys al Laboratori de Farmacologia Química dels Instituts Nacionals de la Salut, dirigit pel famós farmacòleg Bernard B. Brodie. Tot i que jo no ho sabia, serien, per motius de salut, els dos últims anys de Brodie com a director d'aquell laboratori. Això pot explicar el fet que, encara que al començament vaig seguir una de les línies de recerca clàssica al laboratori, la regulació del metabolisme de la serotonina, de seguida m'orientés cap a un nou camp que s'estava obrint, el dels nucleòtids cíclics com a segons missatgers i les seves possibles funcions en el sistema nerviós. Això em va ser possible perquè aleshores treballava al laboratori de Brodie un bioquímic excel·lent, Gopal Krishna, que acabava de publicar un mètode original, el qual va tenir una gran ressonància, per determinar la formació d'AMP cíclic a partir d'adenina tritrida. Aquest mètode, senzill i ràpid, permetia de valorar l'activitat de l'adenilat ciclase i la formació d'AMP cíclic. En col·laboració amb Krishna, aviat vam poder demostrar que, en talls d'àrees cerebrals distintes incubades *in vitro*, la noradrenalina i la histamina pro-

duïen notables augments de la formació d'AMP cíclic. Hi vam trobar diferències importants segons les àrees i les espècies estudiades. El descobriment que en el conill i en el cobai la histamina és l'agent més potent va ser particularment interessant. En canvi, en la rata, el ratolí, el gat i el mico la noradrenalina era molt més potent que la histamina. També vam fer un estudi sobre la distribució regional d'AMP cíclic al cervell de rata. Posteriorment, i ja a l'Estat espanyol, vaig demostrar (Forn i Valdecasas, 1971) que el liti, un agent molt utilitzat en el tractament de la psicosi maniaco-depressiva, a concentracions terapèutiques inhibia la forma d'AMP cíclic induït per noradrenalina en talls de cervell de rata. Alguns d'aquests resultats, els vaig presentar en un congrés de farmacologia a Milà i van atreure l'atenció de Greengard. La conversa que vam mantenir a Milà va donar origen a una correspondència i finalment a una oferta de Greengard perquè anés a treballar al seu laboratori al departament de Farmacologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Yale. Vaig acceptar la seva invitació i a la darreria de l'any 1973 em vaig traslladar a Yale, on vaig estar com a associat de recerca durant una mica més de quatre anys.

La meva col·laboració amb Greengard va quedar reflectida en deu articles publicats i va ser particularment fructífera en dues àrees a les quals el seu laboratori va dedicar un interès especial: la regulació de l'adenilat ciclase per la dopamina i la funció i la regulació de fosfoproteïnes neuronals específiques.

4. RECERQUES SOBRE ENZIMS QUE REGULEN EL METABOLISME DE L'AMP CÍCLIC

Malgrat que s'havia demostrat que diversos neurotransmissors eren capaços d'augmentar la formació d'AMP cíclic en talls d'àrees cerebrals distintes incubades *in vitro*, no s'havia aconseguit actuar amb neurotransmissors l'adenilat ciclase en homogeneïtzats de teixit cerebral, i tampoc no s'havia pogut demostrar que la dopamina fos capaç d'incrementar la formació d'AMP cíclic. No obstant això, com hem comentat abans, ja s'havia demostrat que la levo-

dopa, un precursor de la dopamina, era eficaç en el tractament de la malaltia de Parkinson. Per demostrar que l'efecte de la dopamina estava lligat funcionalment a la síntesi d'AMP cíclic, calia identificar un adenilat ciclase capaç de sintetitzar AMPc en presència de dopamina. El 1972 Kebabian i Greengard van ser capaços de demostrar l'existència d'un adenilat ciclase en homogeneïtzadors de nucli caudat sensible a la dopamina i que tenia unes característiques molt similars a la de l'hipotètic receptor dopaminèrgic (Kebabian *et al.*, 1972). El mesurament de l'activitat agonista dopaminèrgica, que requeria proves *in vivo* enutjoses, es va fer més precís i senzill mesurant l'activitat de l'adenilat ciclase.

