



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

Estudi dels efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids i l'alliberació de senyals químics en cultius d'astròcits

Memòria de tesi doctoral presentada per David Barneda Ciurana per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona. Realitzada a la Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Doctor Enrique Claro Izaguirre i el Doctor Fernando Picatoste Ramón.

Subvencionat pels projectes SAF2004-01698 del Ministeri de Ciència i Tecnologia i PI03-528 del ministeri de Sanitat: *Evaluación del tratamiento con litio como citoprotector, gliostático y neuroplástico: estudios in vitro e in vivo tras lesión traumática del cortex cerebral en ratas*. Amb el suport de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de la Generalitat de Catalunya.

Bellaterra, 9 de Juny del 2009

Doctorand

Director de la tesi

Codirector de la tesi

David Barneda Ciurana

Dr. Enrique Claro Izaguirre

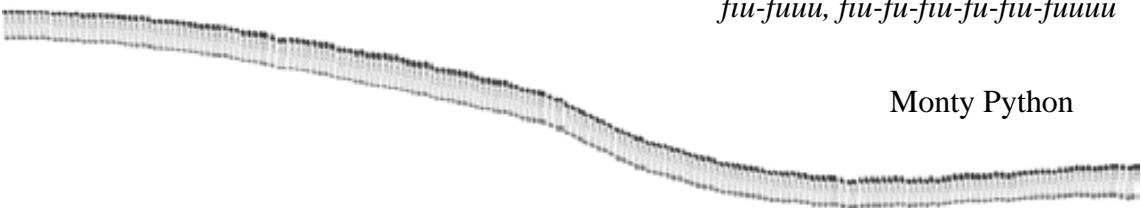
Dr. Fernando Picatoste Ramón

*Als meus pares, germans, nebot,
i a la Vidi*

Aaaaaaaalways look on the briiiiiiiiiight siiiiide of life,

fiu-fuuu, fiu-fu-fiu-fu-fiu-fuuuu

Monty Python



1 Índex

I.	ÍNDEX	1
II.	ABREVIATURES.....	5
III.	RESUM.....	9
IV.	INTRODUCCIÓ	13
1.	Els trastorns bipolars	15
1.1.	Introducció històrica.....	15
1.2.	Etiologia dels trastorns bipolars	17
1.3.	Tractament dels trastorns bipolars.....	21
2.	Mecanisme d'acció dels fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim.....	25
2.1.	Dianes moleculars del liti	25
2.2.	Senyalització per fosfoinosítids.....	26
2.3.	Inhibició de la GSK-3.....	31
2.4.	Altres dianes dels estabilitzadors de l'estat d'ànim	34
3.	Els fosfolípids	36
3.1.	Biosíntesi dels glicerofosfolípids	37
3.2.	La fosfatidilcolina	40
3.3.	Altres glicerofosfolípids	44
3.4.	Compartimentalització de les reaccions de la biosíntesi de fosfolípids.....	46
3.5.	Altres lípids	46
3.6.	Senyalització per glicerofosfolípids en el sistema nerviós	50
3.7.	Senyalització per metabòlits de la fosfolipasa A2.....	52
3.8.	Paper dels lípids en el transport intermembranal.....	56
4.	Importància dels astròcits en el sistema nerviós central.....	59
4.1.	Els astròcits	59
4.2.	Fisiologia dels astròcits	61
4.3.	Comunicació neurona-astròcit.....	63
4.4.	Modulació de l'activitat neuronal.....	65
4.5.	Acoblament neurovascular	66
4.6.	Resposta inflamatòria dels astròcits	67
4.7.	Alteracions dels astròcits associades a patologies del sistema nerviós.....	70
V.	OBJECTIUS.....	73
VI.	MATERIALS I MÈTODES.....	77
1.	Cultius cel·lulars	79
1.1.	Tampons i medis de cultiu.....	79
1.2.	Cultius primaris enriquits en astròcits	79
1.3.	Cultius secundaris d'astròcits	80
1.4.	Determinació de la viabilitat cel·lular	80

2.	Disseny dels experiments.....	81
2.1.	Tractaments farmacològics.....	81
3.	Anàlisi de lípids	82
3.1.	Reactius i dissolvents	82
3.2.	Extracció de lípids	82
3.3.	Marcatges metabòlics	82
3.4.	Separació dels lípids per cromatografia en capa fina	84
3.5.	Assaig d'alliberació d'àcid araquidònic	86
3.6.	Determinació de fosfolípids totals.....	87
4.	Anàlisi del medi de cultiu	87
4.1.	Determinació de nitrits pel mètode de Griess.....	87
4.2.	Determinació de TNF- α per ELISA.....	87
4.3.	Determinació de PGE ₂ per EIA	88
5.	Estudi del trànsit intermembranal	88
5.1.	Assaig VSVG del transport aparell de Golgi \rightarrow membrana plasmàtica	88
6.	Anàlisi de proteïnes	90
6.1.	Solucions	90
6.2.	Obtenció de llisats cel·lulars	90
6.3.	Determinació de proteïna	91
6.4.	Western-Blot	92
6.5.	Immunocitoquímica	93
7.	Tractament estadístic de les dades	94
VII.	RESULTATS	95

CAPÍTOL I: Caracterització dels efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids en cultius d'astròcits

1.1.	El liti incrementa la velocitat de síntesi de fosfatidilcolina.....	97
1.2.	L'increment en la síntesi de fosfatidilcolina no és un artefacte ocasionat per les propietats citoprotectors del liti.....	99
1.3.	El liti potencia la ruta de Kennedy	100
1.4.	El tractament agut amb liti incrementa l'activitat CCT.....	102
1.5.	Rol de la GSK-3 i la IMPasa en l'efecte del liti sobre la fosfatidilcolina.....	104
1.6.	Efecte del liti sobre la incorporació de [³² P]-P _i a fosfolípids	106
1.7.	El liti inhibeix la incorporació de [¹⁴ C]-acetat a fosfolípids.....	109
1.8.	El liti no inhibeix la incorporació d'àcid [³ H]-palmític a fosfolípids	110
1.9.	El liti inhibeix la incorporació de [¹⁴ C]-acetat a lípids neutres.....	112
1.10.	El medi condicionat per astròcits pretractats amb liti estimula la síntesi de fosfatidilcolina.....	113
1.11.	Produeix el tractament amb liti una depleció de colina al medi de cultiu?.....	115
1.12.	Els canvis de medi de cultiu augmenten l'activitat CCT dels astròcits	120
1.13.	Comparativa dels efectes del liti, el valproat i la carbamazepina sobre la síntesi de fosfolípids....	121
1.14.	Connexió entre la síntesi de fosfatidilcolina i de fosfatidilinositol	124
1.15.	El liti no incrementa els nivells de CDP-DAG ni de DAG en astròcits	125

CAPÍTOL II: Estudi de l'alliberació de senyals químics en resposta a lipopolisacàrid bacterià en astròcits tractats amb liti

2.1. Paper del liti sobre la secreció de citoquines	131
2.2. Estudi de l'exportació de vesícules de l'aparell de Golgi a la membrana plasmàtica	133
2.3. Paper del liti en la resposta inflamatòria dels astròcits en resposta a lipopolisacàrid bacterià	136
2.4. Efecte dels estabilitzadors de l'estat d'ànim sobre l'alliberació d'àcid araquidònic	143
VIII. DISCUSIÓ.....	149
1. Efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids en astròcits	152
2. Efectes del liti sobre l'alliberació de senyals químics en cultius d'astròcits	166
IX. CONCLUSIONS	177
X. BIBLIOGRAFIA	181
XI. AGRAÏMENTS.....	213

20-HETE	<i>20-Hydroxyeicosatetraenoic acid</i>
AA	<i>Arachydonic acid</i>
ACAT	<i>Acyl-coenzyme A:cholesterol O-acyltransferase</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate</i>
ApoE	<i>Apolipoprotein E</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CamKII	<i>Ca²⁺/Calmodulin Kinase II</i>
CBZ	<i>Carbamazepine</i>
CCT	<i>CTP:phosphocholine cytidyltransferase</i>
CTP	<i>CDP-Choline:1,2-dialcylglycerol cholinephosphotransferase</i>
CDP-Cho	<i>Cytidylphosphocholine</i>
CDP-DAG	<i>Cytidyldiphosphodiacylglycerol</i>
CDP-Etn	<i>Cytidyldiphosphoethanolamine</i>
Cho	<i>Choline</i>
CHT	<i>High-affinity choline transporter</i>
CK	<i>Choline kinase</i>
CL	<i>Cardiolipin</i>
CNS	<i>Central nervous system</i>
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
cPLA ₂	<i>Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2</i>
CTL	<i>Choline transporter-like</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DAGK	<i>Diacylglycerol kinase</i>
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
DiC8	<i>Diocanoylglycerol</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPOX	<i>Epoxygenase</i>
ER	<i>Endoplasmatic reticulum</i>
ET-1	<i>Endothelin-1</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>

Abreviatures

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GSK-3	<i>Glicogen synthase kinase 3</i>
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A</i>
HMIT	<i>H⁺ /myo-inositol transporter</i>
IMPasa	<i>Inositol monophosphatase</i>
InsP	<i>Inositol monophosphate</i>
IP ₃	<i>Inositol trisphosphate</i>
iPLA ₂	<i>Calcium-independent phospholipase A2</i>
IPPasa	<i>Inositolpolyphosphate 1-phosphatase</i>
Lam	<i>Lamotrigine</i>
LOX	<i>Lipoxygenase</i>
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i>
LPPs	<i>Lipid phosphate phosphohydrolases</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAM	<i>Mitochondria-associated membranes</i>
mGluRs	<i>Metabotropic glutamate receptors</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NE	<i>Noeradrenaline</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
OCT	<i>Organic cation transporter</i>
PA	<i>Phosphatidic acid</i>
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PAPPasa	<i>3'-phosphoadenosine 5'-phosphate phosphatase</i>
PAP	<i>Phosphatidic acid phosphatase</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	<i>Phosphatidylcholine</i>
P-Cho	<i>Phosphocholine</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PEMT	<i>Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandin E2</i>

P _i	<i>Phosphate</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PI-3,4,5-P ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5- trisphosphate</i>
PI-4,5-P ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLA ₂	<i>Phospholipase A2</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
PRRs	<i>Pattern-recognition receptors</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
PSD	<i>Phosphatidylserine decarboxylase</i>
PUFAs	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RACKS-1	<i>Receptor for activated C-kinase-1</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SCN	<i>Supraquiasmic nucleous</i>
SGPFC	<i>Subgenual prefrontal cortex</i>
SLMV	<i>Synaptic-like microvesicles</i>
SM	<i>Sphingomyelin</i>
SMIT	<i>Sodium-dependent myo-inositol transporter</i>
sPLA ₂	<i>Secreted pPhospholipase A2</i>
SREBPs	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Proteins</i>
SRs	<i>Scavenger Receptors</i>
TAG	<i>Triacylglycerol</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Topi	<i>Topiramate</i>
VPA	<i>Valproate</i>
VSM	<i>Vascular smooth muscle</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
VSVG	<i>Vesicular stomatitis virus glicoprotein</i>
WMHs	<i>White matter hyperintensities</i>

Abreviatures

“L’aparició de la mania és en realitat un empitjorament de la malaltia (melancolia) més que un canvi a una altra malaltia (...). En la majoria d’ells, la tristesa millora després d’un cert període de temps, i esdevé felicitat; llavors els pacients desenvolupen mania.”

Arateus de Capadòcia



Resum

El desenvolupament de noves teràpies per als trastorns bipolars, caracteritzats per l'alternança d'episodis de depressió i d'eufòria exacerbada, es veu dificultat pel desconeixement de l'etiologia de la malaltia i del mecanisme d'acció dels fàrmacs que estableixen l'estat d'ànim del pacient, com el valproat, la carbamazepina, la lamotrigina, i el liti. En aquest sentit, una possibilitat que ha estat poc explorada és que les cèl·lules diana d'aquests fàrmacs siguin els astròcits, un tipus de glia que darrerament està emergent com a element actiu en els processos de transmissió sinàptica, fet que ens ha portat a estudiar els efectes del liti en cultius d'astròcits.

Hem caracteritzat l'increment que produeix el liti en la velocitat de síntesi de fosfatidilcolina (PC) en astròcits, que ja apareix amb el tractament agut amb liti, però és especialment significatiu a partir de les 24 hores de tractament. El liti potencia la ruta de Kennedy per a la síntesi de PC, un efecte que es veu parcialment revertit per l'addició d'inositol, indicant que la inhibició de la IMPasa per part del liti hi estaria implicada. Els efectes del liti no es limiten a la PC sinó que es produeix una alteració general del metabolisme lipídic dels astròcits. El liti inhibeix la síntesi de fosfatidilinositol i de fosfatidiletanolamina, un efecte que es dona de manera similar amb valproat o carbamazepina que, de manera oposada al liti, també provoquen una forta inhibició en la síntesi de PC. Paral·lelament, el tractament crònic amb liti sembla reduir la síntesi *de novo* d'àcids grassos i de colesterol. Globalment, els efectes observats ens fan pensar que en incrementar la síntesi de PC el liti podria produir una reducció en els nivells de diacilglicerol cel·lulars, fet que podria estar implicat amb el mecanisme terapèutic d'aquest ió.

Si la diana terapèutica del liti es troba en els astròcits, és probable que actuï a nivell de les molècules que aquests alliberen per tal de modular la transmissió sinàptica. En aquest sentit hem comprovat que el tractament amb liti, a dosis lleugerament superiors a les terapèutiques, incrementa l'alliberació de TNF- α , òxid nítric, i prostaglandina E₂ (PGE₂) en cultius d'astròcits estimulats amb lipopolisacàrid bacterià (LPS). Sorprenentment en emprar una dosi de liti inferior, dins del rang terapèutic del fàrmac, s'observa una reducció en l'alliberació de PGE₂, un efecte reproduït pel valproat, la carbamazepina i la lamotrigina. L'efecte dual del liti en funció de la concentració aplicada, es deu a una reducció en la producció d'àcid araquidònic en resposta a senyals de Ca²⁺ citosòlic, paral·lela a un increment en la inducció de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en astròcits estimulats amb LPS. Aquest fet podria estar relacionat amb l'estreta finestra terapèutica d'aquest fàrmac, i contribueix a relacionar els astròcits amb el mecanisme d'acció dels estabilitzadors de l'estat d'ànim.

Summary

Bipolar disorder is a common disease characterized by an alternating pattern of depression and mania episodes. Bipolar patients are treated with the mood stabilizing drugs, like lithium, valproate and carbamazepine, however the action mechanism of these drugs remains unknown. As most of the studies on this issue have been focused in neurons, we decided to analyze the effects of lithium in cultured astrocytes, a type of glial cells that are emerging as active elements in the regulation of synaptic transmission.

We have characterized the increase on phosphatidylcholine (PC) synthesis induced by lithium in cultured astrocytes, an effect that appears with the acute treatment and is enhanced after 24 hours of treatment with lithium. Lithium potentiates the Kennedy pathway for the synthesis of PC, in an IMPase (inositol monophosphatase) inhibition dependent manner. Lithium effects are not limited to PC but it produces a broad alteration on astrocytic lipid metabolism. Lithium inhibits phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine synthesis, an effect also induced by the treatment with valproate or carbamazepine, which don't stimulate PC synthesis as lithium but inhibit it. On the other hand, chronic lithium treatment reduces fatty acids and cholesterol "de novo" synthesis. Overall, we hypothesized that lithium, increasing PC synthesis, induces a reduction on cellular diacylglycerol levels, which in turn could be related with the therapeutic mechanism of this ion.

If astrocytes are the lithium's cellular target, it might actuate modifying the release of signaling molecules by these cells. Accordingly to this hypothesis, we have found that lithium treatment, at concentrations higher than its therapeutic window, increases TNF-alpha, nitric oxide and prostaglandin E2 (PGE2) release in cultured astrocytes stimulated with bacterial lipopolisaccharide (LPS). Surprisingly, using a lower lithium concentration, corresponding to its therapeutic range, astrocytes shown a reduction on PGE2 release, an effect replicated by the treatment with valproate, carbamazepine or lamotrigine. The dual effect of lithium on the PGE2 release is due to an inhibition of arachydonic acid release in response to cytosolic Ca²⁺ signals that courses in parallel to an increase on cyclooxygenase expression in astrocytes stimulated with LPS. This dual role could be related with the thin therapeutic window of lithium, and contributes to link astrocytes with the mechanism of action of mood stabilizers.

“És més bell saber alguna cosa
de tot, que saber-ho tot d’alguna
cosa ”

Blaise Pascal



Introducció

1 Els trastorns bipolars

Els trastorns bipolars són un greu desordre de l'estat d'ànim de naturalesa crònica que es caracteritza per l'alternança d'episodis de depressió i d'eufòria exacerbada. Es classifiquen com a trastorns bipolars de tipus I, amb símptomes de depressió severa i mania; de tipus II amb depressió severa i hipomania; i com a estadis mixtes i trastorns bipolars de cicle ràpid, amb coexistència o ràpida alternació de símptomes associats a les fases depressives i de mania (revisat a Belmaker, 2004; Benazzi, 2007). Els trastorns bipolars de tipus I afecten al voltant de l'1.2-1.5% de la població adulta dels USA (Müller-Oerlinghausen et al., 2002; Narrow et al., 2002), i les persones que els pateixen presenten una taxa de suïcidi de 5 a 17 vegades superior a la mitjana de la població (Bostwick i Pankratz, 2000).

Per la seva naturalesa crònica, els trastorns bipolars representen un cost elevadíssim per la sanitat (Begley et al., 2001), i la qualitat de vida dels pacients està profundament afectada per la malaltia, amb problemes socials, econòmics, professionals i familiars (revisat a Evans et al., 2005).

No existeix una cura per la malaltia, però es disposa de diversos fàrmacs que estableixen l'estat d'ànim dels pacients. Malauradament molts pacients no responen positivament a la medicació, que presenta molts efectes secundaris i es mostra ineficaç en alguns casos, fet que fa necessari el desenvolupament de noves teràpies (revisat a Zarate i Manji, 2008), motiu pel qual es tracta d'un dels desordres psiquiàtrics que està rebent més atenció en la literatura científica dels darrers anys (López-Muñoz et al., 2006).

1.1 Introducció històrica

1.1.1 Els trastorns bipolars a l'antiga Grècia

El concepte de trastorns bipolars té el seu origen en els estudis dels metges i filòsofs grecs del període clàssic (revisat a Angst i Marneros, 2001). Si bé anteriorment ja s'havien descrit estats patològics de depressió i exaltació prenent com a model les diferents personalitats dels herois homèrics, va ser Hipòcrates (460-337 aC) el primer en formular una classificació de les malalties mentals, que va dividir en melancolia, mania i paranoia. Basat en el materialisme pitagòric, Hipòcrates va assumir que el cervell era l'òrgan de la ment, i per tant, l'origen de les malalties mentals.

Cal entendre que els conceptes de mania i melancolia emprats pels hipocràtics eren més generals que els termes moderns i incloïen un ampli espectre de desordres mentals. Tot i això, ja distingien la personalitat melancòlica de la melancolia com a malaltia.

Amb certa prudència històrica, es pot considerar que el concepte de trastorns bipolars neix amb Arateus de Capadòcia, que visqué a l'Alexandria del segle primer i contràriament a la visió imperant en la seva època, considerà que la mania i la melancolia eren dues imatges d'una mateixa malaltia, on un agreujament de la melancolia portava a la mania.

1.1.2 Naixement i renaixement del concepte modern de trastorn bipolar

No va ser fins a mitjans del segle XIX que es va produir el següent salt endavant, quan Pierre Falret (1794-1870) descrigué per primera vegada els trastorns bipolars com una condició en si mateixa, una malaltia caracteritzada per un continu cicle de depressió, mania i intervals de lucidesa més o menys prolongats, que anomenà *folie circulaire*.

Tot i això, amb Emil Kraepelin (1856-1926), que va contribuir enormement en la comprensió dels trastorns afectius i és considerat el “pare de la psiquiatria moderna”, es va eliminar la distinció entre depressió i formes circulars, incloent tots els desordres afectius sota el concepte unitari de malaltia maniaco-depressiva. Entre els opositors a la visió dels seguidors de Kraepelin, destacaren Karl Wernicke, Karl Leonhard i Karl Kleist (que introduí els conceptes de desordres afectius unipolars i bipolars), però no gaudiren de l'acceptació que mereixien.

La situació dona un gir al 1966, l'any del renaixement dels trastorns bipolars, amb la publicació de dos estudis per part de Jules Angst (*Ätiologie und Nosologie Endogener Depressiver Psychosen*) i de Carlo Perris (*A Study of Bipolar (Manic-Depressive) and Unipolar Recurrent Depressive Psychoses*) on basant-se en evidències clíniques i genètiques, defensaren la diferenciació nosològica entre trastorns bipolars i depressió unipolar.

1.1.3 Expansió del grup de trastorns bipolars

Amb la introducció de psicofàrmacs pel tractament dels trastorns bipolars i unipolars, s'accentua la recerca en aquest camp. En conseqüència, es produeix una expansió del grup de trastorns bipolars amb la inclusió de trastorns esquizoafectius, estadis mixtes, ciclotímia i altres patologies (revisat a Marneros, 2001). La gran variabilitat en la simptomatologia dels pacients porta al concepte d'espectre bipolar, un continu en els trastorns bipolars que proposà Akiskal reivindicant les idees de Kraepelin (Akiskal et al., 1977). La classificació dels

trastorns afectius continua essent un camp obert, incentivat pels interessos de la indústria farmacèutica i fonamentat en els nous avanços en la seva genètica i neurobiologia.

1.2 Etiologia dels trastorns bipolars

Tot i la intensa investigació que s'ha realitzat en aquest camp, les bases neurobiològiques dels trastorns bipolars encara ens són desconegudes, fet que dificulta el desenvolupament de nous tractaments. Es creu que la malaltia és el resultat de la complexa interacció entre factors de risc genètics i ambientals, i s'han proposat nombroses hipòtesis basades en alteracions en processos neuroprotectius, neuroquímics, neuroendocrins, neuroestructurals o genètics, sense que cap d'elles hagi permès explicar completament les causes de la malaltia (figura I-1A). S'ha descrit un gran nombre d'alteracions en diversos aspectes del funcionament del sistema nerviós en pacients bipolars, però encara no es disposa d'una teoria unitària satisfactòria. L'estudi dels trastorns bipolars es veu dificultat per l'heterogeneïtat de la malaltia, les confusions de diagnòstic, i els efectes de la història farmacològica del pacient, sens dubte responsable de bona part de les alteracions observades en el seu CNS.

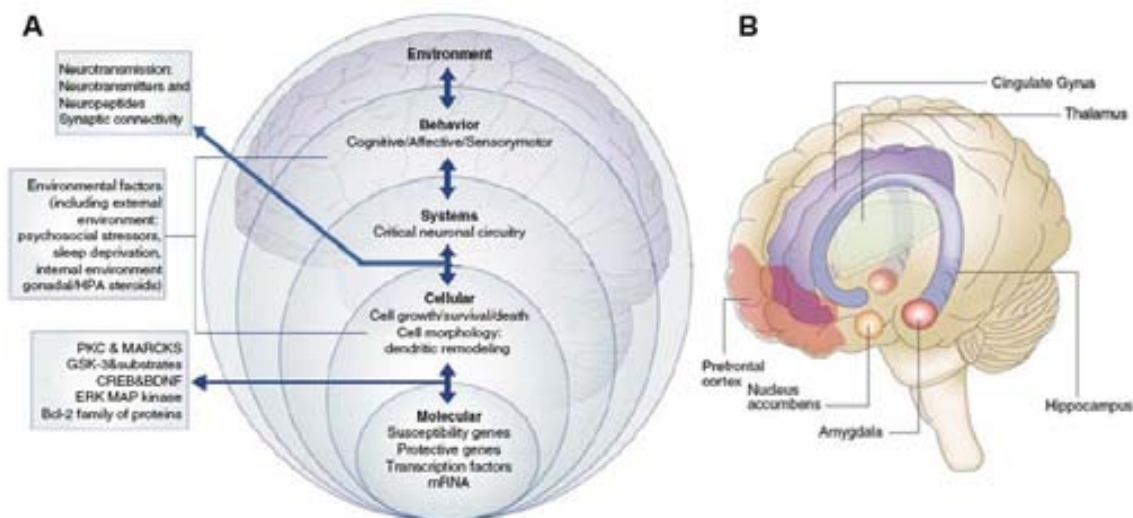


Figura I-1. Etiologia dels trastorns bipolars. A) Per a la comprensió de la fisiopatologia dels trastorns bipolars cal abordar l'estudi de la malaltia des d'una perspectiva que englobi els diferents nivells que es manifesten alterats. B) Principals regions neuroanatòmiques implicades en processos afectius en les que s'han descrit alteracions associades als trastorns bipolars. De Schloesser et al. (2009) *Neuropsychopharmacology*.

1.2.1 Alteracions neuroanatòmiques

Lesions cerebrals com ara tumors, apoplexia o traumatismes cranials, poden resultar en un comportament similar al de mania o al de depressió en funció de les regions on es produeixen. Aquest fet fa pensar que la causa dels trastorns bipolars podria ser l'alteració de certes zones del cervell que participarien en el control de l'emoció i l'estat d'ànim (figura I-1B) (revisat a

Berns i Nemeroff, 2003). Per identificar aquestes alteracions, s'han realitzat nombrosos estudis basats en anàlisis *postmortem* i en l'aplicació de tècniques de neuroimatge en pacients bipolars (revisat a Strakowski, et al., 2005).

Una de les alteracions que s'ha detectat en alguns pacients bipolars és l'engrandiment dels ventricles cerebrals, un fenotip associat a neurodegeneració i que és proporcional al nombre d'episodis de mania soferts pel pacient (Strakowski et al., 2002), fet que podria indicar que es tracta d'una conseqüència del curs de la malaltia.

Per altra banda, analitzant finament el còrtex prefrontal de pacients, s'observen alteracions específiques de certes subregions (López-Larson et al., 2002) com ara el SGPFC (*subgenual prefrontal cortex*), que es creu implicat en la modulació de l'estat d'ànim i que presenta un volum inferior en pacients amb trastorns bipolars i una història familiar de malalties afectives (Drevets et al., 1997). Amb l'anàlisi *postmortem* d'aquest tipus de pacients s'ha detectat una disminució de la densitat glial en el SGPFC, que no s'observa en el còrtex somatosensorial (Ongür et al., 1998).

Des de diverses regions del còrtex prefrontal es projecten fibres cap a l'estriat per formar el circuit prefrontal-estriatal-talàmic, que participa en el comportament emocional, cognitiu i social, i és per tant susceptible d'estar alterat en pacients bipolars. Diversos estudis en pacients bipolars mostren un engrandiment de l'estriat (Aylward et al., 1994), una alteració que s'observa ja en els primers estadis de la malaltia i que no varia amb el nombre d'episodis soferts (Delbello et al., 2004).

L'amígdala i l'hipocamp també estan involucrats en control de l'emoció i la cognició, i s'ha descrit un engrandiment de l'amígdala en pacients bipolars (Brambilla et al., 2003), tal com ja s'havia observat en pacients esquizofrènics (McCarley et al., 1999). A diferència d'aquests darrers, els pacients bipolars no mostren una reducció també en l'hipocamp, de manera que ambdues malalties mostrarien un comportament diferenciat respecte l'hipocamp i l'amígdala (Altshuler et al., 2000).

Per MRI (*magnetic resonance imaging*) s'observa que els pacients bipolars sovint presenten una sèrie d'hiperintensitats en la matèria blanca, les WMHs (*white matter hyperintensities*), típicament associades a malalties vasculars (McDonald et al., 1999). La seva localització suggereix que poden estar alterant les fibres que comuniquen les regions fronto-temporals, fet especialment significatiu si es té en compte que lesions en aquestes localitzacions ja s'havien associat a l'aparició de mania. L'anàlisi histològic d'aquestes WMHs mostra petites

malformacions vasculares, espais perivasculars dilatats, cists cerebrals, desmielinització, infarts i necrosis. És interessant destacar que aquestes anomalies s'han detectat ja en pacients molt joves (Pillai et al., 2002), lliures de factors de risc cerebrovasculars, fet que indicaria que els pacients bipolars presenten una susceptibilitat a aquest tipus de danys cel·lulars.

Els estudis de neuroanatomia funcional mostren que certes subregions prefrontals presenten un comportament anòmal en pacients bipolars, tant en condicions de repòs com durant la realització de diverses tasques. En general, durant les fases depressives de la malaltia apareix una disminució general en l'activació prefrontal, un efecte oposat al que s'ha descrit en depressió unipolar (Mayberg et al., 1999), mentre que durant les fases de mania la disminució de l'activitat prefrontal es restringeix a certes subregions, i s'observa la sobreactivació d'altres regions cerebrals, com l'anterior cingulat, un efecte també es dona en depressió unipolar (Drevets et al., 1997).

Podria ser que l'activació de certes àrees prefrontals de caràcter límbic (emocional) bloquegés les regions prefrontals cognitives, fet consistent amb les observacions clíniques. S'ha observat un increment en l'activitat d'altres regions de la xarxa límbica, com l'estriat, el tàlam i l'amígdala en pacients bipolars, especialment durant els episodis de mania (revisat a Blumberg et al., 2000; Blumberg et al., 2003; Ketter et al., 2001). Moltes d'aquestes anormalitats es mostren dependents de l'estat del pacient, i alguns estudis mostren l'activació de certes àrees corticals durant els estats d'eutímia que podrien compensar la sobrereactivitat de les xarxes que controlen l'emoció (Strakowski et al., 2004).

1.2.2 Alteracions neuroquímiques

L'anàlisi bioquímic del plasma, líquid cerebrospinal i teixit cerebral de pacients bipolars mostra nombroses anormalitats neuroquímiques. S'ha relacionat els trastorns bipolars amb la neurotransmissió monoaminèrgica, de gran importància en els circuits neuronals límbic, estriatal i prefrontal. Però a diferència de la depressió unipolar, sovint associada a la deficiència de monoamines com la serotonina, la noeradrenalina (NE) o la dopamina, no està clar el paper que juguen en els trastorns bipolars, i no es recomana l'ús dels antidepressius que afecten aquests sistemes. Hi ha evidències que associen la deficiència i l'excés de monoamines, i particularment de NE, als estats de depressió i mania respectivament, però això pot ser un simple reflex de l'estat general de l'activitat neuronal (revisat a Belmaker, 2004). La transmissió glutamatèrgica es mostra alterada en pacients bipolars (revisat a Ng et

al., 2009), i elements d'aquest sistema de comunicació han estat associats genèticament a la malaltia (revisat a Schiffer, 2002).

Tot i això, la malaltia es presenta més com un desordre dels circuits neuronals i sinapsis, que com la simple manca o excés d'un determinat neurotransmissor.

1.2.3 Alteracions en cascades de senyalització

El fet que els fàrmacs que s'han mostrat efectius pel tractament dels trastorns bipolars afectin diverses cascades de senyalització de gran importància per la fisiologia cel·lular, fa pensar que l'origen dels trastorns bipolars es podria trobar en l'alteració d'aquests processos de senyalització. Les principals vies que s'han implicat en la fisiopatologia i la teràpia dels trastorns bipolars es tractaran a l'apartat 2.

Una alteració a nivell de les cascades de senyalització cel·lular pot afectar l'expressió gènica, el nombre i potència de les sinapsis, l'alliberació de neurotransmissors, l'arquitectura axonal i dendrítica, la supervivència neuronal o fins i tot la generació de noves neurones (revisat a McClung i Nestler, 2008). En altres paraules, les cascades de senyalització controlen la plasticitat neuronal, el conjunt de processos que permet al sistema nerviós adaptar-se als canvis, i que forçosament ha d'estar implicat en un aspecte tant complex de la ment com és el control de les emocions i l'estat d'ànim. En aquest sentit, amb l'anàlisi del cervell de pacients bipolars s'ha detectat alteracions en nombroses proteïnes relacionades amb neuroplasticitat, com GAP-43, sinapsines, SNARE, sinaptobrevina, sinaptofisina o netrines, fet que dóna pes a la idea que les cascades de plasticitat neuronal són uns elements determinants en la etiologia i tractament dels trastorns bipolars (revisat a Schloesser et al., 2008). Per altra banda, des que s'actui sobre una determinada cascada de senyalització fins que es desencadenin els mecanismes de plasticitat que provoquin canvis en els circuits neuronals, es requerirà cert temps, fet que explicaria perquè els efectes beneficiosos dels estabilitzadors de l'estat d'ànim apareixen uns dies després de l'inici del tractament.

1.2.4 Alteracions en els ritmes circadians

Els pacients bipolars pateixen profundes alteracions en els cicles son-vigília, tant en les fases depressives com de mania, i el canvi d'un estat a un altre sovint va precedit per petis canvis en els ritmes circadians. En pacients bipolars i depressius, s'han trobat mutacions en els gens que controlen els ritmes circadians des del SCN (*suprachiasmatic nucleus*) (Mitterauer, 2000) i s'ha comprovat que el liti allarga el període circadià de neurones d'aquest nucli (Abe et al.,

2000). Els pacients bipolars es mostren hipersensibles a perturbacions en els ritmes circadians. Aquest fet concorda amb la idea d'un sistema caòtic sensible a canvis lleus, que porten el sistema d'un estat a un altre. S'han descrit canvis en les fases REM (*Rapid Eye Movement*), el son i els cicles de temperatura, que tenen lloc de manera lenta i progressiva abans del canvi d'estat del pacient, de manera que sembla que quan es supera un llindar el pacient bipolar seria catapultat cap a l'estat de mania o depressió, donant la impressió que el canvi d'estat s'ha donat de forma instantània.

1.3 Tractament dels trastorns bipolars

A diferència del que succeeix amb altres malalties psiquiàtriques, com la depressió unipolar, l'absència d'un model bioquímic, cel·lular o animal àmpliament acceptat pels trastorns bipolars, ha impedit el desenvolupament sistemàtic de fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim (revisat a Gould i Einat, 2007). Per aquest motiu, el descobriment de nous fàrmacs s'ha donat quasi exclusivament amb l'observació clínica del potencial beneficiós de fàrmacs preexistents per a altres patologies.

1.3.1 Teràpia dels trastorns bipolars

En la darrera guia de la CANMAT (*Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments*) i la ISBD (*International Society for Bipolar Disorders*), es detallen els fàrmacs recomanats per al tractament dels trastorns bipolars (Yatham et al., 2009) (Figura I-2).

Tractament de la mania aguda: 1^a línia: liti, valproat, olanzapina, risperidona, quetiapina, aripiprazol, ziprasidona, o la combinació de liti o valproat amb un dels darrers. 2^a línia: Carbamazepina, terapia electroconvulsiva (ECT), liti + valproat, asenapina, liti o valproat + asenapina. 3^a línia: Haloperidol, clorpromazina, liti o valproat + carbamazepina, clozapina, oxcarbazepina, tamoxifè. No es recomana: gabapentina, topiramà, lamotrigina, verapamil, tiagabina, risperidona + carbamazepina, olanzapina + carbamazepina.

Tractament de la depressió aguda: 1^a línia: liti, lamotrigina, quetiapina, liti o valproat + SSRI (selective serotonin reuptake inhibitor), olanzapina + SSRI, liti + valproat, liti o valproat + bupropion. 2^a línia: Quetiapina + SSRI, valproat o liti + lamotrigina, adjunció de modafinil. 3^a línia: Carbamazepina, olanzapina, liti + carbamazepina, liti + pramipexol, liti o valproat + venlafaxina, liti + MAOI (*monoamine oxidase inhibitors*), ECT, liti o valproat o AAP + TCA (*tricyclic antidepressant*), liti o valproat o carbamazepina + SSRI + lamotrigina, adjunció de d'àcid eicosapentaenoic, adjunció de riluzol, adjunció de topiramà. No es recomana: Gabapentina, aripiprazol. L'ús d'antidepressius dependrà del balanç entre el desig de remetre l'episodi depressiu i el d'evitar un episodi de mania.

Manteniment dels pacients bipolars: 1^a línia: liti, lamotrigina (prevenció depressió), valproat, olanzapina, quetiapina, liti o valproat + quetiapina, risperidona LAI (*long acting*)

injection), adjunció de riperidona LAI, aripiprazol (prevenció mania), adjunció de ziprasidona. 2^a línea: Carbamazepina, liti + valproat, liti + carbamazepina, liti o valproat + olanzapina, liti + risperidona, liti + lamotrigina, olanzapina + fluoxetina. 3^a línea: Adjunció de fenitoïna, adjunció de clozapina, adjunció d'ECT, adjunció de topiramata, adjunció d'àcids grassos omega-3, adjunció d'oxcarbazepina, adjunció de gabapentina. No es recomana: Gabapentina, topiramata, antidepressius, adjunció de flupentixol.

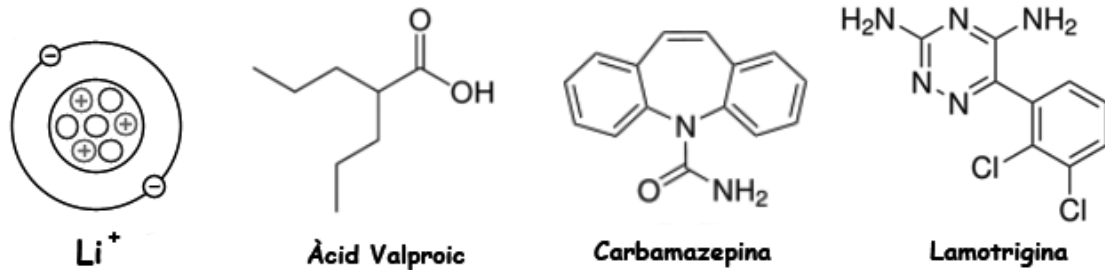


Figura I-2. Principals fàrmacs emprats en el tractament dels trastorns bipolars.

1.3.2 El descobriment del primer psicofàrmac: el liti

La història del liti com a fàrmac és un clar cas de serendipia, on la sort, l'ingeni i certa dosi de temeritat, es combinen per donar lloc a un gran descobriment (Schou, 2001). Ja a finals del segle XIX, Karl Lange emprava el liti pel tractament profilàctic de la depressió, i posteriorment va ser emprat per la depressió aguda. Durant aquest període el liti era àmpliament administrat en forma d'aigües minerals, amb la creença que curava diverses malalties. Tot i això, al 1898 es van descriure les seves propietats tòxiques, i va ser oblidat fins als estudis de John Cade. A mitjans del segle XX, el psiquiatre australià John Cade, va realitzar una sèrie d'estudis partint de la hipòtesi que les malalties mentals eren causades per algun compost tòxic que podria trobar en l'orina dels pacients. Per demostra-ho, injectava extractes d'orina de pacients a conills porquins per veure si els alterava el comportament. Com a control, també va estudiar l'efecte que provocava la injecció dels principals components de l'orina. L'àcid úric el va aplicar en forma de la seva principal sal soluble, l'ureat de liti. Els animals tractats amb aquest compost es mostraren dòcils i calmats, un efecte que va resultar ser degut al liti. Veient aquests resultats, John Cade es va decidir a tractar alguns dels seus pacients amb carbonat de liti, i mentre que en pacients esquizofrènics o depressius no va observar-hi canvis significatius, els pacients amb mania van experimentar una reducció o desaparició dels seus símptomes. Era la primera vegada que es tenia èxit en el tractament farmacològic d'una malaltia mental, i amb la publicació del seu famós article *Lithium Salts in the treatment of psychotic excitement* (Cade, 1949) es pot dir que s'inicia l'era de la psicofarmacologia.

1.3.3 Les sals de liti

El liti és el fàrmac de referència per als trastorns bipolars mostrant efectes positius en la majoria de pacients, als que estabilitza l'estat d'ànim i redueix les recaigudes i els intents de suïcidi (Kleindienst et al., 2003; Grunze, 2003; Tondo et al., 2001). Resulta eficaç tant per les fases de depressió com de mania, tant pel que fa al seu tractament agut com per la seva profilaxi, fet que el converteix en un fàrmac extremadament valuós i extremadament complex.

Desgraciadament el liti no és efectiu per tots els pacients, té una finestra terapèutica anormalment estreta (0.6-1.5 mM en plasma), amb dosis letals del mateix ordre que les terapèutiques (revisat a Timmer i Sands., 1999), i pot produir nombrosos efectes secundaris indesitjables, des de tremolors i molèsties gastrointestinals fins a hipotiroïdisme i diabetis (revisat a Pilcher, 2003). De fet, el mateix Cade va reportar el cas d'un pacient mort per la toxicitat del liti 22 mesos després d'iniciar el tractament. Tot això, sumat al fet que el liti no genera grans beneficis comercials, fa que les empreses farmacèutiques s'esforcin a desenvolupar nous fàrmacs per al tractament d'aquesta malaltia. Entre aquests altres agents, destaquen tres anticonvulsius que van resultar beneficiosos en pacients bipolars: el valproat, la carbamazepina i la lamotrigina.

1.3.4 El valproat

L'àcid valproic (àcid 2-propilpentanoic) és un àcid carboxílic de cadena ramificada, que s'empra com a antiepilèptic d'ampli espectre, amb eficàcia contrastada tant pels atacs parcials com generalitzats. Les seves propietats anticonvulsives es van descobrir accidentalment al 1962 en ser utilitzat com a solvent per altres agents testats en animals (Bowden, 1995).

El valproat es prescriu en pacients bipolars, tant pel tractament agut de la mania com per la seva profilaxi, i si bé s'ha emprat com a part del tractament de les fases depressives de la malaltia, els seus efectes beneficiosos no són tant clars en aquest aspecte (revisat a Bowden, 2003).

1.3.5 La carbamazepina

Un altre anticonvulsiu que s'empra en pacients bipolars és la carbamazepina (5H-dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida). S'ha mostrat eficaç en el tractament de la mania aguda, però tot i les evidències que ho suporten, es requereixen més estudis per demostrar la seva eficàcia com a tractament profilàctic i per al tractament de la depressió aguda (revisat a Nasrallah et al., 2006). L'eficàcia de la carbamazepina en el tractament de la mania aguda és

similar a la del valproat, però aquest presenta una menor incidència d'efectes secundaris immediats, mentre que la carbamazepina es tolera millor en tractaments llargs.

1.3.6 La lamotrigina

La lamotrigina (6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina) és una feniltriazina sintetitzada a principis dels anys 80 pels Wellcome Laboratories amb la intenció de trobar nous antiepilèptics (revisat a Weisler et al., 2008). Posteriorment va ser emprat amb èxit per tractar dos pacients bipolars resistents a la medicació, fet que va portar a la realització d'assaigs clínics que van mostrar que el fàrmac era efectiu per al tractament dels trastorns bipolars, especialment pel que fa a les fases depressives de la malaltia (Bowden et al., 1999; Calabrese et al., 2003), i pels trastorns bipolars de cicle ràpid (Calabrese et al., 2005).

2 Mecanisme d'acció dels fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim

Cap dels fàrmacs emprats actualment per al tractament dels trastorns bipolars s'ha desenvolupat a partir d'hipòtesis preclíniques específiques per aquesta malaltia (revisat a Gould et al., 2004). La manca de bons models experimentals per testar nous fàrmacs, fa que una de les prioritats en el camp dels trastorns bipolars sigui esbrinar el mecanisme d'acció dels compostos que s'hi han mostrat efectius. En les darreres dècades s'han descrit un gran nombre d'efectes neuroquímics provocats per aquests agents, però el seu mecanisme terapèutic continua essent un misteri. Per a la comprensió d'aquesta qüestió és necessari seguir investigant per tal de trobar noves dianes moleculars i per analitzar les implicacions que els seus efectes bioquímics i cel·lulars tenen sobre els circuits neuronals responsables de l'estat d'ànim (revisat a Zarate i Manji, 2008). Tot i que no és un factor necessari, serà de gran interès aprofundir en aquells efectes produïts de manera similar per diversos dels fàrmacs antibipolars (revisat a Harwood i Agam, 2003).

Una de les principals peculiaritats dels fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim és que els seus efectes beneficiosos no apareixen fins passats varis dies o setmanes de l'inici del tractament. De la mateixa manera, en interrompre el tractament les recaigudes no apareixen fins passats uns mesos. Això fa pensar que els seus efectes terapèutics impliquen el desencadenament de processos de neuroplasticitat que van apareixent com a conseqüència de l'acció sobre les seves dianes moleculars, que inclouen certs elements clau de la senyalització cel·lular (revisat a Schloesser et al., 2008).

2.1 Dianes moleculars del liti

Actualment s'ha demostrat que el liti actua directament sobre dues famílies de proteïnes (revisat a Harwood i Agam, 2003):

- a) Una superfamília de fosfomonoesterases que inclou la inositol-1 monofosfatasa (IMPasa), la inositol polifosfat 1-fosfatasa (IPPasa), la fructosa 1,6-bisfosfatasa, i la fosfoadenosina 5'-fosfat fosfatasa (PAPPasa).
- b) La família de les glicogen sintasa quinasa 3 (GSK-3), unes serina/treonina quinases altament conservades i identificades en tots els eucariotes examinats.

Donat que aquests enzims són de gran importància en diverses vies de senyalització cel·lular, el liti acaba afectant de manera indirecta a un gran nombre de proteïnes i processos cel·lulars.

2.2 Senyalització per fosfoinosítids

Probablement la hipòtesi que ha estat més extensament estudiada per tal d'explicar els efectes terapèutics del liti és l'alteració de la senyalització per fosfoinosítids causada per la depleció d'inositol (revisat a Harwood, 2005).

2.2.1 Inhibició de la IMPasa i depleció d'inositol

A principis dels anys 70, es va demostrar que el tractament amb liti provocava una reducció del 30% en la concentració d'inositol en còrtex de rata (Allison i Stewart, 1971), acompanyada d'un augment en l'inositol-1-fosfat (InsP₁) (Allison et al., 1976). Això ha fet que bona part de l'atenció dels investigadors que estudien el mecanisme d'acció del liti es centri en les vies de senyalització que involucren derivats de l'inositol.

El liti inhibeix l'enzim que catalitza la desfosforilació de l'InsP₁, la inositol monofosfatasa (IMPasa), amb una IC₅₀ de 0.8 mM (Hallcher et al., 1980), efecte que queda dins el rang de concentracions terapèutiques del liti. El liti és un inhibidor acompetitiu de la IMPasa: la seva activitat inhibidòria augmenta en incrementar la concentració de substrat, ja que el liti s'uneix al complex enzim-substrat, desplaçant un Mg²⁺ del centre actiu (Atack et al., 1995). Aquest inusual mecanisme d'inhibició implica que només es produirà una inhibició important de l'enzim quan es donen elevades concentracions de substrat, tal com passaria si l'estat patològic dels pacients provoqués una sobreactivació de la senyalització per PI-4,5-P₂/IP₃.

En resposta a determinats estímuls, el PI-4,5-P₂ és hidrolitzat per la fosfolipasa C (PLC), donant lloc a inositol trisfosfat (Ins(1,4,5)P₃ o IP₃) i diacilglicerol (DAG). L'IP₃ promou l'alliberació de Ca²⁺ de compartiments intracel·lulars, que juntament amb el DAG format activa la proteïna quinasa C (PKC). L'IP₃ acaba sent desfosforilat per acció de les inositol fosfatases donant lloc a inositol, que s'empra per sintetitzar PI tancant el cicle. El liti, en inhibir la IMPasa i altres enzims implicats en la desfosforilació de l'IP₃, com ara la IPPasa (Lopez-Coronado et al., 1999), o la PAP fosfatasa (Spiegelberg et al., 1999), bloquejarà aquest cicle. Per altra banda, sabent que la síntesi *de novo* d'inositol es dona a partir de la isomerització de la glucosa 6-fosfat a InsP₁, que ha de ser desfosforilat per la IMPasa, el liti acaba inhibint les dues principals rutes intracel·lulars per a la producció d'inositol: el reciclatge de l'IP₃ i la síntesi *de novo*, fet que es tradueix en una disminució dels nivells cel·lulars d'inositol.

A partir d'aquestes evidències, es va proposar la hipòtesi de la depleció d'inositol per a explicar els efectes terapèutics del liti (Berridge et al., 1989). Segons aquesta, en pacients

bipolars es produïrien en certes neurones episodis d'activació persistent de la PLC amb la conseqüent alliberació d'IP₃. El liti inhibiria la desfosforilació de l'IP₃ provocant a una disminució dels nivells intracel·lulars d'inositol, la qual cosa, en condicions on l'inositol limités la síntesi de PI, portaria a una disminució dels nivells de PI-4,5-P₂, afeblint les vies de senyalització que en depenen (Figura I-3). D'aquesta manera el liti estabilitzaria aquestes vies de senyalització quan sofrissin una sobreestimulació.

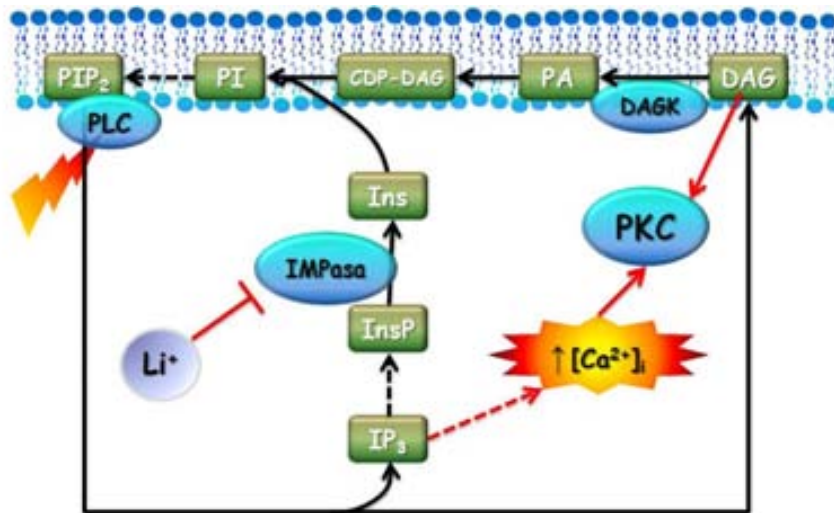


Figura I-3. Cicle dels fosfoinosítids i hipòtesi de la depleció d'inositol. Inhibint la IMPasa, el liti bloqueja el reciclatge dels inositol fosfats, produint una reducció dels nivells d'inositol que resultarà en una menor síntesi de PI i per tant un afebliment de les vies de senyalització dependents d'aquest fosfolípid. Abreviatures: diacilglicerol (DAG); àcid fosfatídic (PA); fosfatidilinositol (PI); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2); inositol-1,4,5-trisfosfat; Inositol (Ins); proteïna quinasa C (PKC); diacilglicerol quinasa (DAGK); fosfolipasa C (PLC); inositol monofosfatasa (IMPasa).

El *time course* terapèutic del liti és suficient perquè es produeixin canvis en l'expressió gènica. Tant la PKC com la CamKII (Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II) regulen l'expressió gènica i depenen de la senyalització per DAG i/o Ca^{2+} , de manera que la depleció d'inositol pot acabar afectant a un gran nombre de proteïnes. En aquest sentit, en un estudi massiu sobre l'efecte del liti en *slices* de còrtex de rata (Brandish et al., 2005), es detecten una seixantena de gens directament afectats per la depleció d'inositol.

El tractament crònic amb valproat també incrementa els nivells de InsP₁ en cervell de rata, fet que donaria suport a la implicació d'alteracions en la senyalització per derivats de l'inositol en el mecanisme terapèutic d'aquests fàrmacs (O'Donnell et al., 2000).

2.2.2 Efectes sobre la recaptació d'inositol

Tot i que algunes poblacions neuronals contenen poc inositol, al cervell els seus nivells intracel·lulars solen ser molt elevats, superant els 10 mM. En canvi, la concentració d'inositol

en el fluid cerebrospinal és de 400-600 μM , de manera que es fa necessària la seva importació activa, un procés que es dona tant en neurones com en glia (revisat a Van Calker i Belmaker, 2000). Al cervell s'hi ha descrit dos transportadors d'inositol. Un és el transportador Na^+ /inositol d'elevada afinitat ($K_m = 25\text{-}50 \mu\text{M}$), dependent de Na^+ i inhibit a pH àcid (SMIT) (Lubrich et al., 2000). L'altre transportador, de menor afinitat ($K_m = 100 \mu\text{M}$) i detectat només en astròcits, s'activa a pH baixos i és conegut com a transportador H^+ /inositol (HMIT) (Uldry et al., 2001).

Tot i que ni la carbamazepina ni el valproat inhibeixen la IMPasa (Vadnal and Parthasarathy, 1995), s'ha detectat que el valproat redueix els nivells d'inositol en cervell (O'Donnell et al., 2000). Aquest fet pot ser degut a un mecanisme similar al que s'observa en llevats, on el valproat inhibeix la síntesi de novo d'inositol (Shaltiel et al., 2004), però també es podria deure al fet que el tractament crònic (2 setmanes), però no agut, amb liti, valproat o carbamazepina altera la incorporació d'inositol extracel·lular en cèl·lules d'astrocitoma (revisat a Hertz et al., 2004). En aquestes cèl·lules, el tractament crònic amb estabilitzadors de l'estat d'ànim produeix una inhibició en la captació d'inositol quan són sotmesos a concentracions elevades d'inositol extracel·lular (50 μM) i un increment quan se'ls apliquen concentracions reduïdes d'inositol (25 μM), possiblement a un efecte invers sobre els SMIT i HMIT (Wolsfon et al., 2000). Aquest efecte podria ser degut al lleu increment de pH intracel·lular que s'ha observat en astròcits tractats amb liti, produït per l'increment en l'activitat de l'intercanviador Na^+/H^+ (Song et al., 2008)

És interessant que un altre efecte comú dels tres fàrmacs, el col·lapse dels cons de creixement de neurones ganglionars de rates nounades, pot ser revertit amb l'addició d'inositol (Williams et al., 2002).

2.2.3 Evidències de la depleció d'inositol en pacients bipolars

Els estudis de ^1H -MRS i ^{31}P -MRS en pacients bipolars mostren anormalitats en el metabolisme de l'inositol durant les seves fases depressives i de mania, que no s'observen durant els períodes d'eutímia, possiblement gràcies als efectes beneficiosos de la medicació (revisat a Silverstone et al., 2005). Tot i això les alteracions observades no són sempre les que s'esperarien segons la hipòtesi de la depleció d'inositol, i si bé en pacients joves no tractats i en fase de mania s'hi podria produir un lleuger increment en els nivells d'inositol, que es podria veure reduït amb el tractament amb liti (Davanzo et al., 2001; 2003). Tant en pacients medicats com no medicats s'observa una reducció en els nivells d'inositol en el còrtex frontal,

però no al cingulat, similar al que s'observa en depressió unipolar. En la majoria d'estudis en pacients tractats amb liti s'observa una disminució dels nivells d'inositol i un augment en el pic dels fosfomonoèsters que és consistent amb un increment en els nivells de InsP (Moore et al., 2000; Kato et al., 1995), tot i que en alguns casos s'han obtingut resultats diferents (Frey et al., 1998). En canvi, el liti no sembla alterar els nivells d'inositol o fosfomonoèsters en pacients eutímics o voluntaris sans, indicant que els seus efectes només es produïrien en situacions alterades (revisat a Silverstone et al., 2005).

Tot i això, en limfòcits (Belmaker et al., 2002) i plaquetes (Soares et al., 2000) de pacients bipolars tractats amb liti s'hi observa una menor concentració tant d'inositol com de PI. A més, un recent estudi metabonòmic sobre mostres *postmortem* de cervell mostra uns nivells d'inositol incrementats en còrtex prefrontal de pacients bipolars i reduït en hipocamp i estriat de rates tractades amb valproat o liti (Lan et al., 2009).