Fins aleshores tampoc no s'havia pogut demostrar que la dopamina aplicada a preparats amb neurones intactes augmentés la concentració d'AMP cíclic. Nosaltres, per mitjà de l'ús de talls de nucli caudat incubats *in vitro*, vam poder demostrar un efecte específic de la dopamina, que es blocava per un antagonista de receptors de dopamina, la flufenazina, i que no es modificava per la presència d'un blocador beta-adenèrgic (Forn *et al.*, 1972). En experiments posteriors vam poder demostrar que les lesions a les vies nigrostriades produeixen un augment de la formació d'AMP cíclic induït per dopamina (DA) en talls de nucli caudat del costat lesionat. Aquests resultats permetien d'explicar el moviment circular contralateral induït per agonistes dopaminèrgics en rates amb lesions unilaterals de les vies nigrostriades (Krueger *et al.*, 1976).

5. RECERQUES SOBRE LES CARACTERÍSTIQUES I LES FUNCIONS DE LES FOSFOPROTEÏNES NEURONALS

Greengard va emprendre des de 1968 una recerca sistemàtica per evidenciar relacions entre la fosforilació de proteïnes i la funció neuronal. Tots els sistemes de fosforilació proteica tenen un mínim de tres components. En primer lloc, les fosfoproteïnes mateixes, que actuen com a substrats: les seves propietats biològiques canvien depenent del fet que es trobin en estat de fosforilació o de desfosforilació. En segon lloc, un conjunt d'enzims, les proteïnes-cina-

ses, fosfotransferases que catalitzen la transferència de fosfat, i finalment, les proteïnes-fosfatases, que desfosforilen les fosfoproteïnes i tornen el sistema al seu estat basal.

Els estudis de Greengard i d'altres han evidenciat que els enzims que regulen la formació d'AMP cíclic i la fosforilació i desfosforilació de proteïnes en el sistema nerviós i els enzims similars existents en altres teixits i òrgans no es diferencien gaire en les seves propietats fonamentals. Aviat es va fer palès que aquells processos específicament neuronals que siguin regulats per mecanismes de fosforilació només seran ben coneguts si coneixem les propietats estructurals, bioquímiques i fisiològiques de les fosfoproteïnes neuronals les funcions de les quals depenen del seu estat de fosforilació/desfosforilació. Per això Greengard va dedicar una atenció particular a la identificació i l'estudi de fosfoproteïnes que es trobessin únicament en teixits nerviosos i que, per tant, podien estar involucrades en funcions exclusives del sistema neuronal. En el curs d'aquestes recerques Greengard ha identificat nombroses proteïnes que semblen trobar-se només en el sistema nerviós i que podrien estar relacionades amb determinades funcions fisiològiques. Entre aquestes fosfoproteïnes podríem destacar la sinapsina I i la DARP-32. Aquestes fosfoproteïnes han estat ben caracteritzades, purificades, aïllades i hom ha identificat alguna de les seves funcions fisiològiques. Són l'exemple més bo de les enormes possibilitats de l'enfocament usat per Greengard, i les descriurem amb un cert detallisme.

23

a) SINAPSINA I

La sinapsina I, que en els primers estudis va rebre el nom de proteïna I, es va identificar per primera vegada el 1972 com un substrat endogen de la proteïna-cinasa dependent de l'AMP cíclic en fraccions sinàptiques d'homogeneïtzats de cervell (Johnson *et al.*, 1972). Posteriorment vam poder demostrar (Sieghart, 1979) que també era un bon substrat per a proteïnes-cinases dependents del calci. La sinapsina I va ser purificada i caracteritzada, i se n'ha aïllat l'RNA missatger corresponent. De seguida es

va demostrar que la sinapsina I tan sols es troba en el sistema nerviós.