2.2.4 Crítiques a la hipòtesi de la depleció d'inositol

La hipòtesi de la depleció d'inositol explica de manera elegant com els efectes del liti sobre la IMPasa es poden traduir en el funcionament del cervell, però ha topat amb múltiples problemes que fan que no sigui plenament satisfactòria. Si bé s'accepta que el liti inhibeix la IMPasa en cervell i provoca l'acumulació de IP_1 , quan es mesuren els nivells d' IP_3 s'observa un comportament complex, amb molta variabilitat segons l'espècie, i en alguns casos fins i tot es dona un increment en els nivells d' IP_3 intracel·lulars en resposta a liti (Lee et al., 1992, Dixon et al., 1994). De manera similar, en cèl·lules C6 el valproat estimula la producció d' IP_3 en resposta a serotonina degut a una major expressió del receptor 5-HT_{2A} (Sullivan et al., 2004).

Tampoc queda clar que la modesta reducció en els nivells d'inositol provocada pel liti, sigui suficient per reduir la síntesi de PI i PI-4,5-P₂. La delecció del gen que codifica per SMIT en ratolins els provoca la mort al naixement (Berry et al., 2003), però tot i això, en els fetus s'hi pot observar una reducció del 90 % de l'inositol en cervell sense que es detectin alteracions en els nivells de PI (Berry et al., 2004). Tot i que no és segur que aquests resultats siguin extrapolables al cervell adult humà, semblen indicar que la depleció d'inositol induïda per liti no afecta la senyalització per fosfoinosítids. Per altra banda, en ratolins adults amb la delecció d'una còpia del gen de l'SMIT, que presenten una reducció del 33-37% de l'inositol cerebral, no s'hi ha detectat alteracions del comportament similars a les produïdes pel liti (Shaldubina et al., 2006; 2007).

Ara bé, és possible que el liti estigui alterant funcions de l'inositol o els inositol fosfats independents dels fosfoinosítids (Berry et al., 1999; Lee et al., 2007; Odom et al., 2000; Shaldubina et al., 2007), o bé que la depleció d'inositol es produeixi de manera molt més crítica en determinades regions cerebrals o cel·lulars, essent suficient per inhibir la senyalització per fosfoinosítids. Per altra banda, en neurones corticals de rata s'ha detectat l'expressió d'HMIT, però no d'SMIT (Di Daniel et al., 2006), i s'ha observat que la localització subcel·lular d'HMIT és regulada per l'activitat neuronal, indicant que podria estar implicat en l'aportació d'inositol per al cycle dels fosfoinosítids (Uldry et al., 2004). Tenint en compte que estudis en astròcits indiquen que l'inositol emprat per a la síntesi de fosfoinosítids es troba compartimentalitzat independentment del que participa en funcions d'osmoregulació (Wolfson et al., 2000), es podria explicar com la reducció dels nivells d'inositol cerebral per la delecció d'SMIT no afecta la síntesi de fosfoinosítids.

Tot i això, la importància dels fosfoinosítids en el funcionament del sistema nerviós (revisat a Hammond i Schiavo, 2006) fa que la hipòtesi de la depleció d'inositol continuï sent un mecanisme atractiu per explicar els efectes del liti.

2.2.5 Efectes sobre la senyalització per PKC

Les PKC (Protein Kinase C) són una nombrosa família de serina/treonina quinases involucrades en la transducció de senyals de proliferació cel·lular, diferenciació, apoptosi, senescència o angiogènesi. Es classifiquen en tres grups: PKCs convencionals (cPKC), que requereixen Ca^{2+} i DAG; les noves PKC (nPKC), que només necessiten DAG; i les atípiques (aPKC), independents de Ca^{2+} i DAG (revisat a Mellor i Parker., 1998). Tant el DAG i com el Ca^{2+} necessaris per activar algunes de les PKC apareixen en el transcurs de la via de senyalització de PI-4,5- P_2 /PLC.

Diversos estudis impliquen la PKC amb la fisiopatologia i el tractament dels trastorns bipolars (revisat a Catapano i Manji, 2008). El liti redueix en rates la translocació a membrana de les PKC (Wang et al., 2001), mentre que en cervells *postmortem* de pacients bipolars s'observa un increment en l'associació a membranes de la PKC (Wang i Friedman, 2001). El tractament crònic de rates amb liti redueix l'activitat PKC, en un efecte reversible per l'addició d'inositol (Manji i Lenox, 1999; Watson i Lenox, 1996). El valproat, però no la carbamazepina, també redueix l'activitat PKC, però en aquest cas l'efecte no es pot revertir amb inositol (Manji i Lenox, 1999). Tant el liti com el valproat redueixen l'expressió de PKC α i PKC ϵ , fet que fa pensar que l'alteració de l'activitat PKC pot ser independent de la depleció d'inositol.

La inhibició farmacològica de la PKC atenua la hiperlocomoció induïda per amfetamines (Einat et al., 2007), mentre que una excessiva activació de la PKC deteriora les funcions cognitives del còrtex prefrontal, l'exposició a estrés activa la PKC i la seva inhibició protegeix la funció cognitiva (Birnbaum et al. 2004). Tot això suggereix que una sobreactivació de la PKC pot tenir un paper important en certes manifestacions de la mania, regulant la senyalització pre- i postsinàptica, possiblement actuant a nivell dels receptors AMPA i NMDA (Szabo et al., 2009).

Dos estudis d'associació gènica independents mostren que una isoforma de la diacilglicerol quinasa (la DAGKH) és un gen de risc pels trastorns bipolars (Baum et al., 2008; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Amb la seva capacitat d'eliminar el DAG, les DAGK són un dels principals agents reguladors de les PKC (veure apartat 3.1.4), fet que dona molt pes a la hipòtesi que relaciona una sobreactivació de les PKC amb els trastorns bipolars.

Aquestes evidències fan que la inhibició de l'activitat PKC sigui una de les principals dianes per al desenvolupament de nous fàrmacs per al tractament de la mania (revisat a Arnsten et al., 2009), i estudis clínics amb tamoxifè, un inhibidor de la PKC, han mostrat una reducció significativa en els símptomes de mania de pacients bipolars (Bebchuk et al., 2000; Zarate et al., 2007). Tot i que el tamoxifè també posseeix propietats antiestrogèniques, estudis en rates suggereixen que el seu efecte antimànic es deu principalment a la inhibició de l'activitat PKC (Sabioni et al., 2008).

2.3 Inhibició de la GSK-3

L'altra gran diana molecular del liti és la inhibició de la glicogen sintasa quinasa-3 (GSK-3), una quinasa implicada en les vies de senyalització de Wnt, de la insulina i de neurotrofines, que participa en processos de proliferació, supervivència, diferenciació, axonogènesi, sinaptogènesi i en la regulació del metabolisme (figura I-4). Els seus efectes inclouen la regulació d'enzims metabòlics, de la dinàmica del citoesquelet i de diversos factors de transcripció (revisat a Jope i Johnson, 2004).

El liti és un inhibidor competitiu de la GSK-3, que desplaça un ió Mg^{2+} del seu lloc d'unió a l'enzim (Klein i Melton, 1996). Tot i això, la inhibició de la GSK-3 per liti presenta una IC_{50} *in vitro* de 1-2 mM, de manera que es produeix a partir de les concentracions més elevades de la seva finestra terapèutica, fet que ha fet dubtar de la rellevància d'aquesta inhibició pel que fa al mecanisme terapèutic del liti. En aquest sentit, s'ha proposat un mecanisme complementari pel que el liti inhibeix la GSK-3: afavorint-ne la inactivació per fosforilació

(Ser 9 en la GSK-3 β i Ser21 en la GSK-3 α)(De Sarno et al., 2002), actuant a nivell de la quinasa Akt (Chalecka-Franaszek i Chuang, 1999) o bé inhibint-ne la desfosforilació (Zhang et al, 2003). A favor d'aquesta possibilitat hi ha el fet que s'ha detectat un increment en la fosforilació de GSK-3 en cèl·lules sanguínies de pacients tractats amb liti (Li et al., 2007). La GSK-3 també és inhibida pel valproat (Chen et al., 1999) i per ECT (*Electroconvulsive seizure Treatment*), un tractament no farmacològic pels trastorns de l'estat d'ànim (Roh et al., 2003). En conjunt, aquest tipus d'evidències fan que la GSK-3 sigui una de les dianes més estudiades en el camp dels trastorns bipolars i el seu tractament (revisat a Gould et al., 2006).

2.3.1 Efectes de la inhibició de la GSK-3

La GSK-3 té gran rellevància en el sistema nerviós, on la ruta de Wnt és especialment important, tant en el desenvolupament com en cervell adult. El liti mimetitza els efectes de Wnt, alterant la morfologia dels cons de creixement axonal probablement actuant sobre la dinàmica dels microtúbuls (Williams et al 2004). Donada l'existència de neurogènesi en el cervell adult, l'efecte sobre el creixement axonal també es podria donar durant el tractament dels pacients. La β -catenina, un dels principals substrats de la GSK-3, està implicada tant en l'estructura del citoesquelet com en la regulació de l'expressió gènica, essent un component de les unions adherents i també un regulador de la família de factors de transcripció LEF-1/TCF-3. L'acció de la GSK-3 sobre la β -catenina depèn de la formació del complex GSK-3-Axina- β -catenina, que està regulada negativament pel lligand extracel·lular Wnt que, en unir-se al seu receptor, bloqueja de fosforilació de la β -catenina per la GSK-3.

Es creu que el receptor AMPA pot estar relacionat amb el tractament dels trastorns de l'estat d'ànim, i en aquest sentit, s'ha detectat un increment en la localització sinàptica d'aquest receptor en resposta al tractament amb antidepressius i una disminució en resposta a fàrmacs emprats en el tractament de la mania (Du et al., 2003). La inhibició de la GSK-3 bloqueja la LTD (*long-term depression*) en *slices* d'hipocamp (Peineau et al., 2007), de manera que la regulació del transport intermembranal del receptor AMPA pot jugar un paper determinant en l'acció de la GSK-3 en el tractament dels trastorns bipolars.

La inhibició farmacològica de la GSK-3 produeix efectes antidepressius (Kaidanovich-Beilin et al., 2004), mentre que ratolins amb la delecció d'una còpia de la GSK-3 β , mostren un comportament en el test de natació forçada similar al produït amb antidepressius (O'Brien et al., 2004), i una reducció en l'activitat locomotora induïda per amfetamines (Beaulieu, et al., 2004). Aquest és possiblement la única manipulació, a part del tractament amb liti, que

produeix tant efectes antidepressius com antimànics, fet que, juntament amb altres evidències que relacionen l'acció terapèutica del liti amb la inhibició de la GSK-3, ha incentivat la recerca d'inhibidors de la GSK-3 que puguin ser emprats en el tractament dels trastorns bipolars (revisat a Gould i Manji, 2005).

La GSK-3 també està implicada en la regulació dels ritmes circadians (Kaladchibachi et al., 2007), l'alteració del quals està relacionada amb els trastorns bipolars (revisat a Jackson et al., 2003) i amb el tractament amb liti (Jolma et al., 2006).

2.3.2 Efectes neuroprotectors dels estabilitzadors de l'estat d'ànim

Hi ha nombrosos estudis que mostren les propietats neurotròfiques i neuroprotectives del liti i, en menor mesura, del valproat (revisat a Chuang, 2005). S'ha detectat que els pacients que responen positivament al liti, però no els que no ho fan, mostren un increment en la matèria gris específicament en certes regions (Bearden et al., 2007). L'activació de la GSK-3 promou l'apoptosi per la qual cosa es creu que les propietats neuroprotectores dels estabilitzadors de l'estat d'ànim es deuen a la inhibició d'aquesta quinasa (revisat a Jope i Bijur, 2002).

S'han descrit nombrosos efectes dels estabilitzadors de l'estat d'ànim que podrien estar implicades en les seves propietats neuroprotectores (figura I-4), com ara alteracions en els nivells de bcl-2 mitocondrials (Chen et al., 1999), en l'alliberació de BDNF i activació de la via d'ERK1/2 (Fukumoto et al., 2001; Hao et al., 2004), en el receptor AMPA (Du et al., 2003), en la glutatíon-S-transferasa (Cui et al., 2007), la senyalització per Notch (Higashi et al., 2007) o el receptor de glucocorticoides i la seva cochaperona BAG-1 (Basta-Kaim et al., 2004; Zhou et al., 2005).

Algunes alteracions cerebrals associades als trastorns bipolars, com ara la major incidència de WMHs (*white matter hyperintensities*) subcorticals podrien ser un indicador de vulnerabilitat de neurones o glia (revisat a Manji i Duman., 2001). Aquesta vulnerabilitat pot ser causada per alteracions en canals de calci, disfuncions mitocondrials o estrés reticular. Això ha portat a alguns autors a defensar que els efectes neurotròfics dels estabilitzadors de l'estat d'ànim són els responsables de la seva acció terapèutica (revisat a Machado-Vieira et al., 2009) i que els trastorns bipolars estarien produïts per la pèrdua o disfunció de neurones que participen en l'estabilització de l'estat d'ànim (revisat a Kato, 2008).

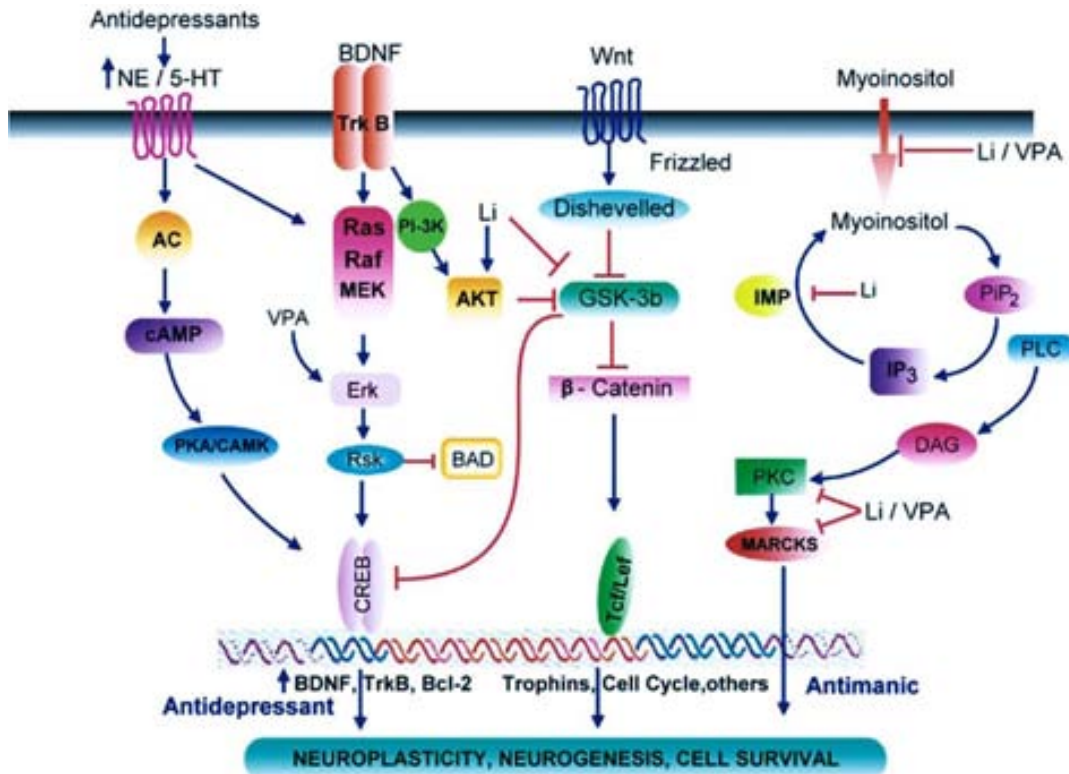


Figura I-4. Principals vies de senyalització afectades pels fàrmacs antidepressius i estabilitzadors de l'estat d'ànim. De Coyle and Duman (2008). *Neuron*.

2.4 Altres dianes dels estabilitzadors de l'estat d'ànim

El liti també inhibeix altres fosfomonoesterases, com la PAP fosfatasa, de manera que provoca un increment en els nivells de PAP, un potent inhibidor d'enzims que utilitzen 3'-fosfoadenosina-5-fosfosulfat (PAPS), com les sulfotransferases, però no es sap com aquesta propietat pot estar relacionada amb els efectes terapèutics del liti.

Les propietats antiepilèptiques de la carbamazepina s'atribueixen a la seva capacitat d'afavorir la conformació inactiva dels canals de Na^+ dependents de voltatge (Courtney et al., 1983), però es desconeix si aquest efecte està relacionat amb els seus efectes en pacients bipolars. S'ha proposat que el valproat també pot produir un efecte inhibitori directe sobre aquests canals, però es considera que les seves propietats anticonvulsives es deuen principalment a la seva capacitat d'incrementar els nivells cerebrals de l'àcid γ -aminobutíric (GABA), possiblement inhibint l'àcid succínic semialdehid deshidrogenasa, fet que incrementa els nivells d'àcid succínic semialdehid, que inhibeix la degradació del GABA per la GABA transaminasa (revisat a Rosberg, 2007). D'altra banda, el valproat inhibeix directament la histona desacetilasa (HDAC) (Phiel et al., 2001), fet que pot estar relacionat

amb els seus importants efectes sobre l'expressió gènica (Tang et al., 2004; Bosetti et al., 2005).

També s'ha descrit que el valproat inhibeix la prolil oligopeptidasa (PO) (Cheng et al., 2005), implicada en la regulació dels fosfoinosítids, i que en pacients bipolars eutímics tractats amb liti mostra una activitat en plasma inferior als controls (Breen et al., 2004). L'activitat PO és necessària per les funcions cerebrals, i canvis en l'activitat PO s'han associat a trastorns de l'estat d'ànim i altres malalties mentals (Maes et al., 1995). Es considera que alteracions en la PO podrien portar a defectes en les concentracions cel·lulars d'inositol, que serien corregits pel tractament amb fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim.

3 Els fosfolípids

Una de les principals peculiaritats del cervell, en relació amb altres òrgans, és la seva composició lipídica, on hi destaquen els seus elevadíssims nivells de colesterol i àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) (revisat a Dietschy i Turley, 2004). Paral·lelament a les seves funcions estructurals, els lípids són protagonistes de diversos aspectes clau de la fisiologia cerebral, com ara la mielinització (revisat a Garbay et al., 2000), el creixement de neurites (revisat a Vance et al., 2005), la sinaptogènesi (revisat a Slezak i Pfrieder 2003), i la senyalització cel·lular (revisat a Bazan, 2003). En nombrosos desordres neurodegeneratius i neuropsiquiàtrics, s'observen alteracions en el metabolisme dels lípids, fet que indica que la seva alteració pot estar relacionada amb nombrosos estats patològics (revisat a Adibhatla i Hatcher, 2008).

Els components essencials de les membranes biològiques són els fosfolípids, unes molècules amfipàtiques que contenen un cap polar ionitzat i una cua hidrofòbica, que en el cas dels glicerofosfolípids s'uneixen per un esquelet de glicerol. Les membranes cel·lulars dels mamífers contenen més de 1000 tipus de glicerofosfolípids, una heterogeneïtat que resulta de la presència de diferents àcids grassos en posició sn-1 i sn-2 del glicerol, i de diferents caps polars en sn-3 (figura I-5). La naturalesa d'aquest cap polar defineix les diferents classes de glicerofosfolípids.

La fosfatidilcolina (PC) és el més abundant i representa un 40–50% dels fosfolípids de

les membranes cel·lulars, mentre que el segon lloc l'ocupa la fosfatidiletanolamina (PE) amb un 20-50%, en funció del teixit. Altres glicerofosfolípids, més minoritaris, són la fosfatidilserina (PS), el fosfatidilinositol (PI) i la cardiolipina (CL). La composició de cada membrana dependrà de les transformacions metabòliques i processos de transport de fosfolípids que hi tinguin lloc, i serà una característica pròpia de cada cèl·lula i òrganul, on cada monocapa de la bicapa lipídica mostrarà una composició pròpia (revisat a Voelker, 2003;

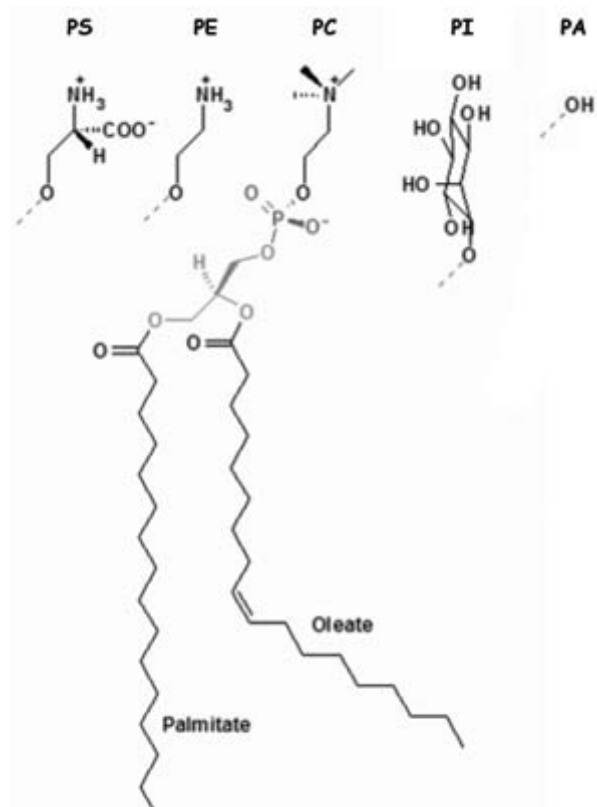


Figura I-5. Estructura molecular dels principals glicerofosfolípids.

Devaux et al., 2008). En funció de la seva composició les membranes tindran unes determinades característiques fisicoquímiques en quant a la seva fluïdesa, permeabilitat, curvatura, càrrega, compactació molecular o grau d'hidratació, que seran determinants per a la seva funció cel·lular i modularan l'activitat de les proteïnes de membrana. Per altra banda, els fosfolípids formen part de nombroses vies de senyalització cel·lular, ja sigui com a precursors de nombrosos missatgers secundaris o actuant sobre determinades proteïnes. Tot plegat fa que sigui de gran interès l'estudi d'alteracions en el seu metabolisme associades a estats patològics (revisat a Wymann i Schneider, 2008)

3.1 Biosíntesi dels glicerofosfolípids

En cèl·lules eucariotes, la biosíntesi de l'àcid fosfatídic (PA) és l'eix central de les diferents rutes per a la síntesi *de novo* de la resta de glicerolípid (revisat a Kent, 1995) (figura I-6).

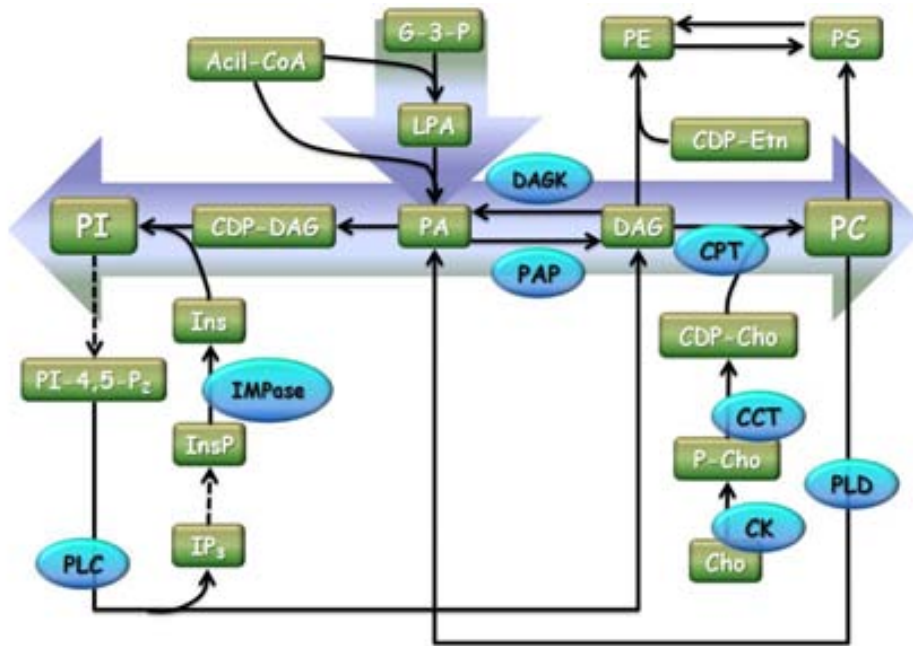


Figura I-6. Principals rutes del metabolisme dels fosfolípids. Abreviatures: glicerol-3-fosfat (G-3-P); àcid gras acilat a coenzim A (acil-CoA); àcid lisofosfatídic (LPA); àcid fosfatídic (PA); diacilglicerol (DAG); colina (Cho); fosfocolina (P-Cho); CDP-colina (CDP-Cho); fosfatidilcolina (PC); fosfatidiletanolamina (PE); CDP-etanolamina (CDP-Etn); fosfatidilserina (PS); CDP-diacilglicerol (CDP-DAG); inositol (Ins); fosfatidilinositol (PI); fosfatidilinositol-4-5-bisfosfat (PI-4,5-P₂); inositol-1,4,5-trisfosfat (IP₃); inositol fosfat (InsP); fosfolipasa C (PLC); fosfolipasa D (PLD); inositol monofosfatasa (IMPasa); àcid fosfatídic fosfatasa (PAP); diacilglicerol quinasa (DAGK); colina quinasa (CK); CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT); CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT).

3.1.1 Síntesi *de novo* de l'àcid fosfatídic

El PA es sintetitza per esterificació seqüencial del glicerol-3-fosfat (G-3-P) amb dos cadenes d'àcid gras subministrades en forma d'acil-CoA, passant en primer lloc per àcid lisofosfatídic (LPA), que seguidament és acilat a PA. A part del glicerol-3-fosfat, la dihidroxiacetona fosfat

(DHAP) també es pot acilar i reduir posteriorment amb NADH per formar un petit percentatge de l'àcid lisofosfatídic produït a la cèl·lula.

La glicerol-3-fosfat aciltransferasa (GPAT) catalitza la primera reacció de la biosíntesi de fosfolípids (revisat a Gimeno i Cao, 2008). El G-3-P prové de la reducció del DHAP o de la fosforilació del glicerol. L'acil-CoA, per la seva banda, es produeix per acció de les *long-chain* o *very-long-chain acyl-CoA synthetases* (AcsI) (revisat a Digel et al., 2009; Soupene i Kuypers, 2008). El darrer pas per a la síntesi de novo de PA correspon a l'acilació de l'LPA catalitzada per l'acil-CoA:1-acilglicerol-sn-3-fosfat acitransferasa (AGPAT) una activitat que s'ha detectat tant en microsomes com en mitocondris i membrana plasmàtica (revisat a Shindou i Shimizu, 2009).

Un cop format el PA, la ruta biosintètica dels fosfolípids es divideix en dues branques, una que parteix de la desfosforilació del PA a DAG i una altra que s'inicia amb la formació de CDP-DAG per l'unió de CTP al PA. L'àcid fosfatídic fosfohidrolasa (PAP) i la CDP-diacilglicerol sintetasa s'encarregaran de portar les molècules de PA cap a una o altra branca.

3.1.2 Via del DAG: l'àcid fosfatídic fosfohidrolasa (PAP)

La PAP catalitza la desfosforilació del PA dependent de Mg^{2+} , donant lloc a DAG i fosfat (P_i) (revisat a Carman i Han, 2009). El DAG format serà emprat per a la síntesi *de novo* de PC, PE, PS i triacilglicèrids (TAGs), i per altra banda, participarà en senyalització cel·lular, principalment activant diverses isoformes de la PKC. D'aquesta manera la PAP potencia les vies de senyalització dependents de DAG i atenua les dependents de PA, que es creu que participa en l'activació i captació a membranes, de diverses proteïnes. Fins al 2006 no es va identificar el gen de la PAP en llevats (Han et al., 2006), fet que ha permès descobrir que les lipines de mamífer són enzims amb activitat PAP (Donkor et al., 2007; revisat a Reue i Brindley, 2008). A més de l'activitat PAP corresponent a les lipines, enzims citosòlics, la cèl·lula també presenta una altra activitat PAP lligada a membranes, que no sol contribuir significativament a la biosíntesi de fosfolípids i que correspon a les lípid fosfat fosfatases (LPPs), uns enzims de membrana que entre altres funcions participen en la formació de DAG a partir del PA produït per l'estimulació de la PLD (revisat a Brindley, 2004). Ambdues activitats es poden distingir perquè a diferència de les LPPs, les lipines requereixen Mg^{2+} i són inhibides per N-etilmaleïmida. A part d'això, les lipines es mostren específiques pel PA, mentre que les LPPs actuen sobre diversos fosfolípids.

3.1.3 Via del CDP-DAG

L'altra branca de les rutes de biosíntesi de fosfolípids s'inicia amb la síntesi de CDP-DAG a partir de PA i CTP per part de la CDP-diacilglicerol sintasa (revisat a Heacock i Agranoff 1997). A diferència del PA, i de manera similar al PI, el CDP-DAG conté majoritàriament àcid esteàric i àcid araquidònic en posició sn-1 i sn-2 respectivament. És possible que la CDP-diacilglicerol sintasa actuï preferentment sobre les molècules de PA amb aquesta composició, però en estudis d'activitat in vitro no s'ha observat aquest comportament. Una altra possibilitat és que la composició dels àcids grassos del PI es defineixi amb processos de desacilació/reacilació, i que es traslladi al CDP-DAG format a partir del reciclatge de DAG provinent de la hidròlisi dels fosfoinosítids.

Els nivells de CDP-DAG cel·lulars són molt reduïts fet que podria indicar que la seva formació és el pas limitant per a la síntesi de PI. Tot i això, es desconeixen els mecanismes de regulació de la CDP-DAG sintasa. En presència de liti, que redueix els nivells d'inositol inhibint la IMPasa, els agonistes de la PLC produeixen una acumulació de CDP-DAG que es reverteix amb l'addició d'inositol (Godfrey, 1989). Aquesta acumulació de CDP-DAG es deu a una menor síntesi de PI, fet que dona suport a la hipòtesi de la depleció d'inositol per explicar els efectes del liti (Berridge et al., 1989).

L'activitat CDP-DAG sintasa es troba majoritàriament al reticle endoplasmàtic (ER), i en menor mesura als mitocondris, on participarà en la síntesi de PG, però no sembla que l'enzim es trobi a la membrana plasmàtica (Morris et al 1990). Aquest fet implica que els diferents passos del cicle dels fosfoinosítids tenen lloc en compartiments cel·lulars diferents, fet que fa necessari el transport intermembranaral d'intermediaris.

3.1.4 La diacilglicerol quinasa (DAGK)

Paral·lelament a les PAP i LPPs, la DAGK, també pot controlar el flux entre PA i DAG (revisat a Mérida et al., 2008). Les DAGK són especialment abundants en el cervell, i en mamífers se'n coneixen 10 isoformes, classificades en 5 grups segons la presència de certs dominis reguladors, que els confereixen propietats específiques en quant al seu lloc d'actuació i mode d'activació. Totes elles contenen dominis C1 d'unió a DAG, homòlegs als de la PKC, i es considera que són enzims citosòlics que s'activen per translocació a membranes. Tradicionalment, la principal funció que s'ha atribuït a les DAGK és l'atenuació de les vies de senyalització dependents de DAG, i en aquest sentit, l'activació de diverses DAGK va

acoblada a la de vies productores de DAG. La DAGK també és important en el metabolisme dels fosfolípids, afavorint la síntesi de PI en detriment dels fosfolípids generats amb DAG, fet que la converteix en una peça essencial del cicle dels fosfoinosítids (figura I-3).

3.2 La fosfatidilcolina

La fosfatidilcolina (PC) és el principal fosfolípid de les lipoproteïnes i les membranes cel·lulars de mamífers (revisat a Li i Vance, 2008). A més de les seves funcions estructurals, és precursora de nombroses molècules senyalitzadores que s'alliberen per acció de diverses fosfolipases.

3.2.1 Síntesi de fosfatidilcolina

La biosíntesi de PC té lloc en totes les cèl·lules nucleades de mamífers a través de la ruta de la CDP-colina, o ruta de Kennedy (Kennedy i Weiss, 1956). La colina (Cho) recaptada per la cèl·lula és ràpidament fosforilada a fosfocolina (P-Cho), que es combinarà amb CTP per donar CDP-colina (CDP-Cho), que finalment s'addicionarà al DAG per formar la PC. Aquestes tres etapes vindran catalitzades per la colina quinasa (CK), la CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT), i la CDP-colina:1,2-dialcilglicerol colinafosfotransferasa (CPT) (revisat a Kent, 2005) (figura I-7).

En el fetge també es dona de manera significativa la síntesi de PC a partir de la metilació de la PE per la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT) (DeLong, C. J., et Al., 1999). Això implica que la colina, que prové principalment de la dieta, pot ser sintetitzada al fetge per acció de la PEMT seguida de la hidròlisi de la PC formada. Prop del 95% de la colina total d'un teixit animal es trobarà en forma de PC.

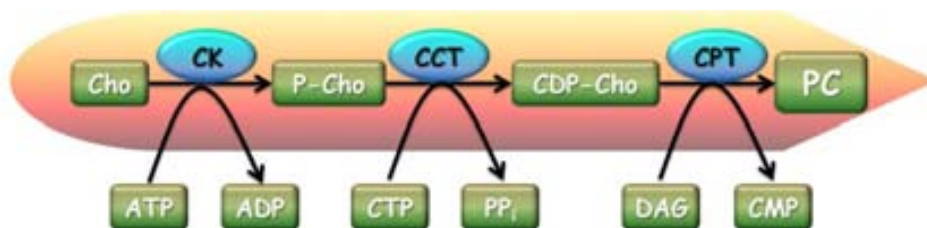


Figura I-7. Síntesi de fosfatidilcolina per la ruta de Kennedy. Abreviatures: diacilglicerol (DAG); colina (Cho); fosfocolina (P-Cho); CDP-colina (CDP-Cho); fosfatidilcolina (PC); adenosina trifosfat (ATP); adenosina difosfat (ADP); citidina trifosfat (CTP); citidina monofosfat (CMP); fosfat (Pi); pirofosfat (PPi); colina quinasa (CK); CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT); CDP-colina:1,2-dialcilglicerol colinafosfotransferasa (CPT).

3.2.2 Colina quinasa (CK).

La colina extracel·lular és recaptada per transportadors específics i ràpidament es fosforila al citosol per la CK. En algunes cèl·lules, com els hepatòcits, la colina també pot ser oxidada a betaina. Es coneixen 2 gens per la CK: el *Chka* i el *Chcb*, responsables de l'expressió de les CK α 1 i CK α 2 i de la CK β , respectivament (revisat a Aoyama, C., et al., 2004). A més del seu paper en la biosíntesi de PC, l'increment de P-Cho causat per l'activació de la CK és un element necessari per a la proliferació de fibroblasts estimulats amb certs factors de creixement (Cuadrado et al., 1993), i tant els tumors humans com les línies cel·lulars derivades de tumors humans solen mostrar nivells elevats de P-Cho i d'activitat CK (Bhakoo et al., 1996; Ramírez de Molina et al., 2002). D'aquesta manera, la CK està esdevenint una diana important per al diagnòstic i tractament del càncer (revisat a Ramírez de Molina et al., 2004).

3.2.3 CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT).

La CCT catalitza la conversió de la P-Cho a CDP-Cho, consumint CTP i alliberant pirofosfat, en una reacció que es considera el pas limitant i de regulació de la ruta de Kennedy. És codificada per dos gens que en humans i ratolí es troben en cromosomes diferents: el *Pcyt1a*, que codifica per la CCT α , i el *Pcyt1b*, que codifica per la CCT β 1 (només en humans), la CCT β 2 i la CCT β 3 (revisat a Jackowski i Fagone, 2005). La delecció de la CCT α en ratolins els provoca la mort en estats primerencs de l'embriogènesi (Wang et al., 2005), mentre que els que tenen deleccionada la CCT β 2 sobreviuen, però mostren alteracions gonadals i baixa fertilitat. Això concorda amb el fet que mentre que la CCT α es troba en tots els teixits, la CCT β 2 s'expressa predominantment en testicles, ovaris i cervell (Jackowski, et al., 2004).

Totes les isoformes de la CCT posseeixen centres catalítics similars, una cua C-terminal amb nombrosos llocs de fosforilació i un domini helicoïdal amfipàtic d'unió membranes que s'uneix preferentment a aquelles que presenten una deficiència en PC (Xie et al., 2004). Només la CCT α però, té en l'extrem N-terminal una regió de localització nuclear. Mentre que les isoformes β es troben associades al ER (Lykidis et al., 1999), la localització subcel·lular de la CCT α és un tema controvertit. Es sap que es troba al nucli, però hi ha estudis que també la situen al citosol o associada a les membranes del Golgi o el ER (Ridsdale et al., 2001; Houweling et al., 1996; Tian et al., 2008).

La CDP-Cho (o citicolina), el producte de la CCT, s'empra en alguns països pel tractament de l'Alzheimer, apoplexies o coma traumàtic i es creu que les seves propietats neuroprotectores deriven de l'estimulació de la síntesi de PC (Fioravanti i Yanagi, 2005; Adibhatla i Hatcher, 2005; Adibhatla et al., 2006). Tot i això, la CDP-Cho administrada oralment és ràpidament hidrolitzada a Cho i citidina per l'aparell digestiu, de manera que els seus efectes probablement es deuen a l'acció d'aquests compostos (revisat a Weiss, 1995).

3.2.4 CDP-colina:1,2-dialcíl glicerol colinafosfotransferasa (CPT).

El darrer pas de la ruta és la formació de PC a partir de CDP-Cho i DAG (McMaster i Bell, 1997). Aquesta reacció és catalitzada per les proteïnes integrals de membrana CPT, exclusiva per la CDP-Cho, i CEPT, que empra indistintament CDP-Cho i CDP-Etn (Henneberry i McMaster, 1999; Henneberry et al., 2000). Sovint s'ha considerat que l'activitat CPT es troba en excés en la cèl·lula, de manera que la quantitat d'enzim no afectaria la síntesi de PC. Tot i això, en algunes situacions la síntesi de PC s'ha mostrat governada per canvis en l'activitat CPT (Araki i Wurtman, 1997).

Sobreexpressant els gens de la CPT i la CEPT s'ha determinat que es troben al Golgi i ER respectivament (Henneberry et al., 2002). Tot i això, l'anàlisi proteòmic dels components de la via secretòria identifica la CEPT i no la CPT en les cisternes del Golgi (Gilchrist et al., 2006), mentre que la CPT s'ha trobat associada a la biogènesi del ER en limfòcits B (Fagone et al., 2007) i fibroblasts (Sriburi et al., 2004).

3.2.5 Regulació de la síntesi de fosfatidilcolina

La biosíntesi de PC es regula principalment a nivell de la CCT. L'hèlix amfipàtica de la CCT efectua una acció autoinhibitòria sobre el centre actiu de l'enzim (Friesen et al., 1999) que desapareix amb la seva unió a membranes, d'aquesta manera l'activitat CCT està controlada principalment per amfitropisme, ja que passa d'una forma soluble inactiva a una d'activa per unió a membranes (revisat a Cornell i Northwood, 2000). La tendència de la CCT a unir-se a membranes depèn de la seva composició lipídica, i possiblement també de l'estat de fosforilació de l'enzim, ja que la forma fosforilada és menys activa i es troba unida a membranes en menor proporció (Yang i Jackowski, 1995). Entre els lípids que afavoreixen la translocació a membranes de la CCT hi destaquen els lípids aniònics, com els àcids grassos, o els de tipus II (cònics), com la PE insaturada o el DAG, mentre que elevats nivells de PC la desfavoreixen. Es creu que la membrana facilita la unió de la CCT quan presenta discontinuïtats en l'empaquetament regular dels fosfolípids, una baixa pressió lateral o bé per

estrès de curvatura degut a un excés de lípids amb geometria de tipus II com el DAG o la PE (Attard et al., 2000). Aquest mecanisme de regulació per unió a membranes permetria una ràpida activació de la CCT en resposta a un dèficit de PC.

La regulació també es podria donar a nivell de localització subcel·lular, doncs s'ha detectat que en la fase G1 del cicle cel·lular es dona una sortida de la CCT del nucli acompanyada d'un increment en la seva activitat (Northwood et al., 1999). Es creu que en la fase G1 hi ha una elevada taxa de síntesi i degradació de PC, mentre que en la fase S, continua la seva síntesi però se'n redueix la degradació, fet que permet assolir els nivells de PC necessaris per a la divisió cel·lular (Jackowski, 1996). En les fases G2 i M, per contra, es donaria una inhibició general del metabolisme dels fosfolípids.

Tot i que els processos postranscripcionals juguen un paper essencial en la regulació de l'activitat CCT, durant els darrers anys s'ha posat de manifest que la CCT α també és regulada a nivell de la seva expressió (revisat a Sugimoto et al., 2008). La transcripció del *Pcyt1a* es veu influenciada per nombrosos factors de transcripció, com Sp3, Ets, Net, Tef4, E2F, Rb, HDAC i, especialment, Sp1. En canvi d'altres factors de transcripció implicats en metabolisme energètic i lipídic, com SREBP1c o els PPARs, no semblen participar en la regulació de la biosíntesi de PC. Per altra banda, els nivells de CCT α poden ser controlats per processos postranscripcionals, ja sigui a nivell de la seva traducció (Sriburi et al., 2007), com de la seva proteòlisi (Lagace et al., 2002; Mallampari et al., 2000).

3.2.6 Captació de colina

A excepció dels hepatòcits, les cèl·lules de mamífer no sintetitzen colina, de manera que aquest compost ha de ser importat del medi extracel·lular. Es coneixen tres sistemes de captació cel·lular de colina: per difusió facilitada, per transport actiu de baixa afinitat, i pel d'alta afinitat (revisat a Michel et al., 2006). Aquests sistemes de transport són possibles gràcies a tres famílies de transportadors, els CHT (*High-affinity choline transporters*), els OCT (*Organic Cation Transporter*), de baixa afinitat i els CTL (*Choline Transporter-Like*), d'afinitat intermitja i independents de Na⁺. Els CHTs són dependents de Na⁺, i més que participar en el metabolisme de la PC, la seva principal funció es recaptar la colina necessària per la síntesi d'acetilcolina en les neurones colinèrgiques (revisat a Sarter i Parikh, 2005).

3.3 Altres glicerofosfolípids

3.3.1 La fosfatidilserina (PS)

La PS és el fosfolípid aniònic més abundant, tot i que només representa el 2-10% dels fosfolípids de les membranes cel·lulars (revisat a Vance, 2008). A més del seu paper com a cofactor de diverses proteïnes, la PS ha captat l'atenció dels investigadors perquè durant els primers estadis de l'apoptosi és translocada a la monocapa externa de la membrana plasmàtica per tal d'afavorir el reconeixement de la cèl·lula per part dels fagòcits (Fadok et al., 1992; Balasubramanian, et al., 2007).

En mamífers la PS es sintetitza per l'intercanvi de L-serina pel cap polar de la PC o la PE, una reacció catalitzada per les PS sintasa-1 i -2 respectivament. Aquesta reacció es produeix preferentment en unes regions del reticle endoplasmàtic íntimament relacionades amb els mitocondris, les MAM (*Mitochondria-Associated Membranes*), i és seguida per l'exportació de la PS a aquests orgànuls, on es podrà emprar per sintetitzar-hi PE (Stone, i Vance, 2000).

3.3.2 La fosfatidiletanolamina (PE)

La PE és especialment abundant al cervell, on constitueix al voltant del 45% dels fosfolípids membranals (revisat a Vance, 2008). A més de les seves funcions estructurals, la PE participa en processos de fusió i fissió membranals, en l'ancoratge de proteïnes, en la secreció de lipoproteïnes i en la citoquinesi, i és precursora de diverses espècies moleculars, com l'anandamida, un lligand dels receptors cannabinoides.

En mamífers la biosíntesi de la PE es produeix majoritàriament per dues vies: la via de la CDP-etanolamina (CDP-Etn) i la de la descarboxilació de la PS. La importància relativa de cadascuna d'aquestes vies dependrà del tipus cel·lular. També es pot sintetitzar a partir de PS per la reacció inversa de la PS sintasa-2, però la contribució d'aquesta via es considera insignificant.

La via de la CDP-Etn és anàloga a la de la CDP-Cho per a la síntesi de PC. Parteix de l'etanolamina, que en mamífers s'obté majoritàriament de la dieta, ja que no hi pot ser sintetitzada a partir de L-serina. L'etanolamina quinasa (EK) forma P-Etn, que és transformada a CDP-Etn per la CTP:fosfoetanolamina citidiltransferasa (CET), en el pas limitant de la ruta, que té lloc majoritàriament en el reticle endoplasmàtic (Henneberry, et al., 2002). Tot i això, en certes condicions s'ha observat que el pas limitant pot ser la fosforilació de l'etanolamina (Lykidis, 2001). La darrera reacció de la ruta, l'addició de la CDP-Etn a

DAG, és catalitzada per la CDP-etanolamina:diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa (CEPT). Tal com s'ha detallat anteriorment, aquest enzim presenta activitat tant pel que fa a la CDP-Etn com per la CDP-Cho (Henneberry i McMaster, 1999), mentre que la CPT només catalitza la reacció de la CDP-Cho (Henneberry et al., 2000). Això ha fet pensar que tota l'activitat etanolaminafosfotransferasa de la cèl·lula és produïda per un enzim que també posseeix activitat colinafosfotransferasa, però recentment s'ha clonat una nova isoforma humana que sobreexpressada en *E. Coli* resulta específica per la CDP-Etn (Horibata i Hirabayashi, 2007).

La formació de PE per descarboxilació de PS té lloc als mitocondris, de manera que existeixen almenys dos punts separats de biosíntesi d'aquest fosfolípid: el reticle endoplasmàtic i els mitocondris. La reacció ve donada per la PS descarboxilasa (PSD), però el pas limitant és l'exportació de PS formada a les zones MAM del reticle, cap a la monocapa externa de la membrana interna dels mitocondris, molt rica en PE.

Tant els ratolins *Pcyt2* *-/-*, que no expressen la CTP:fosfoetanolamina citidililtransferasa (Fullerton et al., 2007), com els *Psd* *-/-*, que no expressen la PSD (Steenbergen, et al., 2005), moren durant el desenvolupament, fet que indica que ambdues vies són essencials per a la producció de PE almenys durant aquesta etapa i no es poden compensar entre elles.

En certes cèl·lules, com ara les neurones, la major part dels fosfolípids de tipus PE contenen un enllaç èter en posició sn-1. Aquests lípids, que s'anomenen plasmalògens quan contenen un grup vinil (amb un doble enllaç *cis* en 1'), es formen a partir de la substitució del grup acil en posició sn-1 de l'acil-dihidroxiacetona fosfat per un grup alquil i el posterior processat per les vies de síntesi de fosfolípids (revisat a Nagan i Zoeller, 2001).

3.3.3 El fosfatidilinositol (PI)

L'estudi del metabolisme del PI és de gran interès per la seva implicació en les vies de senyalització cel·lular on participen les seves múltiples formes fosforilades, els fosfoinosítids (revisat a Hamond i Schiavo, 2006). El PI es sintetitza a partir de la PI sintasa, amb l'addició d'inositol sobre el CDP-DAG, alliberant CMP. Els diferents fosfoinosítids es formaran per la fosforilació seqüencial del PI per la PI-4-quinasa, la PI-4-P 5-quinasa i la PI-3-K. Tot i que els fosfoinosítids són components minoritaris de les membranes eucariotes, el seu metabolisme és molt actiu, amb elevades taxes de conversió per quinases, fosfatases i fosfolipases, fet que juntament amb la seva capacitat de ser reconeguts per proteïnes efectores, els converteix en uns elements essencials en la regulació de la fisiologia cel·lular (revisat a Tolker, 2002).

Nombrosos receptors de membrana desencadenen les seves cascades de senyalització intracel·lulars mitjançant la hidròlisi del PI-4,5-P₂ per les PLC, generant IP₃ i DAG, o bé amb la seva fosforilació per la PI-3-K per formar PI-3,4,5-P₃ (revisat a Vanhaesebroeck, 2001) Reclutant a la membrana proteïnes amb dominis d'unió a fosfoinosítids, i generant missatgers secundaris, aquests processos participen en diverses funcions cel·lulars, com ara la regulació de la proliferació, supervivència, transport vesicular, dinàmica del citoesquelet o transmissió sinàptica (revisat a Di Paolo i De Camilli, 2006; Engelman et al., 2006; Hammond i Schiavo, 2007).

3.3.4 El fosfatidilglicerol i la cardioplipina

En eucariotes, la cardioplipina i el fosfatidilglicerol es troben específicament en la membrana interna dels mitocondris, i és en aquest orgànul on es biosintetitzen a partir del CDP-DAG, que mitjançant la fosfatidilglicerolfosfat sintasa, reacciona amb glicerol-3-fosfat per formar fosfatidilglicerolfosfat, que s'hidrolitza per la fosfatidilglicerolfosfat fosfatasa donant lloc al fosfatidilglicerol. Aquest pot reaccionar amb una altra molècula de CDP-DAG a través de la cardioplipina sintasa per formar la cardioplipina (revisat a Schlame, 2008).

3.4 Compartimentalització de les reaccions de la biosíntesi de fosfolípids

A partir d'un anàlisi exhaustiu de la literatura científica actual, Fagone i Jackowski han publicat una revisió on s'hi inclou un esquema amb la localització de les principals activitats enzimàtiques de la biosíntesi de fosfolípids un aspecte essencial per entendre el seu metabolisme (revisat a Fagone i Jackowski, 2009; figura I-8).

Figura I-8. Compartimentalització de les reaccions de la biosíntesi de fosfolípids. Lípids: AcylGnP, 1-acylglyceronephosphate; AlkylGnP, 1-alkyl-glyceronephosphate; AlkylGP, 1-alkyl-glycerophosphate; CDP-DAG, CDP-diacylglycerol; Cer, ceramide; SM, sphingomyelin; CL, cardiolipin; DAG, diacylglycerol; dhCer, dihydroceramide; GalCer, galactosylceramide; GlcCer, glucosylceramide; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PGP, phosphatidylglycerolphosphate; PI, phosphatidylinositol; PS, phosphatidylserine; kSphn, 3 ketosphinganine; LacCer, lactosylceramide; N-methyltransferase MGP, monoacylglycerophosphate; PlmaH, 1-alkyl,2-acylglycerol; PlmaP, 1-alkyl,2-acyl-glycerophosphate; PlmaPEtn, plasmanylethanolamine; PlmePCho, plasmeylcholine; PlmePEtn, plasmeylethanolamine; Sph, sphingosine; Sphn, sphinganine; SphnP, sphinganine-1-phosphate; SphP, sphingosine-1-phosphate; TAG, triacylglycerol. Enzims: AGPAT, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase; AGNPR, acyl/alkylglycerone-phosphate reductase; AGNPS, alkylglycerone-phosphate synthase; CDS, phosphatidate cytidyltransferase; CEPT, diacylglycerol choline/ethanolaminephosphotransferase; CERT, ceramide transfer protein; CGT, *N*-acylsphingosine galactosyltransferase; CPT, diacylglycerol cholinephosphotransferase; CLS, cardiolipin synthase; CRD, ceramidase; DGAT, ciacylglycerol *O*-acyltransferase; DHCD, dihydroceramide δ (4)-desaturase; EPT, ethanolaminephosphotransferase; GCS, ceramide glucosyltransferase; GNPAT, glycerone-phosphate *O*-acyltransferase; GPAT, glycerol-3-phosphate *O*-acyltransferase; KDSR, 3-ketosphinganine reductase; LCS, polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase; PAP, phosphatidic acid phosphatase; PED, plasmanylethanolamine desaturase; PEMT, phosphatidylethanolamine; PGP, phosphatidylglycerophosphate; PGS, CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase; PIS, CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase; PSD, phosphatidylserine decarboxylase; PSS1, phosphatidylserine synthase ; PSS2, phosphatidylserine synthase 2 ; SGMS, ceramide cholinephosphotransferase ; SNAT, sphingosine *N*-acyltransferase ; SPK, sphinganine kinase ; SPP, sphingosine-1-phosphate phosphatase; SPT, serine C-palmitoyltransferase.

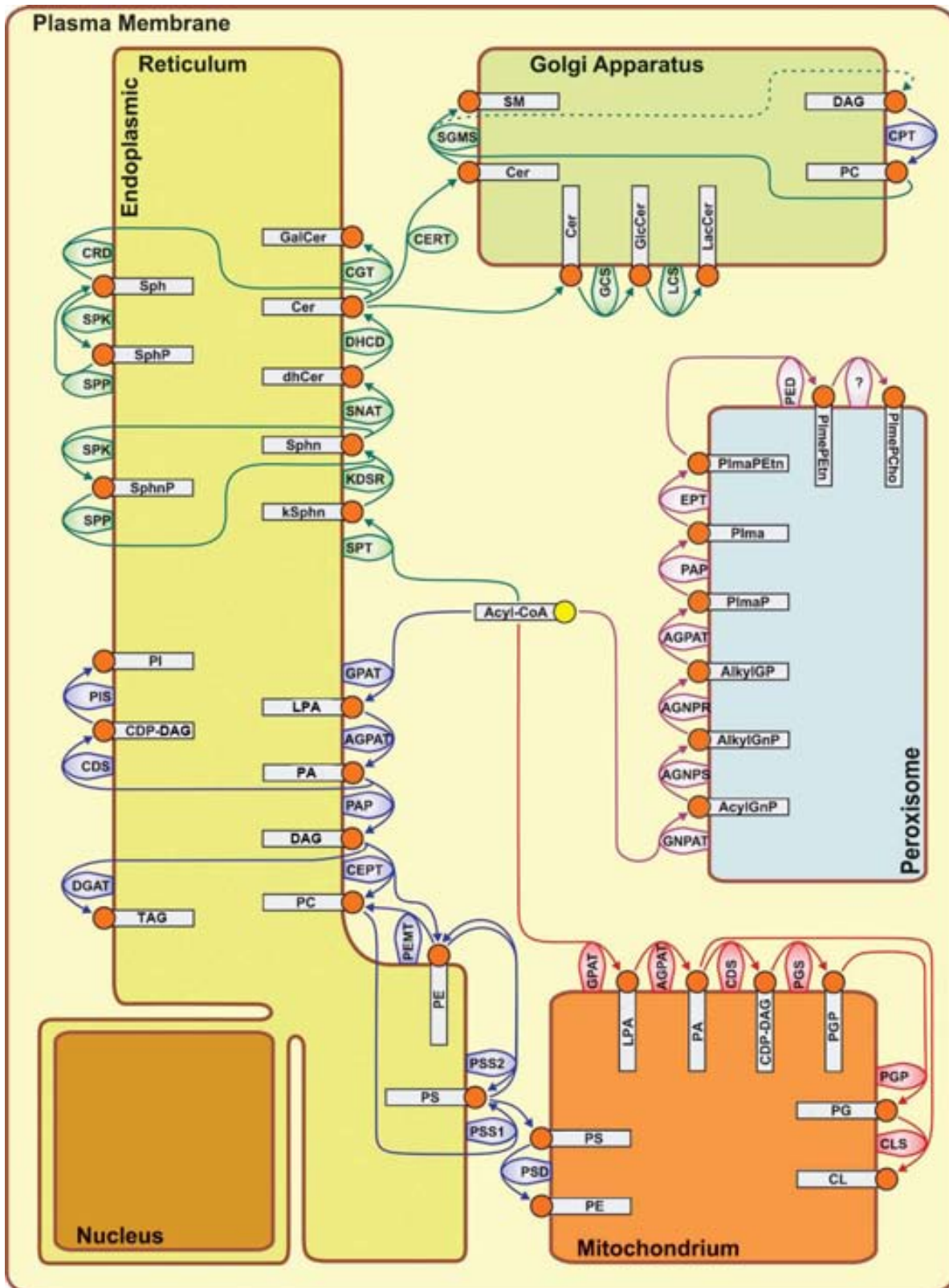


Figura I-8. Compartimentalització de les reaccions de la biosíntesi de fosfolípids. Adaptat de Fagone and Jackowski (2009). *J Lipid Research*.