Es van portar a terme molts intents per estudiar la regulació de l'estat de fosforilació de la sinapsina I en preparacions de teixit nerviós intacte. Probablement aquests primers intents van fracassar perquè durant l'homogeneïtzació del teixit les proteïnes-fosfatases no es desactivaven. Finalment vam desenvolupar un mètode (Forn i Greengard, 1978) en què l'extracció amb acetat de zinc inhibia les proteïnes-fosfatases endògenes i es conservava l'estat de fosforilació aconseguit a les neurones intactes. Així vam poder demostrar que l'entrada de calci produïda per cicles successius de despolarització i polarització per concentracions elevades de K^+ produeix nombroses transformacions de desfosfoproteïna I en fosfoproteïna I. Aquesta fosforilació es produeix per l'activació d'una proteïna-cinasa dependent de calci/calmodulina. L'augment dels nivells d'AMP cíclic també produeix fosforilació de sinapsina I, per l'activació d'una proteïna-cinasa dependent de l'AMP cíclic. Posteriorment es va demostrar que les fosforilacions dependents del calci i de l'AMP cíclic es produeixen en diferents llocs de la proteïna.

Determinats estudis citoquímics han evidenciat que la sinapsina I es troba en totes les terminacions nervioses, associada amb les vesícules sinàptiques. Estudis bioquímics i observacions de microscòpia electrònica han demostrat que la sinapsina I es troba fixada a la part externa de les membranes de les vesícules sinàptiques. La fosforilació de sinapsina I disminueix la seva afinitat per les vesícules sinàptiques. Posteriorment es va demostrar que breus períodes de conducció nerviosa produeixen un augment de l'estat de fosforilació de sinapsina I al gangli cervical superior.

L'estimulació de receptors presinàptics per diversos neurotransmissors també estimula la fosforilació de sinapsina I. Factors com ara la localització neuronal de sinapsina, la seva associació amb les vesícules sinàptiques i la seva major o menor afinitat per les vesícules segons el seu estat de fosforilació indueixen a pensar que està íntimament lligada a la funció d'alliberament del neuro-

transmissor. Uns experiments de Greengard en col·laboració amb Llinás van aportar una demostració més directa d'aquesta hipòtesi (Llinás, 1985). En la sinapsi gegant del calamar es va demostrar que la injecció de desfosfosinapsina I disminueix l'alliberament del neurotransmissor. El model proposat per Greengard és que la fosforilació de sinapsina I dependent del calci regula l'alliberament del neurotransmissor induït per l'estimulació i despolarització neuronal, mentre que la fosforilació dependent de l'AMP cíclic seria el mecanisme pel qual diversos neurotransmissors, actuant sobre receptors presinàptics, disminueixen l'alliberament del neurotransmissor, modulant així la transmissió nerviosa.

En experiments *in vitro* s'ha demostrat que la sinapsina I desfosforilada interactua amb diversos components del citoesquelet neuronal, i especialment amb la F-actina. Això suggereix que la sinapsina uneix reversiblement les vesícules sinàptiques al citoesquelet, i que d'aquesta manera regula la disponibilitat de vesícules sinàptiques per al procés d'exocitosi (Valtorta *et al.*, 1992).

Fins ara hem parlat del paper regulador de la sinapsina I en l'alliberament del neurotransmissor, però també existeixen diverses observacions que suggereixen que la sinapsina I té un paper important en el desenvolupament de les sinapsis i en la formació d'axons i de dendrites. En línies cel·lulars híbrides de neuroblastoma i glioma, la sobreexpressió de sinapsina produeix un augment de la formació de varicositats i sinapsis. Així mateix, la microinjecció de sinapsina I en embrions de *Xenopus* produeix un desenvolupament més gran de les sinapsis neuromusculars. En una altra sèrie d'experiments es van aconseguir, per mitjà de tècniques recombinants, ratolins deficients en sinapsina I. En neurones de l'hipocamp d'aquests ratolins s'ha demostrat un retard important en el creixement de dendrites i d'axons i una disminució de la sinapsi (Chin *et al.*, 1995). Encara no sabem si la sinapsina regula aquests processos per mitjà de mecanismes similars als descoberts per a l'alliberament de neurotransmissors, però sens dubte s'obren noves perspectives quant al paper de les fosfoproteïnes en el sistema nerviós.