El primer pas per a la síntesi de fosfolípids, l'acilació del G-3-P per donar lloc a LPA i posteriorment a PA, que serà emprat per a la síntesi de la resta de glicerolípid, té lloc al reticle endoplasmàtic (ER) i també als mitocondris. La síntesi de PC tindrà lloc al Golgi i al ER, on es troben la CPT i la CEPT, que també participarà en la síntesi de PE. L'activitat EPT, específica per a la PE, s'ha associat als peroxisomes, i possiblement està involucrada en la síntesi de plasmeniletanolamina, el plasmalogen més abundant (revisat a Nagan i Zoeller, 2001). Per altra banda la PE també pot ser sintetitzada a partir de la PS per intercanvi de grup polar per la PSS2 al ER, o per descarboxilació de la PS per la PS descarboxilasa als mitocondris (revisat a Vance, 2008). Per la seva banda, la PS serà sintetitzada al ER per intercanvi de grup polar de la PC o de la PE catalitzat per la PSS1 i la PSS2 respectivament (revisat a Vance, 2008). La síntesi de PI a través de la CDP-DAG sintasa i la PI sintasa tindrà lloc al ER (revisat a Heacock i Agranoff, 1997; Antonsson, 1997;), al mateix compartiment on es fosforilarà a PI-4-P, mentre que la resta de fosfoinosítids es formaran fora del ER (revisat a Di Paolo i De Camilli, 2006).

El triacilglicerol (TAG) també serà sintetitzat al ER (revisat a Coleman i Lee, 2004), mentre que la cardiolipina (CL), específica dels mitocondris, es sintetitza a la seva membrana interna (Revisat a Schlame, 2008). La síntesi de plasmalògens, glicerofosfolípids amb un enllaç vinil-éter en sn-1, té lloc als peroxisomes (revisat a Nagan i Zoeller, 2001).

La síntesi d'esfingolípid s'inicia al ER però s'estén fins al Golgi, on es produeixen les transformacions entre la ceramida, l'esfingomielina, la PC i el DAG (revisat a Futerman i Riezman., 2005). Els esfingolípid formen un grup de fosfolípids bioactius implicats en la regulació de múltiples processos cel·lulars, com creixement, mort, senescència, adhesió, migració, inflamació, angiogènesi i transport intracel·lular (revisat a Hannun i Obeid., 2008). Els esfingolípid formen un sistema complex que sens dubte ha de ser tingut en compte a l'hora d'estudiar les implicacions d'alteracions en el metabolisme lipídic de la cèl·lula, però queda fora de l'objecte d'aquesta tesi, centrat en els efectes del liti sobre els glicerofosfolípids.

Tot i ser sintetitzats específicament en certs orgànuls, els fosfolípids són transportats per tota la cèl·lula, i la composició de les membranes dependrà tant de les reaccions metabòliques, com dels fenòmens de transport que hi tinguin lloc. El transport de lípid entre membranes pot tenir lloc mitjançant vesícules, o per *lipid-transfer proteins*, un procés molt actiu i ràpid en les regions de contacte entre membranes (revisat a Holthuis i Levine, 2005).

3.5 Altres lípids

3.5.1 Els àcids grassos

El primer pas de la síntesi *de novo* d'àcids grassos és la carboxilació de l'acetil-CoA a malonil-CoA per l'acetil-CoA carboxilasa (ACC), un procés que es pot revertir per la malonil-CoA descarboxilasa (MCD) i que es considera el punt de regulació de la via (revisat a Saggerson, 2008). A partir del malonil-CoA i acetil-CoA, l'àcid gras sintasa (FAS) sintetitza els àcids grassos insaturats de cadena llarga, com el palmític, realitzant un complex procés catalític que consumeix 7 molècules d'ATP i 14 de NADPH per cada molècula de palmitat (revisat a Ronett et al., 2006). Els àcids grassos poden ser translocats als mitocondris on seran degradats per oxidació d'àcids grassos per generar ATP. La FAS es regula a nivell transcripcional, mentre que la ACC és regulada a nivell transcripcional i per fosforilació, i és inhibida per la presència d'acil-coA's de cadena llarga.

En situacions de demanda d'energia, els àcids grassos són degradats als mitocondris per β -oxidació, en un procés controlat per la carnitina palmitoiltransferasa, un enzim que és inhibit completament pel malonil-CoA (revisat a McGarry i Brown, 1997).

3.5.2 Els triacilglicèrids (TAG)

Al cervell es produeix síntesi de TAG, que seran acumulats en gotetes lipídiques com a reservori d'energia o per a la formació de DAG i fosfolípids. Per altra banda, el procés de síntesi de TAG afecta processos de senyalització disminuint els nivells de DAG i de àcids grassos lliures (revisat a Coleman i Lee, 2004). La formació de TAG a partir de DAG i un acil-CoA és catalitzada per la diacilglicerol:acil-CoA aciltransferasa (DGAT). La regulació de la síntesi de TAGs i de la seva hidròlisi és complexa, i inclou processos transcripcionals i post-transcripcionals on hi juguen un paper determinant els factors de transcripció SREBP-1c, PPAR γ i LXR i els seus lligands.

3.5.3 El Colesterol

El colesterol és un component essencial de les membranes cel·lulars, i contribueix en gran mesura a les seves propietats biofísiques. Tot i que cervell és l'òrgan on el colesterol és més abundant, pràcticament no recapta lipoproteïnes de la sang (revisat a Dietschy i Turley, 2004), per la qual cosa ha de ser sintetitzat en el propi cervell (Turley et al., 1996). El primer pas en la síntesi de colesterol té lloc al citosol, amb la conversió de 3 molècules d'acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que és seguit per la seva reducció a mevalonat, una

reacció catalitzada per la HMG-CoA reductasa, considerat l'enzim limitant de la via i que es troba altament regulat, principalment a nivell de la seva expressió gènica. Posteriorment, una sèrie de reaccions convertirà el mevalonat en colesterol, que podrà ser acilat per la acil-CoA aciltransferasa (ACAT) per donar lloc als ésters de colesterol, que s'emmagatzemaran en gotes lipídiques.

Si bé les neurones poden sintetitzar colesterol, bona part d'aquest lípid els és subministrat pels astròcits en forma de lipoproteïnes amb ApoE (apolipoprotein E) (Funfschilling et al., 2007). Un polimorfisme de l'ApoE és el principal factor de risc per al desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer (revisat a Hooijmans i Kiliaan, 2008), fet que dóna una idea de la importància d'aquest procés per al funcionament del sistema nerviós. El colesterol enviat a les neurones serà especialment important en la formació i manteniment de sinapsis (Mauch et al., 2001), que requeriran aquest lípid tant per als seus *lipid raft*, de gran importància tant per a la formació de vesícules presinàptiques (Thiele et al., 2000), com pel correcte funcionament dels receptors postsinàptics (revisat a Allen, 2007). El control de la síntesi i alliberació de colesterol en astròcits està dirigit pels SREBPs (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*), una família de factors de transcripció que participen en la regulació del metabolisme del colesterol i els àcids grassos (revisat a Camargo et al., 2009). Els SREBPs es troben inserits en la membrana del ER, però en disminuir la concentració de colesterol, l'SREBP és proteolitzat i el seu fragment N-terminal és transportat al nucli, on activa l'expressió de gens que afavoreixen la síntesi de colesterol, d'àcids grassos i la captació d'LDL's, entre d'altres processos.

3.6 Senyalització per glicerofosfolípids en el sistema nerviós

En el sistema nerviós, els glicerofosfolípids presenten una taxa de renovació molt elevada gràcies a l'acció paral·lela de les rutes biosintètiques i de les fosfolipases que s'encarreguen d'hidrolitzar-los (revisat a Farooqui et al., 2000; Bazan, 2005) (figura I-9). L'acció de fosfolipases genera una plèthora de missatgers secundaris implicats en tot tipus de processos cel·lulars, com ara neuritogènesi, regeneració, apoptosi, inflamació, neurodegeneració, proliferació, secreció o tràfic intermembranal. L'estimulació d'un únic receptor de membrana pot portar a l'activació de diverses fosfolipases, que iniciaran una complexa cascada de senyalització on els productes d'unes participen en les reaccions de les altres.

3.6.1 Segons missatgers generats per la fosfolipasa A (PLA)

La PLA₁ catalitza la hidròlisi de l'èster unit en posició sn-1, donant lloc a un lisofosfolípid i un àcid gras lliure, mentre que la PLA₂ actua d'igual manera sobre la posició sn-2. Els lisofosfolípids resultants poden tornar a acilar-se reaccionant amb un acil-CoA a través d'una aciltransferasa o bé alliberar l'altre àcid gras per acció d'una lisofosfolipasa, deixant la fosfobase lliure. Al cervell, els fosfolípids sofreixen un ràpid cicle de desacilació-reacilació que produeix un intercanvi continu d'àcids grassos entre diferents tipus de fosfolípids. Aquest dinamisme també és el responsable de la incorporació als fosfolípids dels àcids grassos poliinsaturats, molt abundants en el sistema nerviós. Hi destaquen els àcids araquidònic (AA), adrènic i docosahexaenoic (DHA), que acostumen a ocupar la posició sn-2 dels fosfolípids, mentre que en la posició sn-1 s'hi solen trobar cadenes saturades com l'àcid palmític o l'esteàric. L'acció de la PLA₂ sobre els fosfolípids allibera àcids grassos com l'àcid araquidònic (AA), una molècula implicada tant en processos fisiològics com patològics que es detallaran en l'apartat 3.7 (revisat a Farooqui i Horrocks, 2006).

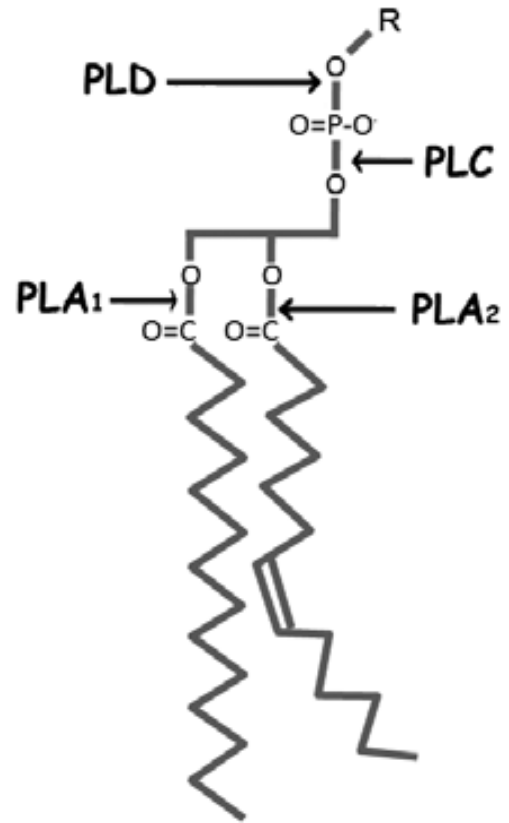


Figura I-9. Punts d'hidròlisi dels fosfolípids per les diferents fosfolipases.

3.6.2 Segons missatgers produïts per la fosfolipasa C (PLC)

Les PLC formen una família d'enzims que hidrolitzen l'enllaç fosfodièster de la posició sn-3, produint DAG i la fosfobase corresponent (revisat a Fukami, 2002). Les múltiples isoformes de la PLC hidrolitzen principalment el PI-4,5-P₂ donant lloc a inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) i DAG. L'IP₃ alliberat estimula l'alliberació de Ca²⁺, principalment del reticle endoplasmàtic, que activarà enzims dependents de Ca²⁺ i diverses isoformes de la PKC, juntament amb el DAG. La formació de DAG per la PLC depèn en certa mesura de la disponibilitat de PI-4,5-P₂, però l'activació de la PKC pot estimular la PLD, que hidrolitzarà la PC a PA, que per acció de la PAP donarà lloc a una segona fase de generació de DAG (Nakashima et al., 1991). Aquesta segona ona de DAG, no es veurà limitada per disponibilitat de PC, molt abundant en

les membranes, i pot produir l'activació d'aquelles isoformes de la PKC que no requereixen Ca^{2+} .

3.6.3 Segons missatgers generats per la fosfolipasa D (PLD)

En resposta a determinats estímuls, la PLD hidrolitza els fosfolípids donant lloc a PA i la base lliure, actuant preferentment sobre la PC (revisat a Jenkins i Frohman, 2005). El PA format pot activar la PKC ζ , la monoacilglicerol aciltransferasa, la PI-4-quinasa, la PLC γ , i incrementar la unió de GTP a Ras. També es el precursor de l'àcid lisofosfatídic (LPA), que presenta propietats paracrines i autocrines, essent agonista de receptors acoblats a proteïna G_i . A més, tant l'LPA com el PA poden inhibir l'adenilat ciclasa disminuint els nivells de cAMP. El cervell és l'òrgan amb uns nivells més elevats d'LPA així com del seu receptor i altres proteïnes que s'hi uneixen (revisat a Ye et al., 2002).

3.6.4 Alteracions en els fosfolípids en desordres neurològics

Algunes lesions neuronals i malalties neurodegeneratives s'han associat a canvis en el metabolisme dels fosfolípids (revisat a Sun et al., 2003). En processos d'isquèmia neuronal, hipòxia, hipoglucèmia i en lesions de la medulla espinal, s'hi observa l'activació d'enzims que degraden fosfolípids, així com la inhibició de l'activitat aciltransferasa. També s'ha descrit un increment en l'activitat de diverses fosfolipases en la malaltia d'Alzheimer, de Huntington i en esquizofrènia, fenòmens que ja s'observen en etapes preclíniques de la malaltia. Aquesta eliminació de fosfolípids que acostuma a acompanyar els processos neurodegeneratius podria ser deguda a un increment en la peroxidació de les seves cadenes insaturades degut a l'acció de radicals lliures. Les conseqüències d'un increment en el catabolisme dels fosfolípids sobre el teixit neuronal són diverses. Per una banda, disminueixen els nivells de fosfolípids essencials per les funcions cel·lulars, però també resulta en l'acumulació d'àcids grassos lliures, prostaglandines, lisofosfolípids i peròxids de lípids.

3.7 Senyalització per metabòlits generats per la fosfolipasa A2

3.7.1 Les fosfolipases A2 (PLA₂)

Les PLA₂ formen una gran família d'enzims que hidrolitzen l'àcid gras en posició sn-2 dels fosfolípids (revisat a Schaloske i Dennis, 2006). En cervell, s'expressen principalment tres tipus de PLA₂: les cPLA₂ citosòliques, dependents de calci i selectives per l'AA; les sPLA₂,

també dependents de Ca^{2+} i secretades per la cèl·lula; i les iPLA₂, independents de Ca^{2+} (revisat a Farooqui i Horrocks, 2004). La cPLA₂ actua principalment sobre l'AA, mentre que el DHA s'allibera majoritàriament per la iPLA₂ (revisat a Green et al., 2008). Els àcids grassos alliberats per les PLA₂ podran ser metabolitzats per donar lloc a nombroses molècules de senyalització.

Un altre producte de les PLA₂ és l'1-alkil-2-liso-sn-glicero-3-fosfocolina, el precursor del PAF (*platelet-activating factor*), un potent mediador inflamatori, amb múltiples funcions al CNS (revisat a Bazan, 2003).

3.7.2 Derivats dels àcids grassos poliinsaturats

La major part dels àcids grassos alliberats per les PLA₂ es reincorpora ràpidament als fosfolípids per acció d'algunes de les acil-CoA de cadena llarga sintetases i de les acil transferases (revisat a Cunnase et al., 2003), però una petita part es degrada per β -oxidació o es transforma en productes oxidats a través de les ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX), el citocrom P450 (CYP) o les epoxigenases (EPOX) (revisat a Buczynski, 2009; figura I-11). Aquests compostos oxidats són de gran importància en senyalització cel·lular, especialment en processos d'inflamació, de control del flux sanguini, de plasticitat neuronal, de mort cel·lular i en la sensació de dolor.

L'acció d'aquests enzims sobre l'àcid araquidònic (AA) dona lloc als icosanoids, una família de molècules senyalitzadores formada per les prostaglandines, els tromboxans, els leucotriens i l'àcid epoxiicosatrienoic. Per la seva banda, l'àcid docosahexaenoic (DHA) és metabolitzat per les COX i LOX donant lloc a resolvines, docosatriens i neuroprotectines, conegudes col·lectivament com a docosanoids, que sovint provoquen efectes oposats als icosanoids (revisat a Hong et al., 2003). L'activitat d'aquests enzims també produeix ROS (*reactive oxygen species*), que si bé poden participar en senyalització, a altes concentracions esdevenen citotòxics per estrés oxidatiu.

3.7.3 Les ciclooxigenases (COX)

Les COX són enzims bifuncionals que catalitzen els dos passos a través dels quals l'AA i l'O₂ reaccionen per donar PGH₂, el precursor de la resta de prostanoids.

La COX-1 s'expressa constitutivament en teixit cerebral i és responsable de la producció basal de prostaglandines, implicades en diversos processos homeostàtics. La segona isoforma, la COX-2, és molt minoritària en condicions normals i s'indueix per acció d'agents

inflamatoris (revisat a Wu, 1995; Smith et al., 2000). Diferències en les seqüències d'ambdues isoformes es tradueixen en una major flexibilitat de la COX-2 respecte als seus substrats o inhibidors.

La distribució de les COX a cervell és heterogènia, amb abundància de COX-1 en mesencèfal, pons i medul·la (Breder et al., 1995), mentre que la COX-2 es troba enriquida en hipocamp, hipotàlem i amígdala (Andreasson et al., 1993). La COX-2 es localitza en la regió perinuclear de neurones, astròcits i micròglia, i la seva expressió s'incrementa en micròglia amb l'administració de lipopolisacàrid bacterià (LPS), sense que els nivells neuronals es vegin afectats (Elmqvist et al., 1997).

S'ha descrit una tercera isoforma, la COX-3, que alguns autors proposen com a principal diana del paracetamol (Chandrasekharan et al., 2002). Tot i això, els estudis realitzats en aquest sentit són controvertits, i no queda clar que aquesta proteïna tingui activitat ciclooxigenasa en humans (revisat a Kam i so, 2009).

3.7.4 La prostaglandina E2 (PGE₂)

Les prostaglandines E són els principals metabòlits de l'AA i estan implicades en nombrosos processos fisiològics i patològics, com ara inflamació, dolor, tumorogènesi, regulació vascular, funcions neuronals, reproducció femenina, protecció de la mucosa gàstrica, i funció renal (revisat a Kobayashi i Narumiya, 2002).

La PGE₂ es forma isomerització de la PGH₂ sintetitzada per les COX mitjançant les PGE sintases (revisat a Murakami i Kudo, 2006) (figura I-10). Se'n coneixen tres isoformes, dues associades a membrana (mPGES-1 i 2) i una de citosòlica (cPGES), codificades per tres gens, i amb propietats enzimàtiques, modes d'expressió i localització cel·lular i subcel·lular, diferents. Les prostaglandines s'alliberen predominantment per transport facilitat a través de transportadors de membrana, i degut a la seva inestabilitat, exerceixen els seus efectes en un espai i temps reduït, mitjançant l'activació dels seus receptors acoblats a proteïna G (revisat a Funk, 2001).

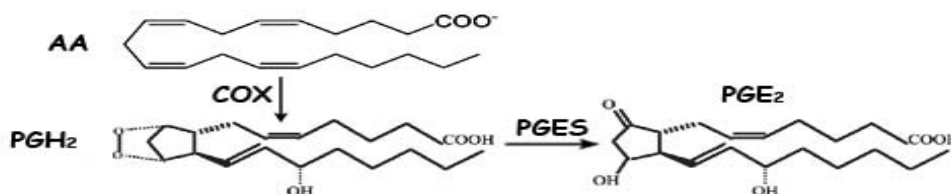


Figura I-10. Biosíntesi de la prostaglandina E2. Abreviatures: àcid araquidònic (AA), ciclooxigenasa (COX), prostaglandina H2 (PGH₂), PGE sintasa (PGES), prostaglandina E2 (PGE₂).

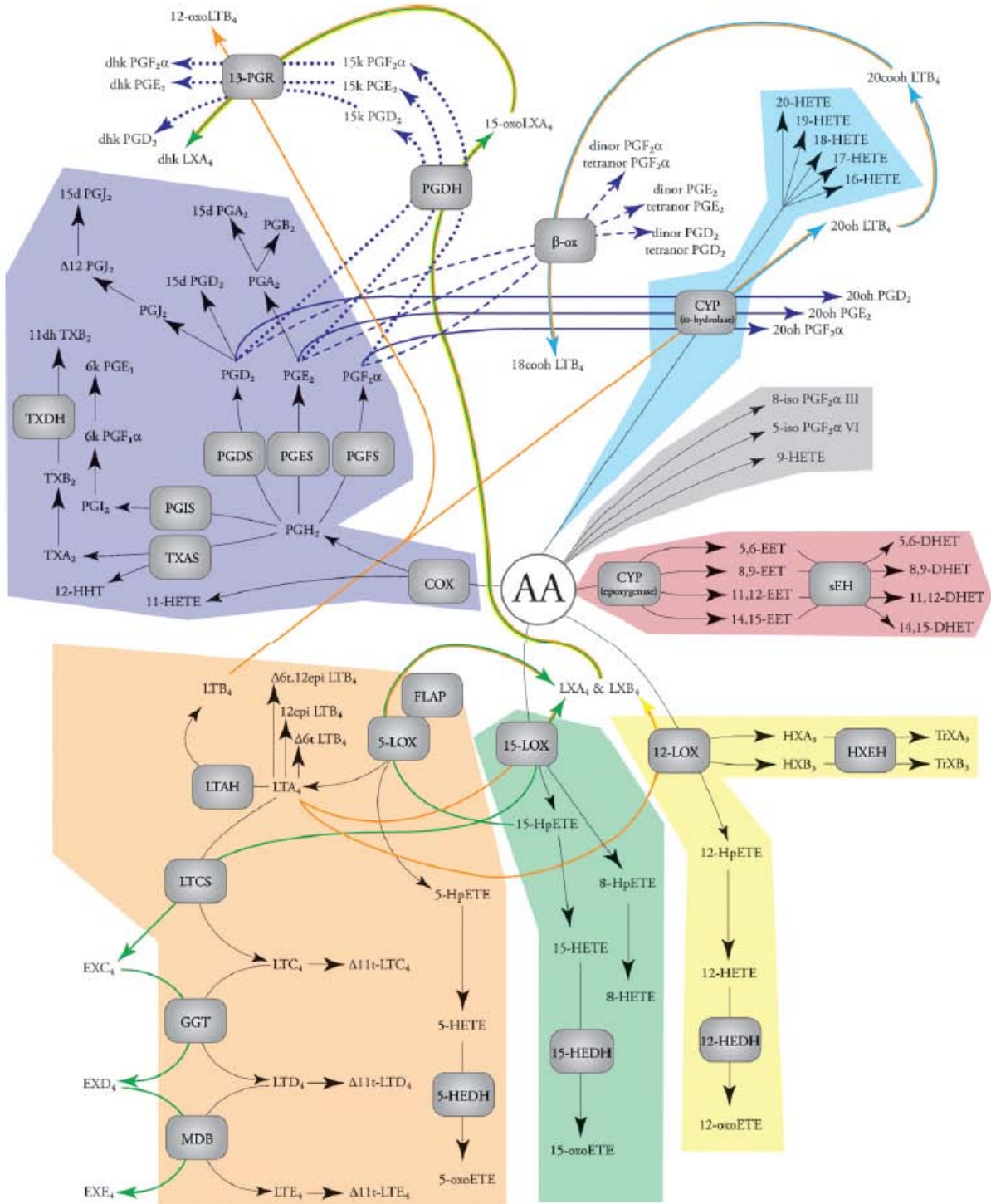


Figura I-11. Principals rutes de la biosíntesi dels icosanoids. Els metabòlits de les principals rutes estan indicats en color: COX (lila), 5-LOX (taronja), 15-LOX (verd), CYP epoxigenasa (vermell), CYP v-hidroxilasa (cian), oxidació no enzimàtica (gris). De Buczynski *et al.* (2009) *J Lipid Research*.

3.7.5 La senyalització per derivats de l'àcid araquidònic en la teràpia dels trastorns bipolars

Amb els seus nombrosos treballs, Rapoport i col·laboradors han descrit que el tractament de rates amb liti, valproat o carbamazepina disminueix els nivells de PGE_2 i el recanvi de l'AA, però no el del DHA, en fosfolípids cerebrals (revisat a Rao et al., 2008). L'efecte específic sobre l'AA es pot explicar per la disminució de l'expressió de la $cPLA_2$ (selectiva per l'AA) que s'observa en rates tractades amb liti o carbamazepina, sense que la $iPLA_2$ o la $sPLA_2$ es vegin afectades, mentre que el valproat actuaria inhibint la reaccilació de l'AA a nivell de la *Acsl* (*long chain acil-CoA synthetase*). Per altra banda, observen que el tractament amb liti, valproat o carbamazepina també disminueix els nivells i l'activitat de COX-2, sense alterar els nivells de la 5-lipoxigenasa o el citocrom P450. Aparentment aquests efectes sobre l'expressió gènica es deuen a l'acció inhibidòria del liti i la carbamazepina sobre el factor de transcripció AP-2, que regula la transcripció del gen de la $cPLA_2$, i del valproat sobre l'NF- κ B, responsable de la inducció de COX-2. Els estudis realitzats amb lamotrigina no mostren una disminució en el recanvi de l'AA en fosfolípids cerebrals però sí una disminució en els nivells de COX-2. En aquest sentit és interessant destacar el fet que la lamotrigina es mostra efectiva pel tractament de les fases depressives de la malaltia, però a diferència del liti, el valproat i la carbamazepina, no sembla útil per a les fases de mania (Bowden et al., 2003; Calabrese et al., 2003)

3.8 Paper dels lípids en el transport intermembranar

Els lípids membranals participen activament en els processos de transport intermembranar (revisat a Haucke i Di Paolo, 2007). Hi destaquen els fosfoinosítids, el PA, la PS i DAG, uns lípids que acostumen a trobar-se a la monocapa citosòlica de les membranes de la cèl·lula (revisat Di Paolo i De Camilli, 2006). Aquests lípids, juntament amb altres senyals, participen en el reclutament de proteïnes efectores que dirigiran els diferents processos del transport intermembranar, com la fissió, el transport, l'ancoratge i la fusió. Per altra banda, les propietats físiques dels diferents lípids de membrana, com la seva geometria (de tipus cilindre, con o con invertit) afectaran directament la capacitat de les membranes de corbar-se o fusionar-se (revisat a Van Meer i Sprong, 2004).

El PA juga un paper primordial en fenòmens de transport vesicular, secreció, fissió, i endocitosi (revisat a Stace i Ktistakis, 2006). El PA implicat en aquests processos es genera bàsicament per acció de les PLD, que hidrolitzen fosfolípids com la PC per produir PA, i són

elements clau per al trànsit intermembranal, especialment en la inducció de fusió de membranes (Revisat a Roth, 2008). A part de l'acció del PA sobre proteïnes efectores, a nivell biofísic la conversió de PC a PA transforma un lípid cilíndric, no fusiogènic, en un de cònic que afavorirà la curvatura negativa de la membrana necessària per la fusió, un procés que en segona instància pot ser afavorit per la hidròlisi del PA a lisoPA, de geometria cònica invertida (revisat a Jenkins i Frohman, 2005). Es creu que el PA generat per les DAGK (revisat a Mérida et al., 2008) també pot estar implicat en aquests processos, però encara no s'ha pogut demostrar.

Gràcies al reclutament de diferents quinases i fosfatases que actuen sobre els fosfoinosítids, aquests presenten una distribució diferencial pels diferents orgànuls, i amb la seva capacitat de recaptar proteïnes efectores, participen en nombrosos processos específics de cada compartiment cel·lular, com el transport vesicular (revisat a Vicinanza et al., 2008). Així, el PI-4,5-P₂ es troba enriquit en la membrana plasmàtica, el PI-3-P i el PI-3,5-P₂ en endosomes primerencs i tardans respectivament, i el PI-4-P a l'aparell de Golgi. Els fosfoinosítids es localitzen en la monocapa citosòlica de les membranes, fent-los accessibles a quinases, fosfatases i fosfolipases, i permetent la seva interacció amb nombroses proteïnes citosòliques que posseeixen dominis d'unió específica a determinats fosfoinosítids (revisat a Downes et al., 2005), o regular al·lostèricament proteïnes integrals de membrana, com enzims, canals iònics i reguladors del transit intermembranal (revisat a De Matteis i Godi, 2004). El PI-4,5-P₂ participa en el control de la secreció regulada, principalment a nivell de la fusió vesicular, mentre que el PI-4-P ho faria en la secreció constitutiva. La PI4KII α i PI4KIII β es localitzen al Golgi (Weixel et al., 2005), on sintetitzen el PI-4-P, que té un paper predominant en aquest orgànul, on actuen nombroses proteïnes d'unió a PI-4-P. La silenciació de les PI4K del Golgi resulta en la deslocalització d'aquestes proteïnes i la inhibició del transport de vesícules del TGN a la membrana plasmàtica (revisat a De Matteis i D'Angelo, 2007).

El DAG és necessari per l'exportació de vesícules del Golgi a la membrana plasmàtica (Litvak et al., 2005) i al ER (Fernández-Ulibarri et al., 2007). El DAG promou la translocació a les membranes del Golgi de proteïnes que participen en el transport vesicular, com la PKD (Baron i Malhotra, 2002). La síntesi de PC, una molècula sovint considerada més com un element estructural que com un fosfolípid actiu en la senyalització i dinàmica dels processos cel·lulars, també és necessària per a l'exportació de vesícules del Golgi a la membrana plasmàtica (Tian et al., 2008)

Introducció

Així doncs, per als fenòmens de trànsit vesicular és essencial la coordinació temporal i espacial dels diferents processos del metabolisme dels lípids membranals, que experimenten un continu cicle de transformacions gràcies a l'acció dels nombrosos enzims del seu metabolisme que actuen en els diferents compartiments involucrats en transport intermembranal.

4 Importància dels astròcits en el sistema nerviós

La manca d'una teoria satisfactòria per explicar les propietats terapèutiques dels fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim fa que sigui necessari plantejar-nos noves possibilitats, i una d'elles és que la diana cel·lular d'aquests fàrmacs no siguin únicament les neurones. Uns candidats interessants són els astròcits, unes cèl·lules que darrerament estant prenent un gran protagonisme en la fisiologia del sistema nerviós i que no es poden deixar de banda a l'hora d'estudiar les dianes terapèutiques d'un psicofàrmac (revisat a Volterra i Meldolesi, 2005; Wang i Bordey, 2008).

4.1 Els astròcits

A diferència d'altres cèl·lules glials, com els oligodendròcits o la micròglia, a les que tradicionalment s'han assignat funcions altament especialitzades, el rol dels astròcits sempre ha resultat més enigmàtic. Durant dècades se'ls reservà un paper de suport estructural i metabòlic per a les neurones, però avui dia es reconeix que estan implicats en funcions fonamentals del CNS com ara el metabolisme energètic (revisat a Pellerin, 2005), la neurotransmissió (revisat a Araque, 2008; Fellin, 2009), el manteniment de la barrera hematoencefàlica (revisat a Abbott et al., 2006), l'homeòstasi iònica extracel·lular (revisat a Simard i Nedergaard, 2004), la regulació de la cerebrovasculatura (revisat a Gordon et al., 2007; Koehler et al., 2009), els processos neuroinflamatoris (revisat a Darlington, 2005), la neurogènesi en adults (revisat a Chojnacki et al., 2009) i en processos neuroregeneratius (revisat a Sofroniew, 2005).

Així doncs, es considera que els astròcits són unes cèl·lules altament polivalents que estan implicades en pràcticament tots els processos que tenen lloc al CNS, motiu pel qual resulta de gran interès estudiar els efectes que hi puguin produir els fàrmacs emprats en el tractament dels trastorns bipolars.

4.1.1 Classificació dels astròcits

Els astròcits són el tipus glial majoritari, tant pel que fa al nombre com al volum o àrea superficial, però no es pot dir que formin un grup homogeni. Alguns tipus d'astròcits es poden distingir per diferències morfològiques, com la glia de Mueller de la retina o la glia de Bergmann al cerebel, però fins i tot astròcits adjacents, amb una aparença morfològica i immunocitoquímica aparentment idèntica, poden presentar receptors de membrana molt diferents, fet que els confereix propietats específiques que cal tenir present de la mateixa

manera que es té amb les neurones. Estudis amb *microarrays* de mRNA demostren que hi ha pocs gens que s'expressin específicament en tots els astròcits, i en realitat es produeix un patró d'expressió dependent de la localització de la cèl·lula (Bachoo et al., 2004).

En ratolins que expressen GFP (*Green Fluorescent Protein*) sota el promotor de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), una proteïna que forma filaments intermedis del seu citoesquelet i que s'empra com a marcador dels astròcits (Nolte et al., 2001), es pot observar bàsicament dues poblacions de cèl·lules marcades (Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004):

- a) Un grup de cèl·lules que expressen nivells elevats de GFAP, presenten un cos cel·lular irregular i ramificat, baixa *input resistance*, un potencial de membrana molt negatiu, corrents de K^+ independents de voltatge i temps, alta recaptació de glutamat acoblament intercel·lular per *gap junctions*, identificats com a astròcits protoplàsmics.
- b) Una població de cèl·lules que presenten menys GFAP, una major *input resistance*, un potencial de membrana menys electronegatiu, corrents de K^+ i Na^+ dependents de voltatge, presència de receptors d'AMPA i una menor recaptació de glutamat.

4.1.2 Morfologia dels astròcits

Microinjectant astròcits protoplàsmics de la regió CA1 de l'hipocamp amb sondes fluorescents, aquests es mostren amb una estructura d'arbust, amb un soma d'uns 7-9 μm des d'on s'irradien nombrosos processos cel·lulars fins a ocupar un volum d'uns 66000 μm^3 (Bushong et al., 2002). És destacable el fet que cadascun d'ells ocupa el seu domini, amb molt poc solapament amb altres astròcits, amb els que per altra banda, estan lligats per *gap junctions* formant una mena de sinciti (Konietzko i Muller 1994). D'aquesta manera cada astròcit cobreix un territori específic, des d'on pot interactuar amb pràcticament tots els tipus cel·lulars del sistema nerviós (figura I-12). En aquest sentit, més del 99% de la superfície de la cerebrovasculatura es troba envoltada per processos astrocitaris (Kacem et al., 1998), i pel que fa a la seva interacció amb les neurones, en còrtex o hipocamp de rosegador dins el domini de cada astròcit s'hi troben unes 10^5 sinapsis (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007), un valor que en humans resulta molt superior, fins al punt que s'ha proposat que una de les peculiaritats del cervell humà en relació al dels altres mamífers és la seva complexitat astrocitària (Oberheim et al., 2006; 2009).

Es considera que els astròcits actuen com a unitats d'integració local en la comunicació sinàptica i no sinàptica de la microregió que cobreix cadascun d'ells. L'estructura estrellada

de l'astròcit consta de microdominis com els peus terminals, que es troben en la interfase glia-vasculatura, o els fil·lopodis i lamel·lipodis, unes fines extensions cel·lulars que interaccionen amb les sinapsis adjacents. Els senyals intracel·lulars poden propagar-se per aquests microdominis sense afectar la totalitat de la cèl·lula, permetent el control de fraccions del territori dominat per l'astròcit de manera independent.

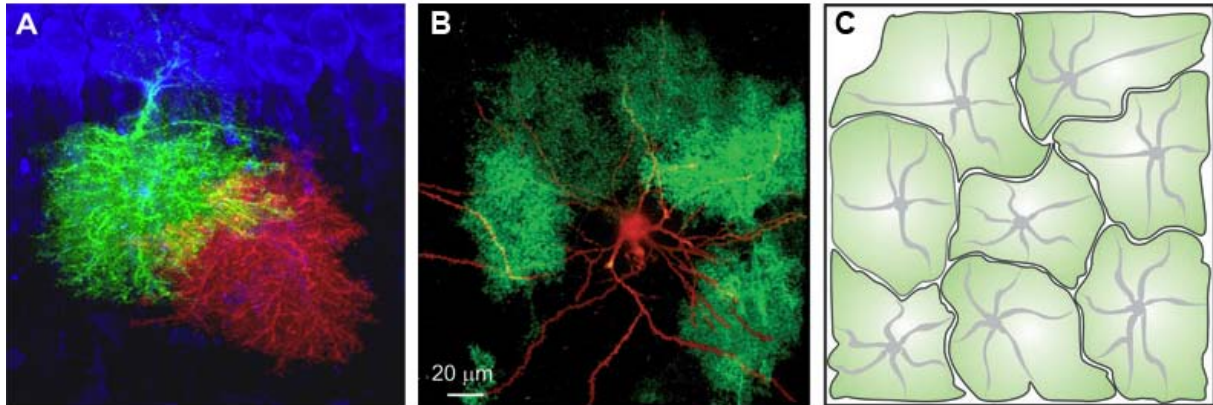


Figura I-12. Morfologia dels astròcits. A) Dos astròcits de l'àrea CA1 de l'hipocamp tenyits amb sondes fluorescentes, on s'observa la seva complexa estructura i la seva distribució en dominis independents (C), des d'on interaccionen amb les neurones (B). Adaptat de *Agulhon (2008). Neuron; Fellin (2009). J Neurochem.*

4.2 Fisiologia dels astròcits

L'estudi comparatiu de les propietats electrofisiològiques de neurones i astròcits, va portar a la conclusió que aquests darrers eren agents passius en la transmissió nerviosa. Aquesta visió començà a canviar amb els treballs en astròcits en cultiu, que van permetre identificar-hi l'expressió de receptors acoblats a proteïna G (GPCRs), i les conseqüents cascades de senyalització intracel·lular (McCarthy i Vellis, 1978; Van Calcar et al., 1978). Aquest fet els confereix la capacitat de respondre a senyals extracel·lulars que fins llavors es creien dirigits específicament a les neurones. La principal resposta intracel·lular a l'estimulació d'aquests receptors en astròcits és la senyal de Ca^{2+} .

4.2.1 Senyalització per Ca^{2+}

Que els astròcits no generin potencials d'acció no significa que no siguin excitable, és a dir, capaços de ser activats per senyals externs o interns i en conseqüència alliberar missatges per a les cèl·lules veïnes. La seva excitació és de tipus químic, i es basa en increments en la concentració de Ca^{2+} citosòlic en una àrea determinada de la cèl·lula (revisat a *Agulhon et al., 2008*).

El mecanisme molecular més acceptat per explicar aquests increments en els nivells de Ca^{2+} citosòlics és la via de la PLC/ IP_3 . L'activació de receptors acoblats a proteïna Gq provoca la hidròlisi del PI-4,5- P_2 per la PLC, generant DAG i IP_3 que pot actuar sobre el seus receptors IP_3R afavorint l'alliberació de Ca^{2+} del reticle endoplasmàtic (revisat a Fiacco i McCarthy, 2006; Scemes i Giaume, 2006). En aquest sentit, sembla que l' $\text{IP}_3\text{R}2$ seria el principal responsable d'aquest fenomen en astròcits, mentre que els $\text{IP}_3\text{R}1$ i 3 serien més propis de neurones (Petraovicz et al., 2008; Hertle and Yeckel, 2007; Holtzclaw et al., 2002; Sharp et al., 1999).

L'amplitud, freqüència, durada i propagació de les oscil·lacions de Ca^{2+} en l'astròcit, resultaran determinants per al seu efecte sobre les cèl·lules veïnes, i dependran tant dels estímuls extracel·lulars com del propi estat de l'astròcit. Determinats estímuls només produiran l'excitació d'un microdomini de l'astròcit (Sheppard et al., 1997; Yagodin et al., 1995; Fiacco et al., 2007), mentre que en altres casos el senyal de calci es propagarà per tota la cèl·lula, o fins i tot es transmetrà cap als astròcits veïns (Shuai i Jung, 2003; Sheppard et al., 1997; Roth et al., 1995; Weerth et al., 2007). És important ressaltar que els astròcits tenen la capacitat de discriminar senyals procedents de diferents orígens, i d'integrar estímuls concomitants (Perea i Araque, 2005).

Les oscil·lacions de Ca^{2+} citosòlic poden ser generades en resposta a senyals neuronals, però també apareixen de forma espontània. L'excitació espontània dels astròcits s'ha observat tant en talls de cervell (Parri et al., 2001) com *in vivo* (Hirase et al., 2004) i si bé és més abundant durant el desenvolupament, no desapareix en individus adults. S'ha proposat que hi podrien estar involucrats els canals de Ca^{2+} dependents de voltatge (Aguado et al., 2002; Parri et al., 2001; Parri and Crunelli, 2003).

4.2.2 Ones de calci intercel·lulars

Els senyals de Ca^{2+} també es poden generar artificialment per estimulació elèctrica, química o mecànica dels astròcits. En estudis *in vitro* s'han induït ones de Ca^{2+} que es propaguen entre diferents astròcits, i que tant poden afectar un petit microcircuit de varies cèl·lules (Sul et al., 2004), com propagar-se a llargues distàncies (Newman et al., 2001). Aquest fenomen ha portat a la idea d'un sistema de comunicació a llarga distància entre astròcits, però no està clar si aquests processos representen una funció fisiològica, patològica o un artefacte experimental. Estudis *in vivo* semblen indicar que els estímuls fisiològics no indueixen ones de calci que es

propaguin per extenses xarxes d'astròcits, sinó que cadascun d'ells mostra un comportament relativament independent dels altres (Wang et al., 2006; Schummers et al., 2008).

Una altra qüestió és el mecanisme pel que els senyals de Ca^{2+} viatgen d'una cèl·lula a una altra. L'estímul per desencadenar el senyal de calci s'haurà de transmetre intracel·lularment o extracel·lularment. A favor del primer cas, s'ha observat que l' IP_3 pot difondre's cap a astròcits adjacents a través de *gap junctions* (Newman et al., 2001). Pel que fa a la segona opció, es basaria en l'alliberació de factors com l'ATP que excitarien els astròcits veïns. En cultius d'astròcits s'han descrit ones de Ca^{2+} acompanyades d'increments en l'alliberació de glutamat i en els nivells de Na^+ citosòlic, i la captació de glucosa, fet que podria estar relacionat amb l'acoblament neurometabòlic (Bernardinelli et al., 2004; Innocenti et al., 2000).

4.3 Comunicació neurona-astròcit

El fet que els astròcits siguin excitables ha expandit la idea que es té de la comunicació cerebral, mostrant-la com una complexa xarxa integrada de rutes sinàptiques i no sinàptiques on tant els astròcits com les neurones hi juguen un paper actiu.

4.3.1 Interaccions neurona-astròcit

Els GPCRs dels astròcits poden ser activats pels neurotransmissors alliberats a les terminals sinàptiques (Araque et al., 2002; Navarrete i Araque, 2008; Pasti et al., 1997; Perea i Araque, 2005; Porter i McCarthy, 1996), fet que demostra l'existència d'un sistema de comunicació neurona-astròcit, que permet lligar l'activitat neuronal amb les senyals de calci astrocitàries. L'efecte recíproc s'ha comprovat amb l'observació que els astròcits poden alliberar molècules neuroactives, els gliotransmissors, quan se'ls indueixen senyals de Ca^{2+} amb agonistes dels seus GPCRs (Parpura et al., 1994; Pasti et al., 1997). Per tant, els astròcits responen a l'activitat neuronal, i poden alliberar gliotransmissors que actuaran sobre les neurones, de manera que s'estableix un sistema de comunicació bidireccional entre neurones i astròcits que ha portat a establir el model de sinapsi tripartida (revisat a Halassa et al., 2007), on hi apareix l'astròcit com a tercer component (figura I-13).

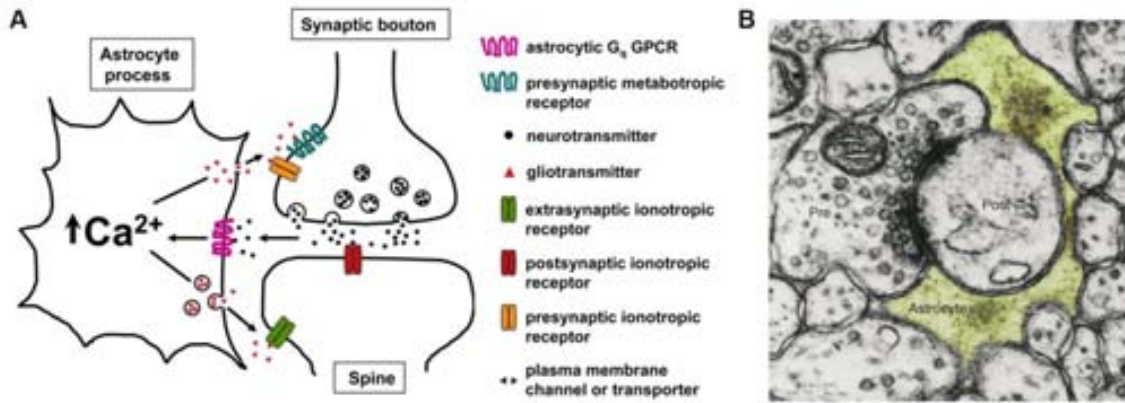


Figura I-13. La sinapsi tripartida. A) Els neurotransmissors alliberats per les terminals presinàptiques poden actuar sobre receptors GPCR en astròcits i induir-los un senyal de Ca^{2+} que promogui l'alliberació de gliotransmissors que efectuaran un efecte modulador sobre ambdues neurones. B) Micrografia de microscòpia electrònica mostrant la íntima relació entre les terminals sinàptiques i els processos astrocitaris. Adaptat de Agulhon (2008). *Neuron*; Halassa (2007). *Trends Mol Medicine*.

4.3.2 Gliotransmissors

Una de les principals conseqüències de l'excitació dels astròcits és l'alliberació dels anomenats gliotransmissors, unes molècules neuroactives que actuen sobre les sinapsis adjacents (revisat a Halassa et al., 2007). Des dels primers estudis (Kimelberg et al., 1990), el nombre de substàncies que s'han proposat com a gliotransmissors ha anat augmentant, i s'hi inclouen molècules com el glutamat, l'ATP, l'adenosina, la D-serina, els icosanoids (prostaglandines, àcid 20-hidroxiicosatetraenoic), citoquines ($\text{TNF-}\alpha$), i altres proteïnes i pèptids.

Els astròcits en cultiu alliberen gliotransmissors per diversos mecanismes independents de Ca^{2+} , com l'activació de canals aniònics regulats per volum (Kimelberg et al., 2006), hemicanals de connexina (Ye et al., 2003), receptors purinèrgics P2X7 formadors de porus (Duan et al., 2003), o reversió dels transportadors de glutamat (revisat a Anderson i Swanson, 2000), uns processos que es donen bàsicament en condicions no fisiològiques. En canvi, alguns treballs mostren que elevacions de Ca^{2+} en petites fraccions d'astròcits, resulten en l'alliberació de gliotransmissors com el glutamat, l'ATP i la D-serina, que actuen *in situ* sobre neurones pre- i postsinàptiques modulant-ne l'activitat (Bezzi et al., 1998; Fiacco i McCarthy, 2004; Kang et al., 1998; Lee et al., 2007; Mothet et al., 2005; Navarrete i Araque, 2008; Pascual et al., 2005; Pasti et al., 1997; Serrano et al., 2006; Yang et al., 2003).

Els mecanismes que porten a l'alliberació de gliotransmissors dependent de calci no estan ben establerts (revisat a Parpura et al., 2004), però una possibilitat especialment atractiva, per la seva dependència de Ca^{2+} i la seva naturalesa fisiològica, és l'alliberació excitòtica de

vesícules. En astròcits s'ha descrit un tipus de microvesícules similars a les sinàptiques (SLMV), que capten, emmagatzemen i alliberen glutamat en resposta a Ca^{2+} (Bezzi et al., 2004). Aquestes vesícules poden contenir, juntament amb el glutamat, D-serina, una combinació altament efectiva per activar receptors NMDA (Mothet et al., 2005). A diferència del que succeeix en neurones, l'exocitosi dependent de Ca^{2+} de les SLMV no tindria lloc per l'entrada de Ca^{2+} per l'obertura de canals dependents de voltatge, sinó per increments de Ca^{2+} produïts per l'alliberació d' IP_3 , i gran velocitat d'aquest procés indicaria que les cisternes del ER on actua l' IP_3 es trobarien molt pròximes als llocs d'alliberació de vesícules (Holtzclaw et al., 2002). Per altra banda, a més de les SLMVs, els astròcits també presenten uns orgànuls majors i heterogenis similars als DCGs (*Dense-core granules*) neuronals, que podrien participar en la secreció de nucleòtids i pèptids (Maienschein et al., 1999; Krzan et al., 2003).

La gliotransmissió excitòtica no dependria només d'increments en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sinó que hi intervindrien altres factors. En aquest sentit, s'ha descrit que l'alliberació de glutamat induïda per GPCRs, es pot suprimir bloquejant la síntesi de prostaglandines o $\text{TNF-}\alpha$ (Bezzi et al., 1998; 2001).

4.4 Modulació de l'activitat neuronal

La transmissió sinàptica es pot veure modulada per canvis en l'activitat dels astròcits en les seves terminacions perisinàptiques. Aquestes presenten una elevada plasticitat (Hirrlinger et al., 2004), i expressen molècules que poden alterar la transmissió sinàptica, com ara els transportadors de glutamat (revisat a Danbolt, 2001). Els astròcits també poden afectar les neurones adjacents per contacte directe. En neurones piramidals de la regió CA1 d'hipocamp, la unió d'efrina A3, que es troba a la superfície dels processos astrocitaris al seu receptor EphA4, present en les espines dendrítiques, inicia una cascada de senyals que regula el nombre, mida i morfologia d'aquestes espines (Murai et al., 2003).

Per altra banda, es coneix que els gliotransmissors alliberats pels astròcits poden actuar sobre la transmissió sinàptica (revisat a Haydon, 2001). En general les purines i el glutamat alliberats pels astròcits exerceixen efectes oposats sobre un mateix territori sinàptic, estimulador en el cas del glutamat (Fiacco et al., 2004) i inhibitori en el de les purines (Zhang et al., 2003). D'aquesta manera, amb l'alliberament de gliotransmissors els astròcits poden exercir una modulació bimodal de les sinapsis.

A més de les neurones, els astròcits també actuen sobre altres cèl·lules del CNS, participant en l'acoblament neurovascular, inflamació, desenvolupament, i regeneració.

4.5 Acoblament neurovascular

Una de les funcions dels astròcits que darrerament ha pres més protagonisme és el seu paper en la regulació del flux sanguini al cervell (revisat a Haydon i Carmignoto, 2006; Grant et al., 2007; Koehler et al., 2009). Ja Camilo Golgi havia apuntat que els astròcits connectaven els vasos sanguinis amb les neurones (*Golgi C, Contribuzione alla fine anatomia degli organi centrali del sistema nervoso. Rivista Clinica di Bologna, Bologna (1871)*), i avui dia es parla d'una relació causal entre la gliotransmissió dependent de Ca^{2+} en astròcits i variacions en el to arteriolar de la regió cerebral (revisat a Iadecola i Nedergaard, 2007) (Figura I-14). El control del flux sanguini cerebral (CBF) és fonamental per mantenir-lo acoblat a les demandes metabòliques de les neurones, de manera que un increment en l'activitat neuronal a nivell local porta a un increment del flux sanguini.

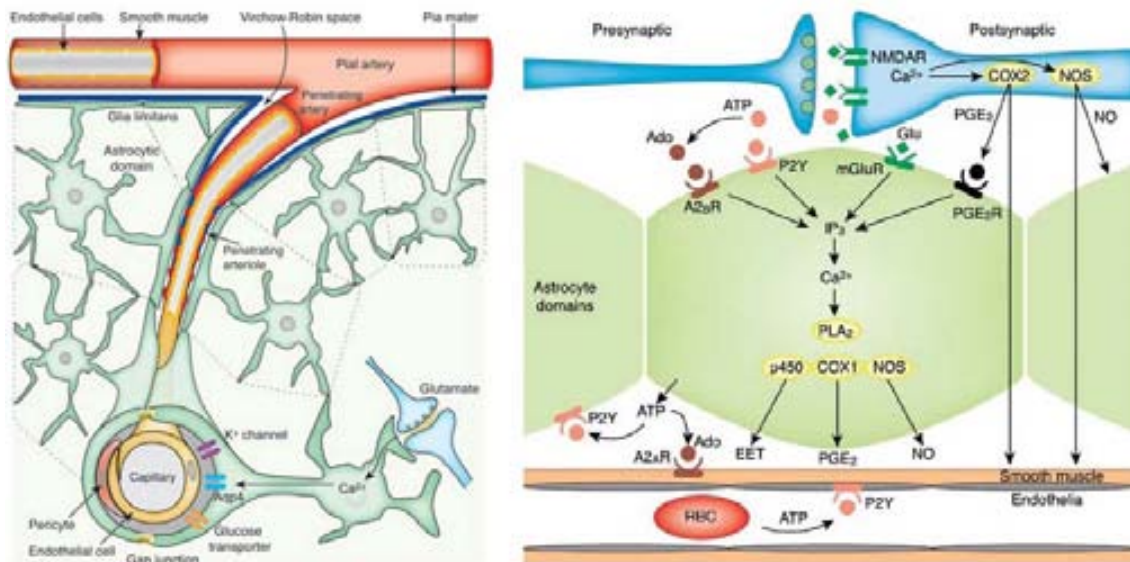


Figura I-14. Paper dels astròcits en el control de la microvasculatura cerebral. Els astròcits interaccionen amb les sinapsis i els vasos sanguinis, envoltats pels peus astrocitaris. Els astròcits poden respondre a l'activitat neuronal alliberant molècules vasoactives, principalment NO i derivats de l'AA, en un procés que podria ser essencial per a la regulació de l'acoblament neurovascular. Extreta de *Iadecola i Nedergaard (2007). Nature Neuroscience*.

La sang de les artèries cerebrals es distribueix per la superfície cortical a través de les artèries pials, que donen lloc a les arterioles penetrants. Els vasos intraparenquimals que sorgeixen d'aquestes arterioles, estan en contacte directe amb els peus astrocitaris (revisat a Bechmann et al., 2007). En capil·lars i vècules sense múscul llis vascular (VSM), les integrines mantenen l'adhesió dels peus astrocitaris amb la làmina basal de l'endoteli i pèlics. La senyalització entre l'endoteli i els astròcits és determinant per a l'angiogènesi, el manteniment de les *tight junctions* endotelials i el transport a través de la barrera hematoencefàlica. La

senyalització entre els astròcits i el VSM regula la dilatació o constricció de les artèries pials i les arterioles intraparenquimals, essencial per a la regulació del CBF. Amb l'activació neuronal, la dilatació dels vasos intraparenquimal es coordina amb la dilatació de les artèries pials per mantenir una pressió constant i evitar la pèrdua de CBF en altres regions cerebrals, en un procés controlat per la senyalització a través dels astròcits (Xu et al., 2008).