b) DARP-32

L'any 1983 Greengard i els seus col·laboradors van descriure una fosfoproteïna (Walaas *et al.*, 1983) que es troba en àrees cerebrals riques en receptors dopaminèrgics del tipus D1 (neostriat), precisament els receptors acoblats a un adenilat ciclasa, la fosforilació del qual és regulada per l'AMP cíclic i per la dopamina. Per les seves característiques i pes molecular li van donar el nom de DARP-32 (*Dopamine and cyclic AMP Regulated Protein*). En un teixit intacte l'efecte de la dopamina era blocat per la flufenazina, un antagonista específic de receptors dopaminèrgics, mentre que altres neurotransmissors, com ara l'NA o serotonina, eren inactius. La DARP-32 va ser purificada i es va observar que en la seva forma fosforilada és un potent inhibidor de la proteïna-fosfatasa-1. La calcineurina (proteïna-fosfatasa-2B), un enzim activat per Ca^{++} /calmodulina, desfosforila la DARP-32. És un possible mecanisme pel qual el Ca^{2+} podria atenuar el senyal dopaminèrgic a través de l'augment d'AMP cíclic. Estudis electrofisiològics han demostrat que la dopamina és capaç d'inhibir l'activitat produïda per l'aplicació de glutamat en neurones del nucli caudat. El caudat rep importants projeccions glutaminèrgiques del neocòrtex. Greengard i els seus col·laboradors han pogut demostrar que l'activitat de receptors glutamínic del tipus NMDA inhibeix la fosforilació de la DARP-32 dependent de l'AMP cíclic. Aquest efecte es produeix probablement perquè el glutamat, mitjançant un augment del calci, produeix una activació de calcineurina.

Recentment s'ha pogut evidenciar un efecte de la fosfo-DARP-32 en neurones estriades de rata mantingudes en un cultiu. Mitjançant estudis de *patch clamp* s'ha observat que la injecció de fosfo-DARP-32 redueix l'amplitud del corrent de sodi. Sembla que la DARP-32 fosforilada redueix el corrent de sodi estabilitzant un estat fosforilat del canal de sodi. Uns estudis més recents indiquen que la cascada DARP-32/PP-1 regula l'estat de fosforilació i l'activitat de molts efectes fisiològics de neurones dopaminèrgiques i ofereix noves possibilitats per descriure l'etiologia de malalties relacionades amb alteracions de la neurotransmissió dopaminèrgica.

com ara la malaltia de Parkinson, l'esquizofrènia o l'addicció a les drogues, i ofereix noves dianes per al desenvolupament de fàrmacs per al tractament d'aquestes malalties (Greengard *et al.*, 1999).

6. CONSIDERACIONS FINALS

Els treballs de Greengard i dels seus col·laboradors han demostrat que la fosforilació de proteïnes és un mecanisme regulador que té una importància particular en les funcions pròpies del sistema nerviós. D'altra banda, ha obert una estratègia experimental que es pot utilitzar per descobrir i analitzar les bases moleculars de fenòmens neuronals tan importants com la transmissió sinàptica, el reconeixement entre neurones, el desenvolupament neuronal, la plasticitat neuronal i la memòria. Les seves recerques han conduït a importants descobertes a nivell molecular, com ara el paper de les sinapsines en l'alliberament del neurotransmissor i en la plasticitat sinàptica, o d'una proteïna, la DARP-32, que regula les accions postsinàptiques de la dopamina i d'altres neurotransmissors. Però potser el futur ens dirà que la seva aportació més gran ha estat el fet d'ensenyar-nos un camí per descobrir els mecanismes moleculars de nombrosos processos cerebrals i obrir nous camps terapèutics.