Les oscil·lacions de Ca^{2+} en astròcits poden produir vasodilatació a través de l'alliberació d'icosanoids com la PGE_2 (Mulligan et al., 2004), però també s'ha descrit que poden produir l'efecte contrari per l'alliberació d'un altre tipus d'icosanoid, l'àcid 20-hidroxiexosatetraenoic (20-HETE), que afavoreix la vasoconstricció (Zonta et al., 2003a). Aquests resultats indiquen que l'activació dels astròcits pot induir diferents tipus de respostes en funció de l'estat funcional dels vasos, ja que la vasodilatació es sol observar en vasos constrets, mentre que la vasoconstricció apareix en vasos normals.

4.6 Resposta inflamatòria dels astròcits

La inflamació és un procés defensiu en el que hi participen tots els tipus cel·lulars del CNS amb l'objectiu d'aïllar el teixit lesionat, destruir les cèl·lules danyades i reparar la matriu extracel·lular. La resposta inflamatòria requereix el reclutament de leucòcits polimorfonuclears (PMN) del corrent sanguini, un procés altament regulat que inclou quimiotaxis, adhesió dels PMN als endotelis i diapedesi (penetració i migració a través de la monocapa endotelial). Aquests PMN eliminen els antígens invasius per fagocitosi i alliberació de radicals lliures i enzims lítics als fagolisosomes. Aquest procés va seguir per la fase de resolució, orientada a posar fi a la resposta per tal de limitar el dany al teixit.

El CNS s'ha considerat tradicionalment un lloc amb privilegi immune (revisat a Galea et al., 2007), però també ha desenvolupat el seu propi sistema immunitari innat, basat en l'activació de les cèl·lules glials (revisat a Nguyen et al., 2002). Les cèl·lules de la micròglia, de llinatge mieloide, són considerades com els macròfags del cervell i el seu paper en la resposta immune és indiscutible (revisat a Aloisi, 2001), però també els astròcits, d'origen neuroectodèrmic, hi juguen un paper determinant (revisat a Farina et al., 2007).

4.6.1 Reconeixement de patògens i cèl·lules danyades

Per tal de reconèixer i eliminar patògens i cèl·lules danyades, les cèl·lules glials expressen els PRRs (*pattern-recognition receptors*), un nombre limitat de receptors que s'activen per determinades molècules d'agents patògens i també per senyals endògenes de dany cel·lular,

permetent l'activació del sistema immune tant en resposta a infeccions, com en lesions cerebrals, isquèmia o desordres autoimmunes o neurodegeneratius (revisat a Gordon, 2002). El balanç entre els efectes neurotòxics i neuroprotectors de la resposta immune innata al cervell, és un punt de gran interès farmacològic.

Els TLRs (*Toll-Like Receptors*) reconeixen molècules d'origen bacterià, com ara lipoproteïnes (TLR1, 2 i 6), àcids nucleics (TLR3, 7, 8 i 9), la flagelina, el principal component del flagel (TLR5) o el lipopolisacàrid bacterià i altres lligands (TLR4). La unió d'aquests lligands al TLR porta a l'activació del factor de transcripció NF- κ B, que promou l'expressió de citokines proinflamatòries. En diversos models experimentals s'ha comprovat que els astròcits expressen alguns TLRs, entre els que destaca el TLR3 (Farina et al., 2005; Bsibsi et al., 2006; Carpentier et al., 2005), mentre que el TLR4 només s'ha observat en cultius (Bowman et al., 2003; Carpentier et al., 2005). La micròglia en canvi, expressa un ventall molt més ampli de TLRs (Olson i Miller, 2004).

A més dels TLR, els astròcits també expressen altres proteïnes de reconeixement, com els SRs (*Scavenger Receptors*) (Alarcon et al., 2005), el receptor de manosa (Liu et al., 2004) així com elements del complement (Gasque et al., 2000), tots ells presents en micròglia, que també expressa el receptor de fosfatidilserina (Fadok et al., 2000).

4.6.2 La resposta immunitària

En ser estimulats amb citokines proinflamatòries, els astròcits produeixen una sèrie de citokines, quimioquines i factors neurotròfics per promoure la resposta inflamatòria, amb la permeabilització de la barrera hematoencefàlica i reclutament de leucòcits, i per preservar el teixit neural. En aquestes condicions els astròcits s'activen i es produeix l'anomenada astrogliosi reactiva (Wilhelmsson et al., 2006).

Amb l'ús de ratolins transgènics s'ha demostrat que el factor de transcripció NF- κ B juga un paper determinant en la resposta immune dels astròcits (Brambilla et al., 2005). En astròcits i altres tipus cel·lulars, l'NF- κ B és un factor de transcripció implicat en la inducció de proteïnes en resposta a infeccions virals i bacterianes o en lesions isquèmiques. Consta d'un complex heterotrimèric compost per p50, p65 (RelA) i I κ B α (revisat a Baeuerle i Baltimore, 1996). La fosforilació de I κ B α per la I κ B quinasa (IKK) i la subseqüent poliubiquitinació i degradació proteosomal d'aquesta subunitat, provoquen l'alliberació del dímer p50-p65, que es transloca al nucli i s'uneix als llocs κ B del DNA per activar la transcripció dels gens diana (revisat a Nomura, 2001).

4.6.3 Alliberació de citoquines

L'activació de les cèl·lules del sistema immune provoca l'alliberació de citoquines proinflamàtores, quimioquines, reactius de fase aguda, i molècules d'adhesió cel·lular (revisat a Raison et al., 2006). Les citoquines són proteïnes de senyalització que un cop secretades actuen autocrinament o paracrina sobre processos de supervivència, proliferació, diferenciació i funcions efectores en les cèl·lules diana. Les principals citoquines proinflamàtores, essencials pel sistema immune innat, són la IL-1, la IL-6 i el TNF- α , mentre que la IL-10 o la IL-1RA (*IL-1 receptor antagonist*) provoquen efectes oposats a les anteriors i participen en la resolució de la reacció immune. En el CNS, les cèl·lules glials són les principals productores de citoquines (revisat a Vezzani et al., 2008).

El TNF- α és sintetitzat i secretat per macròfags, limfòcits, neutròfils, fibroblasts, cèl·lules del múscul llis, astròcits i micròglia, en resposta a estímuls inflamatoris (revisat a Tracey et al., 2008). L'alliberació del TNF- α com a citoquina soluble es produeix després de la proteòlisi del seu precursor transmembranaral per la proteasa TACE, tot i això, ambdues formes són actives i poden exercir els seus efectes per unió als seus receptors (TNF-R1 i TNF-R2). El TNF-R1 s'expressa en la majoria de tipus cel·lulars i promou apoptosi, producció de citoquines i activació de l'NF- κ B, tot i que la seva cascada de senyalització és complexa i pot induir apoptosi, proliferació, diferenciació o supervivència en funció del tipus i estat de la cèl·lula. El TNF-R2, induïble i expressat principalment en cèl·lules hematopoietiques, antagonitza els efectes del TNF-R1.

Els icosanoids alliberats per les cèl·lules glials també participen en la regulació de la resposta inflamatòria, tant en la seva iniciació com en la seva resolució, mitjançant l'acció d'una primera fase d'icosanoids proinflamatoris i una segona d'icosanoids pro-resolució (Gilroy et al., 2004; revisat a Serhan i Savill 2005).

4.6.4 Cicatriu glial

En el CNS, les lesions traumàtiques indueixen una ràpida resposta inflamatòria en els astròcits que porten a la formació de l'anomenada cicatriu glial (revisat a McGraw et al., 2001). Es creu que l'objectiu d'aquest procés és limitar l'àrea d'actuació de la resposta immune i aïllar la regió danyada per tal de restaurar l'homeòstasi del CNS (revisat a Fitch et al., 1997). Tot i els efectes neurotòxics que es poden derivar de la resposta inflamatòria, s'ha comprovat que els astròcits activats, a més de citoquines proinflamàtores, també alliberen factors neurotròfics per tal d'afavorir la supervivència neuronal en aquestes situacions.

Un cop superada la lesió, aquesta cicatriu glial pot resultar un obstacle per la regeneració de les connexions neuronals, fet que dóna gran interès a l'estudi d'aquest fenomen i a les possibles estratègies per minimitzar-lo. En aquest sentit, al nostre grup es va determinar que el liti atura la proliferació d'astròcits en cultiu en resposta a FBS, inhibint la via d'ERK1/2, mentre que en cultius neuronals afavoreix la viabilitat cel·lular activant aquesta mateixa ruta (Pardo et al., 2003), obrint una porta al possible ús del liti en el tractament de lesions cerebrals.

4.7 Alteracions dels astròcits associades a patologies del sistema nerviós

Es coneix la importància dels astròcits reactius en processos de dany neuronal, però alteracions en altres aspectes de la fisiologia dels astròcits també s'han implicat en nombroses malalties del sistema nerviós (revisat a De Keyser et al., 2008).

S'han descrit alteracions en pràcticament totes les etapes de l'excitació astrocitària i la gliotransmissió associades a diferents estats patològics. Les oscil·lacions de la $[Ca^{2+}]$ citosòlica, determinants per a la sincronització neuronal (Parri et al., 2001), desapareixen en l'àrea peritraumàtica de lesions mecàniques (Aguado et al., 2002), mentre que s'incrementen en activitat neuronal epileptiforme (Hirase et al., 2004). Alguns autors defensen que l'hiperexcitabilitat neuronal característica de l'epilèpsia es pot deure en part a alteracions en l'homeòstasi del K^+ i el Ca^{2+} en astròcits (Binder i Steinhauser, 2006;), i fàrmacs antiepilèptics com la fenitoïna, el valproat i la gabapentina, redueixen la senyalització per Ca^{2+} en astròcits (Tian et al., 2005)

La gliotransmissió en l'hipocamp es produeix majoritàriament per l'activació en astròcits de receptors mGluRs i/o AMPARs. En pacients epilèptics amb *Ammon's Horn Sclerosis*, una alteració en l'*splicing* de la subunitat GluR1 pot incrementar les respostes dependents de AMPAR provocant una hiperexcitabilitat dels astròcits (Seifert et al., 2004). En situacions d'inflamació, que s'han relacionat amb l'epilèpsia (revisat a Choi i Koh, 2008), es produeixen interaccions anòmales entre astròcits i micròglia, es produeix una alliberació massiva de $TNF-\alpha$ que amplifica l'alliberació de glutamat per part dels astròcits, produint excitotoxicitat neuronal (Bezzi et al., 2001).

El transportador de glutamat EAAT2 es troba incrementat en astròcits del còrtex prefrontal de pacients esquizofrènics, fet que pot portar a una reducció en la neurotransmissió glutamatèrgica que s'ha relacionat amb la inducció de psicosis (Matute et al., 2005; Nanitsos et al., 2005), i es creu que alguns antipsicòtics, com la clozapina, podrien millorar la

neurotransmissió cortical reduint la recaptació de glutamat en astròcits (Vallejo-Illarramendi et al., 2005). Tant l'esquizofrènia, com la depressió unipolar i els trastorns bipolars s'han relacionat amb una pèrdua de cèl·lules gials, inclosos els astròcits (revisat a Cotter et al., 2001).

El paper dels astròcits en la malaltia d'Alzheimer es fa palès pel fet que poden unir, internalitzar i degradar el β -amiloide ($A\beta$) (Wyss-Coray et al., 2003). En aquest mecanisme sembla que hi és determinant la proteïna ApoE (Koistinaho et al., 2004), íntimament lligada amb el risc genètic de la malaltia, que en el cervell és produïda exclusivament pels astròcits (Bachoo et al., 2004). L'esclerosi amiotròfica lateral s'ha relacionat amb mutacions a l'enzim antioxidant superòxid dismutasa (SOD), i s'ha comprovat que per tal d'induir la patologia en animals, cal que l'enzim es trobi mutat tant en neurones com en astròcits (Clement et al., 2003). Un dels mecanismes d'expansió dels gliomes és l'alliberament massiu de glutamat, provocant la mort neuronal (Takano et al., 2001).

Així doncs, l'estudi dels astròcits és un camp emergent que ha de contribuir a la comprensió del funcionament del sistema nerviós i de les seves patologies. La naturalesa de l'acció terapèutica dels fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim com el liti, que prevenen tant l'aparició de mania com de depressió, indica que podrien actuar sobre un procés regulador de l'activitat sinàptica. La capacitat dels astròcits de respondre a l'activitat neuronal i modular-la, els converteix en uns seriosos candidats a ser la diana cel·lular d'aquest tipus de fàrmacs.

“La principal ocupació de la meva vida consisteix en passar-la el millor possible.”

Michel de Montaigne



Objectius

Els objectius d'aquesta tesi han estat:

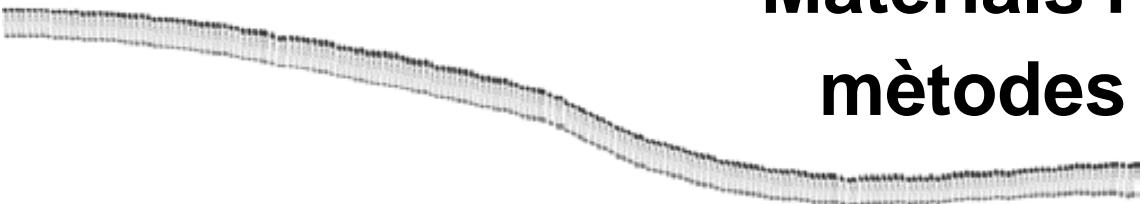
- Caracteritzar els efectes del liti sobre la síntesi de fosfatidilcolina i altres lípids en cultius d'astròcits.
- Comprovar si l'alliberació de senyals químics per part dels astròcits es veu afectada pel tractament amb liti i altres estabilitzadors de l'estat d'ànim.
- Relacionar els resultats obtinguts amb les propietats terapèutiques del liti.

Objectius

*“El treball és el refugi dels que
no tenen res a fer”*

Oscar Wilde

**Materials i
mètodes**



1 Cultius cel·lulars

Els experiments de la primera part d'aquest treball van ser realitzats majoritàriament en cultius secundaris d'astròcits de rata, mentre que els de la segona part s'efectuaren en cultius primaris enriquits en astròcits.

1.1 Tampons i medis de cultiu:

- Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose (Sigma). Complementat amb 50 UI/ml de penicil·lina i 50 µg/ml d'estreptomicina i un 10, 0.5 o 0% de sèrum fetal boví (FBS, Gibco).
- Tampó Krebs sense fosfat: NaCl 116.0 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, CaCl₂ 1.3 mM, i glucosa 11.0 mM. Equilibrat a pH 7.4 amb O₂/CO₂ (95:5, v/v).
- Tampó Krebs sense calci: NaCl 116.0 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, i glucosa 11.0 mM. Equilibrat a pH 7.4 amb O₂/CO₂ (95:5, v/v).
- PBS (*phosphate buffer saline*): NaCl 136.8 mM, KCl 2.5 mM, NaH₂PO₄ 0.8 mM, K₂HPO₄ 1.47 mM, pH 7.4.

1.2 Cultius primaris enriquits en astròcits

Els cultius mixtes de glia es van preparar a partir de rates de la soca OFA nounades seguint el procediment habitual al nostre grup (Pardo et al., 2003). Es van decapitar els animals, se'n va aïllar el còrtex i hipocamp i s'eliminaren les meninges i els principals vasos sanguinis per evitar la proliferació de fibroblasts i cèl·lules endotelials. Seguidament es va disgregar el teixit de forma mecànica i es va incubar en tampó Krebs-Ringer sense calci i amb un 0.025% de tripsina durant 15 minuts a 37 °C. Passat aquest temps es van dissociar les cèl·lules en presència de l'inhibidor de tripsina de soja (0.52 mg/ml) mitjançant successives pipetejades amb una pipeta Pasteur. La suspensió cel·lular resultant es va filtrar amb una malla de 40 µm de porus, i seguidament es va centrifugar a 500 x g. Un cop eliminat el sobrenedant, es van resuspendre en DMEM, complementat amb un 10% de FBS i els antibiòtics penicil·lina i estreptomicina. Es va realitzar un comptatge del nombre de cèl·lules viables pel mètode d'exclusió del Tripán Blue en una cambra de Neubauer i es van sembrar a una densitat de 0.5 x 10⁶ cèl·lules/ml, en el medi de cultiu abans esmentat. Passades dues hores, se'n va canviar el medi per eliminar-ne les cèl·lules no adherents. Els cultius es van incubar a 37 °C en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂. Passades dues setmanes, les cèl·lules es trobaven pròximes a la confluència, i se'n va aturar el cicle cel·lular incubant-les amb DMEM al 0.5% FBS, condicions en què les cèl·lules deixen de dividir-se però es mantenen viables.

1.3 Cultius secundaris d'astròcits

Els cultius enriquits en astròcits es van obtenir a partir de cultius mixtes de glia sembrats en flascons de 175 cm². Per eliminar-ne la major part de la micròglia, que s'adhereix amb menys força que els astròcits, es van sotmetre a una agitació orbital de 2 hores a 500 rpm prèvia a cada renovació del medi entre la segona i quarta setmana del cultiu. En arribar a la confluència, els astròcits primaris es van ressemmbrar en plaques de 150 mm fins a tres vegades per obtenir els cultius secundaris. Aquests es van ressemmbrar en plaques de 6 o 24 pouets a una densitat de 5×10^5 cèl·lules/ml (10^6 i 2.5×10^5 cèl·lules per pouet, respectivament), per a la realització dels diferents experiments. Les plaques es van deixar durant 3 dies en DMEM al 10% d'FBS i passat aquest temps se'ls va canviar el medi a DMEM al 0.5% d'FBS per arrestar el cicle cel·lular dels astròcits abans d'aplicar-los els tractaments indicats en cada experiment.

1.4 Determinació de la viabilitat cel·lular

La viabilitat cel·lular dels cultius es mesurà per l'assaig d'MTT, basat en la capacitat de les cèl·lules vives de metabolitzar amb les deshidrogenases mitocondrials el bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT), soluble en aigua, per donar un compost lila insoluble en aigua, el formazan (Mossman, 1983).

Per realitzar l'assaig, es van tractar les cèl·lules amb MTT fins assolir una concentració al medi de 150 µg/ml. Es deixaren a l'incubador durant 15 minuts, se n'aspirà el medi i es va dissoldre els cristalls de formazan en DMSO. Es prengueren 150 µl de la solució de formazan i se'n llegí l'absorbància a 570 nm en un espectrofotòmetre (Bio-tek Power wave XS). Considerant que el nombre de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de formazan format, en cada experiment es va calcular el percentatge de supervivència respecte les cèl·lules control.

2 Disseny dels experiments

Aquest treball s'ha fonamentat principalment en l'estudi del metabolisme lipídic en astròcits secundaris o de la resposta inflamatòria en cultius mixtes de glia. La major part dels experiments realitzats en ambdós models es poden adaptar a l'esquema de la figura M-1.

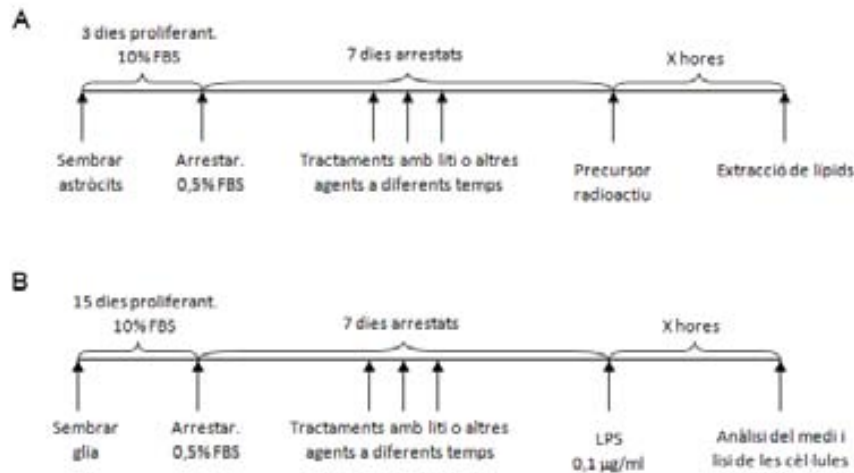


Figura M-1. Disseny bàsic dels experiments. A) Els astròcits secundaris sembrats en plaques de 6 o 24 pouets es van deixar proliferant durant 3 dies. Seguidament se'ls va arrestar el cicle cel·lular canviant-los el medi a DMEM al 0.5 % d'FBS, i es deixaren durant 7 dies en el mateix medi, durant els quals se'ls van aplicar els diferents tractaments. Un cop realitzat el marcatge metabòlic, s'extragueren els lípids per a realitzar-hi els assaigs pertinents. B) Els cultius primaris enriquits en astròcits es va sembrar en plaques de 35 mm i es van deixar proliferant fins a la confluència (uns 15 dies). Seguidament se'ls va canviar el medi a DMEM al 0.5 % de FBS, i es deixaren durant 7 dies en el mateix medi, durant els quals se'ls van aplicar els diferents tractaments. Passat aquest temps, es van tractar amb LPS a 0.1 µg/ml i es van prendre mostres de medi a diferents temps. A les 18 hores, es van recollir les darreres mostres i es van lliurar les cèl·lules pel seu anàlisi per Western Blot.

2.1 Tractaments farmacològics

Per a la realització dels experiments, els astròcits van ser tractats amb els següents compostos:

- Fàrmacs emprats en el tractament dels trastorns bipolars: LiCl (Fluka), valproat sòdic, carbamazepina, lamotrigina i topiramata (Sigma).
- Inhibidors enzimàtics (enzim): L-690,488 (IMPasa) i SB216763 (GSK-3) (Tocris), Propranolol (PAP) (Sigma).
- Altres tractaments: dimetilsulfòxid, NaCl, colina, CDP-colina, dioctanoilglicerol, myo-inositol, endothelina-1, lipopolisacàrid bacterià, ionomicina, cicloheximida, àcid tànnic, BSA (Sigma).

3 Anàlisi de lípids

Per a l'estudi del metabolisme lipídic en cultius secundaris d'astròcits es va seguir, en la majoria dels casos, un esquema com l'indicat en la figura M-1A. Les cèl·lules s'incubaren durant un temps determinat amb un precursor marcat radioactivament i seguidament es passà a l'extracció i separació de lípids per a la determinació de la quantitat de radioactivitat incorporada en cada lípid.

3.1 Reactius i dissolvents:

- Dissolvents: Cloroform, metanol, hexà, acetona, èter etílic (Baker).
- Reactius químics: Amoníac, àcid acètic, àcid clorhídric, iode, molibdat amònic, verd de malaquita, tween 20 (Merck i Sigma).
- Estàndards de lípids (Sigma).

3.2 Extracció de lípids

Per als múltiples experiments que requerien d'una extracció dels lípids cel·lulars, es va procedir segons el mètode de Bligh i Dyer (Bligh i Dyer, 1959). Es va extreure el medi de cultiu de les plaques de 6 o 24 pouets i després d'aplicar-hi un rentat amb PBS, es van tractar amb 0.6 ml de cloroform:metanol (1:2, v/v). Passats 15 minuts a -20 °C, es va recollir aquest volum en tubs de polipropilè i es repetí el procediment amb 0.6 ml més de la mescla de dissolvents. A continuació es va afegir 0.5 ml de cloroform i 0.5 ml d'aigua a cada tub, es van tancar, agitar vigorosament i centrifugar per a obtenir una bona separació de les fases aquosa i orgànica. Es va descartar la fase aquosa i es va fer un rentat de la fase orgànica amb 1.0 ml de metanol:aigua (1:1, v/v), repetint l'agitació i centrifugació dels tubs. S'eliminà la fase aquosa i es va recollir la fase orgànica, que s'evaporà al buit fins a sequedat per a obtenir el precipitat dels lípids cel·lulars.

3.3 Marcatges metabòlics

Els reactius radioactius emprats van ser subministrats per Amersham:

- [³H]-Cho: Clorur de [³H-metil]-colina (1 mCi/ml; 83 Ci/mmol) en etanol.
- [¹⁴C]-Acetat: [1-¹⁴C]-Acetat sòdic (200 µCi/ml; 56 mCi/mmol) en solució aquosa.
- [³²P]-P_i: Àcid [³²P]-Ortofosfòric (10 mCi/ml) diluït en àcid clorhídric (<0.1 M).
- [³H]-AA: Àcid [5,6,8,9,11,12,14,15-³H]-Araquidònic (1 mCi/ml; 211 Ci/mmol) en etanol.
- [³H]-Palmític: Àcid [9,10(n)-³H]-Palmític (1 mCi/ml; 49 Ci/mmol) en toluè.
- [³²P]-ATP: [γ-³²P]-ATP (10 mCi/ml; 3000 Ci/mmol) en solució aquosa.
- [³H]-Citidina: [5-³H]-Citidina (1 mCi/ml; 20 Ci/mmol) en aigua.

3.3.1 Marcatge amb colina

Per a la determinació de la velocitat de síntesi de fosfatidilcolina (PC) s'efectuà un pols de dues hores amb 0.25 $\mu\text{Ci/pouet}$ de $^3\text{H-Cho}$ en plaques de 24 pouets. Passat aquest temps, es prosseguí amb una extracció de lípids tal com s'ha descrit, evaporant a 80 °C els 0.5 ml de fase orgànica recollits en vials de centelleig. Es mesurà la radioactivitat total de la fase orgànica evaporada, assumint que la pràctica totalitat es tractava de PC, que en els temps de marcatge realitzats aquest constitueix més del 95% dels lípids marcats amb $^3\text{H-Cho}$ (Ramos et al., 2002).

3.3.2 Marcatge amb fosfat

Per a la determinació de la velocitat de síntesi dels diferents fosfolípids, es van adoptar dues estratègies. Per a millorar el percentatge de fosfat radioactiu incorporat a la cèl·lula, en els primers experiments es va substituir el medi de cultiu dels astròcits en plaques de 24 pouets per tampó Krebs sense fosfat al que s'havia afegit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{32}\text{P-P}_i$, (Sarri et al., 1996). Els problemes experimentals que es derivaren d'aquest protocol ens van fer optar per realitzar el pols addicionant 10 $\mu\text{Ci/pouet}$ de $^{32}\text{P-P}_i$ directament sobre el medi de cultiu, prescindint del canvi per Krebs sense fosfat. Per compensar la pèrdua de sensibilitat es va emprar una major quantitat de $^{32}\text{P-P}_i$ i es van unir els extractes lipídics de dos pouets per cada punt. En ambdós casos, passades les 4 hores del pols, es prosseguí amb l'extracció de lípids i la posterior separació dels fosfolípids per TLC (*Thin Layer Chromatography*). Per a les TLC bidimensionals, es van unir els extractes lipídics de sis pouets per cada mostra.

3.3.3 Marcatge amb acetat

Per als experiments d'incorporació de ^{14}C -acetat, es va realitzar un pols de quatre hores amb 2 $\mu\text{Ci/pouet}$ de ^{14}C -acetat en plaques de 6 pouets. A continuació es va realitzar l'extracció de lípids i es van evaporar al buit. Un cop separats per TLC amb la fase mòbil adequada, es va mesurar la radioactivitat associada a cada lípid.

3.3.4 Marcatge amb àcid palmític

L'estudi de la incorporació d'àcids grassos a fosfolípids es va realitzar marcant els astròcits sembrats en plaques de 24 pouets amb 1 $\mu\text{Ci/pouet}$ d'àcid ^3H -palmític. Passats els diferents temps de marcatge, es van extreure els lípids cel·lulars, que van ser separats per TLC per tal de mesurar la radioactivitat associada a cada fosfolípid.

3.3.5 Marcatge amb citidina

Per mesurar variacions en els nivells de CDP-DAG, es va realitzar un marcatge de 3 dies amb 2 μCi /pouet de [^3H]-citidina. Passats aquest temps es van extreure els lípids cel·lulars i es va mesurar la radioactivitat de la fase orgànica, corresponent al [^3H]-CDP-DAG.