BIBLIOGRAFIA

- CARLSSON, A.; LINDQUIST, M.; MAGNUSSON, T. (1957). «3,4-Dihydroxyphenylamine and 5-hidroxytryptophan as reserpine antagonists». *Nature*, núm. 180, p. 1200.
- CARLSSON, A. (1959). «The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system». *Pharmacol Rev.*, núm. 11, p. 490-493.
- CASTELLUCCI, V. F.; KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; WILSON, F. D.; NAVIN, A. C.; GREENGARD, P. (1980). «Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic-AMP dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 77 (12), p. 7492-7496.
- CHIN, L. S.; LI, L.; FERREIRA, A.; KOSIK, K. S.; GREENGARD, P. (1995). «Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92 (20), p. 9230-9234.
- FORN, J.; VALDECASAS, F. G. (1971). «Effects of lithium on brain adenylyl cyclase activity». *Biochem Pharmacol*, núm. 20, p. 2773-2779.
- FORN, J.; KRUEGER, B. K.; GREENGARD, P. (1974). «Adenosine 3',5'-monophosphate content in rat caudate nucleus: demonstration of dopaminergic and adrenergic receptors». *Science*, núm. 186 (4169), p. 1118-1120.
- FORN, J.; GREENGARD, P. (1978). «Depolarizing agents and cyclic nucleotides regulate the phosphorylation of specific neuronal proteins in rat cerebral cortex slices». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 75 (10), p. 5195-5199.
- GREENGARD, P. (1976). «Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters». *Nature*, núm. 260 (5547), p. 101-108.
- (1978). «Phosphorylated proteins as physiological effects». *Science*, núm. 199 (4325), p. 146-152.

- GREENGARD, P.; ALLEN, P. B.; NOURN, C. (1999). «Beyond the dopamine receptor: the DARP-32/protein phosphatase-1 cascade». *Neuron*, núm. 23 (3), p. 435-447.
- HOLZBAUER, M.; VOGT, M. (1956). «Depression by reserpine of the noradrenaline concentration in the hypothalamus of the cat». *J. Neurochem*, núm. 1, p. 8-11.
- KEBABIAN, J. W.; PETZOLD, G.; GREENGARD, P. (1972). «Dopamine-sensitive adenylate cyclase in the caudate nucleus of the rat brain and its similarity to the «dopamine receptor»». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, núm. 69, p. 2145-2149.
- KRUEGER, B. K.; FORN, J.; WATERS, J. R.; ROTH, R. H.; GREENGARD, P. (1976). «Stimulation by dopamine of adenosine 3',5' monophosphate formation in rat caudate nucleus: effect of lesions of the nigro-neostriate pathway». *Mol Pharmacol*, núm. 12 (4), p. 639-648.
- KUO, J. F.; GREENGARD, P. (1969). «Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 64, p. 1349-1355.
- LLINÁS, R.; MC GUINNESS, T. L.; LEONARD, C. S.; SUGIMORI, M.; GREENGARD, P. (1985). «Intraterminal injection of Synaptin I or calcium/calmodulin dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant axon». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 82, p. 3035-3039.
- MİYAMOTO, E.; KUO, J. F.; GREENGARD, P. (1968). «Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from brain». *Science*, núm. 165 (888), p. 63-65.
- PLETSCHER, A.; SHORE P. A.; BRODIE, B. B. (1955). «Serotonin release as a possible mechanism of reserpine action». *Science*, núm. 122, p. 374-375.
- SIEGHART, W.; FORN, J.; GREENGARD, P. (1979). «Ca²⁺ and cyclic AMP regulate phosphorylation of same two membrane associated proteins specific to nervous tissue». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 76, p. 2475-2479.
- VALTORTA, F.; BENFENATI, F.; GREENGARD, P. (1992). «Structure and

- function of the synapsins». *J. Biol. Chem.*, núm. 267 (11), p. 7195-7198.
- WILKINS, S. I.; ASWAD, D. W.; GREENGARD, P. (1983). «A dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions». *Nature*, núm. 301, p. 69-71.
- WISSE, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. (1968). «An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle». *J Biol. Chem.*, núm. 243, p. 3763-3774.

1. ERIC KANDEL I ELS MECANISMES CEL·LULARS DE L'APRENTATGE I LA MEMÒRIA

«*Simplement, era una qüestió de temps*», així encapçalaven la pàgina web de felicitació els seus companys de l'Institut de Psiquiatria de la Universitat de Columbia, el proppassat octubre amb motiu de l'anunci de la concessió del Premi Nobel de Medicina o Fisiologia al Professor Eric R. Kandel.

L'Institut Karolinska, a qui Alfred Nobel va encomanar d'honorar «aquella o aquelles persones que haguessin fet el descobriment més important en l'àmbit de la medicina o la fisiologia», va premiar Eric Kandel pels seus «descobriments sobre els mecanismes moleculars relacionats amb els canvis en l'eficàcia de la transmissió sinàptica. Per haver demostrat, a partir del model experimental dels sistema nerviós d'un cargol de mar, que els canvis en la transmissió sinàptica tenen un paper central en els processos de l'aprenentatge i la memòria. La fosforilació de proteïnes sinàptiques representa un paper important en la generació d'una forma de memòria immediata, mentre que per a la memòria a llarg termini es requereix una síntesi de proteïnes que altera la forma i la funció de la sinapsi.»

El professor Eric Kandel va néixer a Viena el 7 de novembre de 1929, es va traslladar als Estats Units pel 1929, quan la seva família va fugir de la persecució nazi contra els jueus. Es va llicenciar en Medicina el 1956 a la Universitat de Nova York. Va especialitzar-se en Psiquiatria a la Universitat de Harvard el 1964. Va començar a investigar en neurofisiologia del cervell dels mamífers amb Wade Marshall i va passar a ser professor associat al departament de Fisiologia i Psiquiatria a la Universitat de Nova York. L'any 1974 s'incorporà com a catedràtic a la Universitat de Columbia, al Departament de Fisiologia i Psiquiatria; des de 1992 també és catedràtic del Departament de Bioquímica i Biofísica Molecular. A la mateixa Universitat de Columbia va fundar el Centre de Neurobiologia i Comportament, i encara és Investigador de l'Institut de Recerca Mèdica Howard Hughes. La recerca del professor Kandel ha estat mereixedora de més de trenta premis i dis-

tincions, entre els quals cal destacar l'Albert Lasker de Recerca Mèdica Bàsica (1983); el de la Fundació Pasarow en Neurociència (1989), el Diploma Cajal (1990), el Gerard de la Societat Americana de Neurociència (1997) i el Premi Danna en Ciències de la Salut (1997).

Com hem dit al començament, el doctor Kandel ha investigat els mecanismes que modulen la morfologia i la funció de la sinapsi en el sistema nerviós, en relació amb l'adaptació i la memòria. Les neurones són les cèl·lules especialitzades del sistema nerviós que capten la informació, la transporten i la transmeten a d'altres neurones o a d'altres cèl·lules diana, com les cèl·lules musculars esquelètiques o les cèl·lules secretores d'una glàndula. Les neurones són cèl·lules molt diferenciades, amb moltes ramificacions, entre les quals, una de sola —l'axó— és l'encarregada de transportar la informació. La sinapsi és l'estructura de les neurones especialitzada en la comunicació. La sinapsi només pot ser observada, amb detall, a través del microscopi electrònic; està formada per la part final de l'axó i una petita part de la membrana de la cèl·lula diana. El terminal axònic i la cèl·lula diana queden separats per una petita fossa. La transmissió de la informació és el resultat de l'acoblament de fenòmens elèctrics, de secreció de molècules i de la interacció entre molècules. Les neurones, com totes les cèl·lules eucariotes, tenen una composició iònica diferent de la del medi on es troben. Aquesta diferent composició iònica entre l'interior i l'exterior de la neurona genera una diferència de potencial que es coneix amb el nom de potencial de repòs. La conducció de senyals a través de les neurones es fa modificant aquest potencial de repòs en períodes de temps molt curts, de l'ordre del mil·lèsim de segon. La fluctuació del potencial es coneix amb el nom de potencial d'acció. Les fluctuacions es deuen a la presència de proteïnes específiques que regulen el pas d'ions a través de la membrana i es coneixen amb el nom de canals iònics.

El pas d'informació d'una neurona a una altra es fa per mitjà de la sinapsi. Els terminals nerviosos contenen alguns centenars o milers d'estructures esfèriques molt petites, de 0,1 μm de diàmetre, que contenen els neurotransmissors, les molècules encar-

regades de passar la informació des del terminal nerviós fins a la cèl·lula diana. Quan el potencial d'acció arriba al terminal nerviós, provoca l'obertura de canals de calci. En les zones més properes al canal de calci es produeix un augment de la concentració d'aquest ió que, al seu torn, provoca la fusió —exocitosi— de les vesícules sinàptiques. Els neurotransmissors alliberats a la fossa es difonen lliurement, fins a interaccionar amb la cèl·lula diana, la qual presenta unes proteïnes específiques o receptors sobre els quals es fixen les molècules de neurotransmissors. Cada receptor interacciona amb una o dues molècules de neurotransmissor i canvia la seva conformació deixant un petit túnel a la part central, a través del qual flueixen els ions, que generen un petit canvi del potencial elèctric de la membrana. La suma dels petits canvis de potencial de molts receptors dóna lloc a un potencial sinàptic que, si és prou gran, és capaç de generar un potencial d'acció en la cèl·lula diana.

En alguns casos els receptors postsinàptics no es comporten com un canal per on passen els ions, sinó que estan acoblats a proteïnes G, que al seu torn regulen l'activitat adenilciclasa, i és aquest darrer enzim el que fa augmentar els nivells d'AMPc intracel·lular. L'AMPc és una molècula que forma part dels anomenats segons missatgers, que provoquen una cadena de reaccions enzimàtiques en cascada dins la cèl·lula.

El professor Kandel va voler estudiar els mecanismes cel·lulars implicats en els reflexos condicionats que ja havia descrit Pavlov utilitzant gossos. La complexitat estructural del sistema nerviós dels mamífers és tan gran que es feia molt difícil de dur a terme aquests estudis. Per això, el professor Kandel va buscar un animal amb estructures molt més simples. L'*Aplysia* és un mol·lusc —lil·limac o cargol de mar— amb una estructura nerviosa relativament senzilla que presenta uns reflexos fàcils d'observar. Si es toca suauement el seu sífo, que és l'òrgan per on expulsa l'aigua i els detritus, es produeix una retracció de les brànquies. Combinant dos estímuls, un d'agradable i un d'irritant, es produeix una resposta condicionada, que es coneix amb el nom de sensibilització. La repetició dels estímuls dóna lloc a un augment en la retracció de les brànquies; segons el nombre de repeticions, l'animal recorda du-

rant unes quantes hores o dies l'augment en la retracció. Segons el temps que dura l'augment de la resposta, aquests dos fenòmens es coneixen amb el nom de sensibilització de curta durada o sensibilització de llarga durada.

Els reflexos de retracció de les brànquies estan sota el control d'unes poques desenes de neurones, amb diferents funcions: neurones sensorials, interneurons, i una neurona motora. Per tant, és possible identificar les neurones que participen en aquests reflexos i fins i tot se'n coneixen els neurotransmissors implicats. Les neurones sensorials fan servir el glutamat com a neurotransmissor, mentre que les interneurons, que tenen un paper essencial, usen la serotonina (5-HT). A més, es pot registrar l'activitat sinàptica entre les diferents neurones d'aquest circuit, punxant cada una de les neurones amb elèctrodes extraordinàriament prims, connectats a amplificadors electrònics.

El professor Kandel va prendre els models experimentals de sensibilització de curta i llarga durada en *Aplysia* com a models de memòria immediata i a llarg termini. Mitjançant els registres electrofisiològics intracel·lulars combinats amb tractaments farmacològics, a nivell cel·lular, ha pogut descriure els mecanismes moleculars bàsics que regulen aquests dos processos fisiològics. El paradigma experimental emprat era una combinació d'estímuls suaus i irritants, que donaven lloc a una major retracció de les brànquies i a un augment del potencial postsinàptic de la neurona motora.

Els fenòmens de la sensibilització de curta durada es donen al terminal nerviós de la neurona sensorial, que d'una banda innerva la neurona motora i de l'altra rep la innervació de la interneurona serotoninèrgica. La serotonina actua sobre dos tipus de receptors acoblats a proteïnes G. En un cas la proteïna G està acoblada a l'adenilciclasa, mentre que en el segon cas està acoblada a la fosfolipasa C. En la ruta activada per l'adenilciclasa, s'activa un altre enzim, que es és la proteïncinasa A (PKA). Aquesta proteïna actua fosforilant tres punts essencials del terminal nerviós. Primer, inhibeix l'activitat dels canals de potassi; segon, augmenta la durada de l'obertura dels canals de calci, i, tercer, augmenta la mobi-

lització de vesícules sinàptiques. La ruta activada per la fosfolipasa C (PLC) és coincident amb alguns dels passos assenyalats per a la proteïnecinasa A. Allibera diacilglicerol de la membrana neuronal, que activa la proteïnecinasa C, que fosforila els canals de calci, allarga la seva obertura i mobilitza les vesícules sinàptiques fins a les zones actives. Cada un dels passos explicats fins ara té —individualment— la capacitat d'augmentar l'alliberació de neurotransmissor. L'acció mancomunada de tots ells dóna lloc a l'augment de l'alliberament de neurotransmissor des del terminal sensorial i, per tant, és responsable de l'augment de retracció de les brànquies.

Els fenòmens de sensibilització de llarga durada presenten dos trets fonamentals: l'activació permanent de l'activitat proteïnecinasa A (PKA) i canvis estructurals. Els canvis estructurals es deuen al creixement del terminal nerviós, que requereix la síntesi de proteïnes, i a la formació de noves connexions sinàptiques. En aquesta nova cascada enzimàtica s'han identificat les proteïnes que hi participen. La proteïnecinasa A fosforila la proteïnecinasa mitogènica activada (MAPK) i la proteïna nuclear CREB (proteïna que uneix AMPc). L'activació d'aquestes proteïnes activa els factors de transcripció que controlen l'expressió dels gens responsables del creixement del terminal nerviós.

Però, ¿aquests mecanismes són propis només de l'*Aplysia* o altres animals, incloent-hi l'ésser humà, tenen els mateixos mecanismes? Nombroses dades ens indiquen que aquestes dues cascades enzimàtiques bàsiques estan conservades en el teixit nerviós de tots els animals, però presenten una complexitat encara més gran. En mamífers, hi ha paradigmes experimentals com la potenciació a llarg termini (LTP), comparables a la sensibilització de llarga durada. S'ha comprovat que l'LTP està relacionada amb els fenòmens d'aprenentatge. Ratolins mutants, o ratolins transgènics que tenen mutada alguna de les proteïnes com la PKA, també tenen disminuïda la seva capacitat d'aprenentatge, així com l'LTP inhibida.

Les investigacions del professor Kandel suggereixen que l'activitat d'aprenentatge és el resultat del desenvolupament i de la

connectivitat sinàptica. Durant la formació del cervell, predominen els factors genètics que predeterminen quines estructures cerebrals estan relacionades, mentre que l'ajust fi de les connexions sinàptiques comença al final del desenvolupament i continua durant tota la vida, i és el resultat de l'experiència individual i pròpia. Per tant, tot allò que produeix el cervell, des dels pensaments més íntims fins a les expressions formulades obertament en públic, s'ha d'entendre com una seqüència de processos biològics. Els estímuls del medi i l'aprenentatge ens fan adquirir capacitats a causa de la modificació de l'efectivitat de les vies de connexió anatòmica.

El mateix professor Kandel comenta: «Contràriament a allò que alguns temen, l'anàlisi biològica no disminueix la nostra fascinació pel pensament o es trivialitza el fet de pensar per explicar-lo en termes de biologia molecular. Més aviat, la biologia cel·lular i molecular ens han ampliat la nostra visió, i han revelat les relacions desconegudes entre els fenòmens biològics i els psicològics.»

BIBLIOGRAFIA

KANDEL, E. (2000). «Cellular mechanisms of learning and the biological bases of individuality». A: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. [ed.] *Principles of Neural Science* (4a. ed.), p. 1247-1279. Nova York: McGraw Hill.