3.3.6 Marcatges mixtes

En alguns experiments es va aprofitar la capacitat del comptador de centelleig de distingir la senyal associada a diferents isòtops radioactius per realitzar marcatges amb dos precursors al mateix temps. La discriminació de senyals es basa en la diferència d'energia de les partícules β alliberades per cada isòtop, que per cada cas presenta una distribució de partícules β amb una energia màxima i una cua que disminueix fins al 0. Donat que el comptador només analitzarà les partícules amb una finestra de potències que vagi des de la màxima d'un isòtop fins a la màxima de l'isòtop de potència inferior, és més probable que l'isòtop més energètic interfereixi sobre la senyal del més feble que a l'inrevés. Per minimitzar aquestes interferències, es van ajustar les condicions de marcatge per tal que les desintegracions associades a l'isòtop de menor energia fossin molt superiors a les del de major energia.

3.4 Separació dels lípids per TLC

Per a les separacions cromatogràfiques d'extractes lipídics, es va ressuspèndre el precipitat obtingut de l'extracció de lípids en 20 μl de cloroform:metanol (3:1) i es va aplicar a les plaques de TLC (Silica gel 60, Merck; o bé Silica Gel G 1000 μm 20x20cm prep-scored with Preadsorbent Zone, Analtech) (Higgins, 1987).

3.4.1 Separació de lípids neutres

Per a separar per TLC els lípids neutres marcats amb ^{14}C -acetat (fosfolípids, colesterol, àcids grassos, triacilglicèrids i ésters de colesterol) es va emprar una fase mòbil de hexà:éter etíl·lic:àcid acètic (70:30:1).

3.4.2 Separació de fosfolípids I

La separació dels fosfolípids marcats amb [^{32}P]- P_i es va realitzar per TLC amb una fase mòbil formada per Cloroform:Metanol:Àcid acètic:Aigua (60:50:1:4). Aquest mètode permet una bona separació de la PC, el PI i la PS, però no discrimina el PA de la PE, que s'han de comptabilitzar conjuntament (Figura M-2A).

3.4.3 Separació de fosfolípids II

Per obtenir una millor resolució en la separació, donat que les bandes d'alguns fosfolípids, com el PA i la PE es solapaven en aplicar-los a una TLC convencional per a separació de fosfolípids, es va optar per a la realització de TLC's bidimensionals (Figura M-2C), aplicant una sola mostra a cada placa i separant-la primer amb una fase mòbil bàsica (Cloroform:Metanol:Amoníac (65:35:5)), i posteriorment amb una d'àcida (Cloroform:Metanol:Acetona:Àcid acètic:Aigua (50:10:20:10:5)) (Fig. 4).

3.4.4 Separació de fosfolípids III

Per les complicacions pràctiques de la realització de TLCs bidimensionals com a mètode de rutina, es va cercar una fase mòbil que permetés una bona resolució dels fosfolípids d'interès per TLC monodimensional. Amb la fase mòbil àcida emprada en les TLCs bidimensionals, obteníem una molt bona separació de la PC i el PI, i acceptable per la PE i el PA (Figura M-2B). La PS quedava dins de la zona de la PC, però podíem prescindir d'aquest fosfolípid, que pel seu reduït marcatge radioactiu no alterava la senyal de la PC.

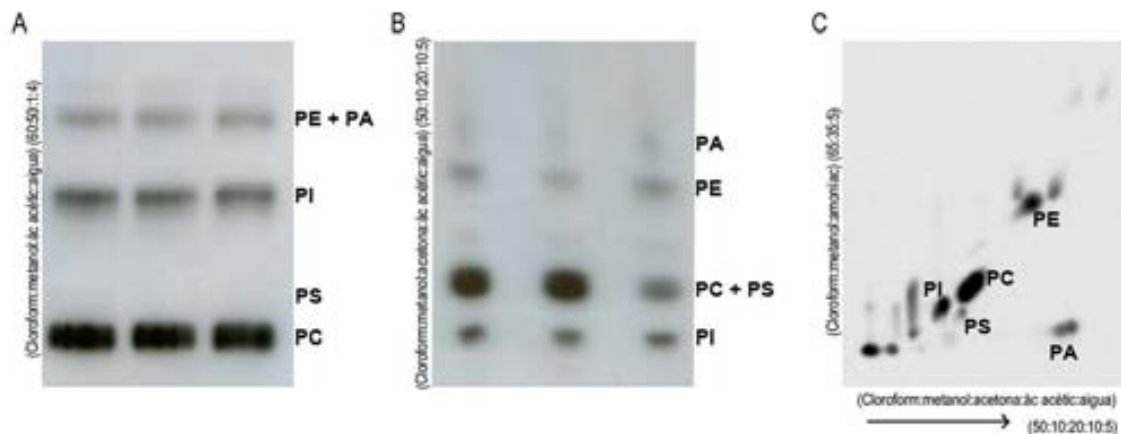


Figura M-2. Separació dels glicerofosfolípids per TLC. Per a la separació dels glicerofosfolípids es van emprar 2 tipus de TLCs monodimensionals i un de bidimensional, realitzades amb les fases mòbils indicades a la figura. Els fosfolípids marcats amb ^{32}P van ser identificats mitjançant una autoradiografia i la seva tinció amb iode, i posteriorment es va recollir la sílica corresponent a cada compost per mesurar-ne la radioactivitat en un comptador de centelleig.

3.4.5 Separació dels metabòlits de colina

A part de les separacions de lípids, també vam emprar la TLC per separar els metabòlits hidrofíl·lics de la ruta de Kennedy: la Cho, la P-Cho i la CDP-Cho. Es va prendre la fase aquosa obtinguda de la separació líquid-líquid pel mètode de Bligh i Dyer en els experiments de marcatge amb $[^3\text{H}]$ -Cho, i es va evaporar a sequedat amb un *speed-vac*. Es va redissoldre el precipitat en aigua i es va aplicar a plaques de TLC (Silica Gel G 1000 μm 20x20cm prep-

scored with Preadsorbent Zone, Analtech), que es van ressoldre amb una fase mòbil aquosa de (Etanol 95%):(Amoníac 2%) (1:1).

3.4.6 Quantificació dels lípids marcats radioactivament

En finalitzar la separació per TLC, es van deixar assecar les plaques i posteriorment van ser sotmeses a vapors de iode per tal de tenyir els diferents lípids, i identificar-los a partir d'estàndards freds. Els metabòlits de colina també es tenyeixen amb iode i es van identificar pel mateix mètode. En el cas dels experiments amb ^{32}P , la identificació dels diferents fosfolípids es va realitzar sobreposant les plaques de TLC amb autoradiografies preses de cadascuna d'elles. Un cop seleccionats els diferents compostos, es van rascar amb una fulla d'afaitar les regions corresponents a cadascun d'ells, recollint la sílica que els contenia en vials de centelleig per a la seva quantificació.

3.5 Assaig d'alliberació d'àcid araquidònic

Per mesurar l'alliberació d'àcid araquidònic (AA), els astròcits primaris sembrats en plaques de 24 pouets van ser incubats durant 20 hores amb 0.25 μCi /pouet de [^3H]-AA dissolts en DMEM + 0.5 mg/ml de BSA. Passat aquest temps, amb l'AA incorporat als fosfolípids cel·lulars, s'eliminà l'excés de [^3H]-AA del medi mitjançant 5 rentats amb DMEM al 0.5% FBS + 0.5 mg/ml de BSA, i s'incubaren en aquest mateix medi a 37 °C, aplicant-hi els tractaments adients, i prenent alíquotes del medi a diferents temps per tal de mesurar la quantitat d'AA radioactiu alliberat per la cèl·lula per acció de les PLA_2 . La radioactivitat de l'últim rentat també va ser mesurada per tal de prendre-la com a línia de base. Finalment les cèl·lules es van lliurar amb PBS al 0.2% de Tritó X-100 per tal de mesurar la quantitat d'AA marcat present a la cèl·lula al final de l'experiment.

3.6 Determinació de DAG

Es va evaporar a sequedat l'extracte dels lípids cel·lulars i amb l'ajut d'un sonicador es va dissoldre en 20 μl de solució solubilitzadora (β -octilglucòsid 7.5%, cardiolipina 5 mM, DETAPAC 1mM, a pH 7.0). Passats 15 minuts es va vortejar la mescla i s'hi va afegir 50 μl de tampó de reacció (imidazol/HCl 100 mM, NaCl 100 mM, Mg_2Cl_2 25 mM, EGTA 2 mM, a pH 6,6), 10 μl de DTT, i 10 μl de DAGK (1 mg DAGK en imidazol/HCl 20 mM, DETAPAC 2 mM, a pH 6.6). La reacció s'inicià en afegir 10 μl d'ATP marcat (250 μCi de [γ - ^{32}P]-ATP en 4 ml de solució d'ATP 10 mM, imidazol/HCl 50 mM, DETAPAC, 0.5 mM a pH 6.6), es va vortejar i incubar 60 minuts a 25 °C. Passat aquest temps, es va aturar la reacció amb

cloroform:metanol (1:2), i es va realitzar l'extracció de la fase orgànica, que es va separar per TLC en cloroform:metanol:àcid acètic:aigua (100:60:16:8). Finalment es va quantificar la radioactivitat del [^{32}P]-PA format a partir del DAG cel·lular, calculant la [DAG] a partir d'estàndards processats en paral·lel (0-2000 pmols).

3.7 Determinació de fosfolípids totals

La determinació de fosfolípids totals es va realitzar per l'assaig colorimètric de fosfat (Rouser et al., 1970). Als extractes lipídics evaporats en tubs de vidre se'ls va afegir 1 ml d'àcid perclòric al 70% i es van deixar a 180 °C durant 1-2 hores fins que desapareixia el color groc, moment en què els fosfolípids s'havien digerit i alliberat el fosfat. Mentre es refredava la mescla, es va preparar la solució de treball: verd de Malaquita 0.3%, molibdat amònic 1.05%, en HCl 1.25 M. Es va filtrar per obtenir una solució groc fosc, que es conserva 2-3 setmanes en la foscor. A la quantitat necessària per l'assaig s'hi va afegir Tween 20 fins arribar al 0.045%. Es van prendre alíquotes de 200 µl de les mostres en HClO_4 i se'ls va afegir 200 µl d'aigua, i 2 ml de la solució de treball. Es van agitar vigorosament i passats 20 minuts se'n va determinar l'absorbància a 660 nm. Per determinar-ne la concentració es va realitzar una recta patró amb fosfat. Aproximadament 1 g de fosfat equival a 8 g de fosfolípids.

4 Anàlisi del medi de cultiu

Per estudiar l'alliberació de molècules senyalitzadores en resposta a LPS, es van prendre alíquotes del medi dels cultius mixtes seguint l'esquema de la figura M-1B. Les mostres es van conservar a -80 °C fins al dia del seu processament.

4.1 Determinació de nitrts pel mètode de Griess

L'alliberació d'òxid nítric (NO) al medi de cultiu es va mesurar pel mètode de Griess per a l'anàlisi de nitrts, el producte de degradació del NO (Green et al., 1982). A 100 µl de medi de cultiu s'hi afegí el mateix volum del reactiu de Griess (Sigma), i passats 25 minuts d'incubació en una placa de 96 pous, se'n va llegir l'absorbància a 540 nm. La concentració de nitrts es va calcular a partir de solucions de NaNO_2 diluïdes en medi de cultiu a concentracions conegudes (0 – 200 µM).

4.2 Determinació del TNF- α per ELISA

El TNF- α secretat al medi de cultiu es va mesurar amb el kit d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de eBioscience (Rat TNF-alpha ELISA Ready-SET-Go!) seguint les instruccions del fabricant.

4.3 Determinació de PGE₂ per EIA

La PGE₂ alliberada al medi de cultiu es va mesurar amb el kit d'EIA (enzyme immunoassay) de Cayman (PGE₂ EIA Kit – Monoclonal) seguint les instruccions del fabricant.

5 Estudi del trànsit intermembranal

Els experiments de transport de vesícules de l'aparell de Golgi a la membrana plasmàtica es van realitzar durant una estada com a investigador invitat al laboratori de la Dra. Corda, al Consorzio Mario Negri Sud (Itàlia).

5.1 Anàlisi del transport Aparell de Golgi→Membrana Plasmàtica per l'assaig VSVG

L'assaig emprat per estudiar el transport intermembranal es basa en la capacitat del virus de l'estomatitis vesicular (VSV) d'induir, en la cèl·lula infectada, la síntesi de la proteïna integral de membrana VSVG, que és transportada en vesícules des del reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi i d'aquest fins a la membrana plasmàtica (Hirschberg et al., 1998).

El protocol seguit es mostra esquematitzat en la figura M-3. Es canvià el medi de les cèl·lules a DMEM sense FBS ni antibiòtics, i s'infectaren amb el virus VSV durant 1 hora a 32 °C. Posteriorment es va substituir el medi per DMEM preescalfat a 40 °C i s'incubaren a aquesta temperatura durant 2 hores. La soca termosensible ts045 del VSV emprada porta a l'expressió d'una variant de la VSVG (Gallione i Rose, 1985) que a 40 °C és retinguda al reticle endoplasmàtic, de manera que s'acumularà en aquest compartiment durant la incubació a 40 °C. Seguidament es va tornar a canviar el medi per DMEM amb 100 µg/ml de cicloheximida per tal d'aturar la síntesi de més VSVG, i es va incubar la placa a 20 °C durant 2 hores, per tal que la VSVG abandonés el reticle i s'acumulés al Golgi, que a aquesta temperatura no pot exportar vesícules però sí rebre'n del reticle (Matlin i Simons, 1983). Passat aquest temps tota la VSVG es trobava al Golgi, i s'activà el transport de vesícules cap a la membrana plasmàtica incubant les cèl·lules a 32 °C durant els temps indicats en cada experiment. Per monitoritzar la formació de transportadors de VSVG i la seva arribada a la membrana plasmàtica es van seguir dues estratègies:

a) Abans de la incubació final a 32 °C, es van tractar els pouets amb àcid tànnic 0.5 %, que impedeix la fusió de les vesícules formades amb la membrana plasmàtica (Newman et al., 1996), i per tant facilita la seva posterior comptabilització. Passada la incubació a 32 °C les

cèl·lules es van fixar i permeabilitzar per a realitzar un anàlisi immunocitoquímic amb anticossos contra la VSVG per tal de comptar el nombre de vesícules transportadores de VSVG formades durant el temps d'incubació a 32 °C.

b) Es va deixar que les vesícules amb VSVG es fusionessin amb la membrana plasmàtica i es va realitzar la immunocitoquímica de la VSVG sense permeabilitzar les cèl·lules, cosa que permetia tenir únicament la VSVG que havia arribat a la membrana.

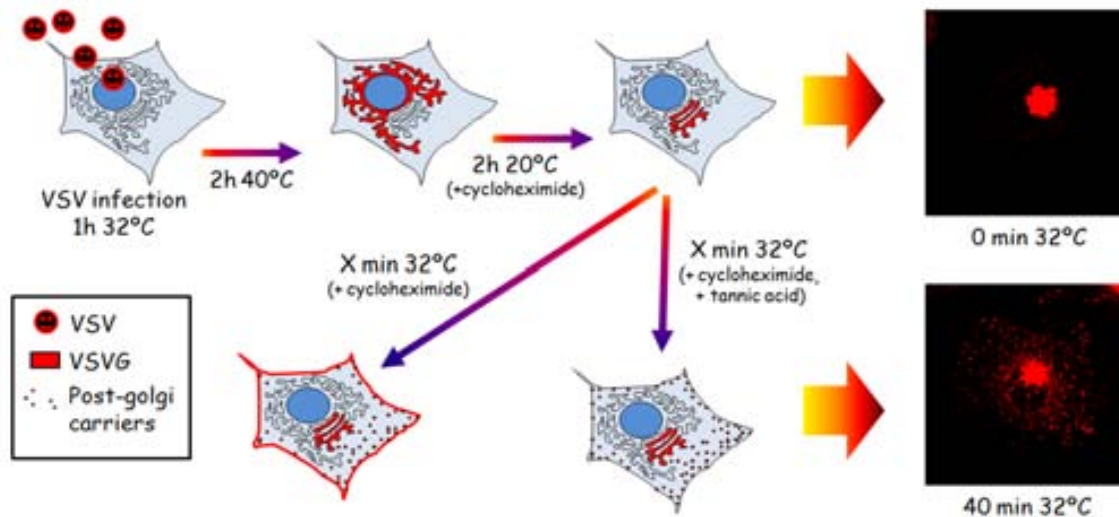


Figura M-3. Assaig VSVG de transport Golgi → membrana plasmàtica. Les cèl·lules, infectades amb el virus VSV es van sotmetre a incubacions a diferents temperatures per tal de concentrar la proteïna VSVG a l'aparell de Golgi. Amb la incubació final a 32 °C es monitoritzà la formació de vesícules de secreció i l'arribada de la VSVG a la membrana plasmàtica. Realitzant l'experiment en presència d'àcid tànnic, es bloqueja la fusió de les vesícules amb la membrana plasmàtica, facilitant el recompte dels transportadors formats.

En alguns experiment en cèl·lules COS-7 es va emprar una variant de l'assaig VSVG on enlloc d'infectar les cèl·lules amb el virus, es transfecten amb un vector per a l'expressió de la VSVG termosensible conjugada a una proteïna fluorescent roja, la mCherry (Shu et al., 2006). La transfecció es va realitzar amb el reactiu FuGene (Roche) seguint les instruccions del fabricant, 24 hores abans de realitzar l'assaig i a 40 °C, per tal que la VSVG s'acumulés al reticle. Seguidament es va continuar amb el mateix protocol que amb el VSV, incubant les cèl·lules a 20 °C.

Un cop realitzat l'assaig i les preparacions immunocitoquímiques, es van analitzar les cèl·lules per microscòpia confocal (Zeiss LSM510 META confocal microscope system).

6 Anàlisi de proteïnes

La determinació dels nivells i grau de fosforilació de les proteïnes d'interès, es va realitzar per Western blot dels llisats cel·lulars.

6.1 Solucions

- Reactius: Bradford, BCA,
- Tampó de llisi A (no desnaturalitzant): Tris-base 50 mM, pH 7.5, 0.1% tritó X-100 (v/v), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM β -glicerofosfat, 5 mM pirofosfat sòdic, 1 mM ortovanadat sòdic, 0.1% (v/v) β -mercaptoetanol, 250 μ M PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina.
- Tampó de llisi B (desnaturalitzant): Tris-base 62.5 mM, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol (50 mm ditiotreitòl, blau bromofenol)
- TBS: 25 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 2 mM KCl a pH 7.4
- TBS-tween: TBS amb un 1% (v/v) de Tween 20 (Sigma).
- Tampó d'electroforesi SDS-PAGE: Tris-base 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0.1%, pH 8.3
- Tampó de transferència: Tris-base 25 mM, glicina 200 mM, pH 8.3
- Solució de bloqueig: TBS amb un 5 % de llet desnatada en pols (p/v).
- Tampó de càrrega: Tris-base 62.5 mM a pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, blau de bromofenol 0.01%.
- Tampó d'Stripping: Tris-base 62.5 mM, SDS 2% i β -mercaptoetanol 0.7% a pH 6.8.
- Anticossos: GFAP, COX-2 (Santa Cruz), P-ERK1/2 (Ser202/Tyr204), P-MEK1 (Ser217), cPLA₂, P-cPLA₂ (Cell Signalling), α -tubulina, GAPDH, OX42, VSVG (Sigma).

6.2 Obtenció dels llisats cel·lulars

Per a la llisi de les cèl·lules es van emprar dues estratègies, elegides en funció de les exigències del protocol experimental:

a) Llisi en condicions no desnaturalitzants

Es van rentar les cèl·lules amb PBS fred i es van llisar amb l'ajut d'un *scraper* en tampó de llisi A fred i amb les plaques sobre gel. Seguidament els llisats es van tractar amb ultrasons durant 15 segons i es van centrifugar a 14000 g durant 15 minuts per prendre'n la solució sobrenadant, de la que es va determinar la concentració de proteïna pel mètode de Bradford i es va emmagatzemar a -80 °C.

b) Llisi en condicions desnaturalitzants

Es va aspirar el medi de les cèl·lules i es van llisar amb tampó de llisi B a temperatura ambient i posteriorment es van sonicar, se'n va analitzar la concentració de proteïna pel mètode del BCA, i es van congelar a -80 °C.

6.3 Determinació de proteïna

Per a la determinació de proteïna es van emprar dos assaigs, escollits en funció de la naturalesa de la mostra.

6.3.1 Assaig de Bradford

La quantitat de proteïna total dels llisats en el tampó no desnaturalitzant es va determinar pel mètode de Bradford (Bradford, 1976), basat en el desplaçament del màxim d'absorció des de 465 a 595 nm que experimenta una solució àcida de Coomassie Brilliant Blue G-250 en unir-se a proteïnes.

En plaques de 96 pouets, s'hi van aplicar alíquotes de 10 µl del llisat diluït 5 vegades en aigua, així com de solucions de concentració coneguda de BSA per a la recta de calibrat. Es va afegir a cada pou 200 µl de la solució Bradford (BIO-RAD; diluïda 5 vegades en aigua) i se'n va llegir l'absorbància a 595 nm en el lector de plaques. A partir de la recta de calibrat, es va determinar la concentració de proteïna dels llisats.

En aquells experiments on simplement ens interessava mesurar la quantitat de proteïna total present en cada pouet per emprar-la com a referència, es van tractar les cèl·lules amb una solució de NaOH 1M a fi de dissoldre'n el contingut proteic, i posteriorment es van analitzar pel mètode de Bradford tal com s'ha descrit.

6.3.2 Assaig del BCA

Degut al seu alt contingut en SDS, que interfereix en l'assaig de Bradford, la concentració de proteïna dels llisats en tampó B es va realitzar pel mètode del BCA, basat en la reducció del Cu^{2+} a Cu^{+} per part de proteïnes en medi alcalí (reacció de Biruet), i en la detecció colorimètrica del Cu^{+} amb àcid bicinconínic. Les mostres es van diluir 5 vegades en aigua, i a 10 µl s'hi va afegir 200 µl del reactiu de BCA (Pierce). Es van incubar en una placa de 96 pouets durant 30-60 minuts a 37 °C, i se'n va llegir l'absorbància a 560 nm.

6.4 Western Blot

L'anàlisi per western-blot de les proteïnes d'interès es va realitzar amb el sistema Mini-Protean II (Bio-Rad)

6.4.1 Preparació de les mostres

Abans d'aplicar-los al gel d'electroforesi, es va afegir 0.25 volums de tampó de càrrega 4x als lliats en tampó A, mentre que els lliats en tampó B se'ls va addicionar una solució de DTT a una concentració final de 50 µM, en presència de blau de bromofenol. Seguidament es van desnaturalitzar les proteïnes sotmetent els lliats a 95 °C durant 5 minuts. Es van carregar al gel entre 10 i 50 µg de proteïna per mostra en funció de cada cas.

6.4.2 Electroforesi i electrotransferència

La separació de proteïnes es va realitzar per electroforesi monodimensional en gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE). Es van separar dos gels per cada cambra, aplicant-hi un amperatge constant de 40 mA durant 1-2 hores depenent del percentatge d'acrilamida. Com a marcadors de pes molecular es va emprar la mescla Kaleidoscope (Bio-Rad).

Un cop separades les proteïnes, es van transferir a membranes de PVDF (Millipore) prèviament activades amb metanol. L'electrotransferència es va realitzar en fred i a un voltatge constant de 120 V durant 90 minuts.

6.4.3 Immunodetecció

La detecció de les proteïnes d'interès es va dur a terme mitjançant la incubació seqüencial de les membranes amb un anticòs primari específic per la proteïna i amb un de secundari anti IgG conjugat a la peroxidasa de rave (HRP).

En primer lloc es va bloquejar els llocs d'unió lliures de la membrana incubant-les durant 1 h en solució de bloqueig a temperatura ambient i en agitació. Després de rentar les membranes amb TBS-Tween, es van incubar durant la nit, a 4 °C, i en agitació, amb l'anticòs primari diluït en TBS-Tween amb un 5% de BSA (p/v). Després de tres rentats de 5 minuts amb TBS-Tween, les membranes es van incubar durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació, amb l'anticòs secundari diluït en TBS-Tween al 5% de llet desnatada en pols (p/v). La membrana es va rentar 5 vegades amb TBS-Tween per tal d'eliminar l'excés d'anticòs secundari. La detecció de la proteïna d'interès es va dur a terme a través de la reacció quimioluminiscent de

la peroxidasa de rave conjugada a l'anticòs secundari, aplicant-hi el kit Western Lighting plus-ECL (PerkinElmer), i es va analitzar exposant-hi films fotogràfics (Fuji Medical X-Ray film), que es van revelar en un equip Fujifilm FPM-100A.

En alguns casos, una vegada revelada, es va sotmetre la membrana al procés d'*stripping* per tal d'eliminar els anticossos que s'hi havien unit i poder analitzar-hi altres proteïnes de pes molecular similar. Es va dur a terme incubant les membranes durant 30 minuts a 55 °C amb el tampó d'*stripping* en agitació. A continuació es van rentar exhaustivament les membranes per eliminar restes del tampó d'*stripping* i es van tractar amb tampó de bloqueig.

6.5 Immunocitoquímica

Els experiments que requerien l'anàlisi microscòpic de proteïnes cel·lulars es van dur a terme per tincions immunocitoquímiques.

6.5.1 Solucions

- Paraformaldehid 4%: paraformaldehid 16% (Sigma) diluït en PBS.
- Solució de bloqueig: BSA 0.5%, NH₄Cl 50 mM en PBS amb o sense un 0.1% (p/v) de saponina.

6.5.2 Tinció immunocitoquímica

Les cèl·lules, sembrades sobre cobreobjectes de vidre (tractats amb poli-L-lisina o fibronectina per afavorir l'adhesió cel·lular), es van rentar amb PBS i fixar amb paraformaldehid al 4% en PBS, a temperatura ambient i en absència de llum, durant 10 minuts. Es van rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS i per tal de bloquejar els llocs d'unió inespecífica (i permeabilitzar les cèl·lules), es van incubar durant 20 minuts, en la foscor i a temperatura ambient, amb solució de bloqueig amb o sense saponina en funció de si interessava permeabilitzar les cèl·lules o no. Posteriorment els cobreobjectes es van incubar tota la nit i a 4 °C en una cambra humida amb els anticossos primaris diluïts en solució de bloqueig amb o sense saponina. Després de tres rentats amb PBS, es van incubar els cobreobjectes durant 45 minuts a temperatura ambient i en cambra humida amb els anticossos secundaris diluïts en solució de bloqueig amb o sense saponina. Finalment els cobreobjectes amb les cèl·lules marcades es van rentar tres vegades amb PBS i dues amb aigua, i es van muntar sobre portaobjectes amb medi de muntatge (Mowiol o Vectashield with DAPI).

7 Tractament estadístic

El tractament de les dades numèriques i la realització de les gràfiques d'aquest treball, s'han realitzat amb el programa Prism de Graph Pad Software. Per al seu anàlisi estadístic, de les dades recollides es van sotmetre a un test de normalitat (D'agostino, Pearson), i un cop comprovada la distribució gaussiana de les diferents determinacions, se'ls va aplicar el test paramètric de Dunnett, que permet comparar varis tractaments amb un control. Com a llindar de significació es va utilitzar un valor de p de 0.05.

*“Lasciate ogne speranza,
voi ch'intrate”*

Dante Alighieri



Resultats

1 Caracterització dels efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids en cultius d'astròcits

Una de les principals línies d'investigació del nostre grup gira al voltant de la relació existent entre la inhibició de la síntesi de fosfatidilcolina (PC) i la inducció de mort cel·lular (Ramos et al., 2000; 2002a; 2003). El mecanisme que porta de la inhibició de la síntesi de PC a la mort cel·lular encara és desconegut, però es treballa amb diverses hipòtesis que relacionarien la detecció d'una deficiència en l'abastiment de PC amb el desencadenament de processos de mort (revisat a Cui et al., 2002). Sabent que diversos agents citotòxics provoquen una inhibició en la síntesi de PC, ens va semblar factible que el tractament amb certs agents citoprotectors produís l'efecte contrari.

El liti protegeix els cultius de neurones granulars de cerebel de la mort induïda per C₂-ceramida (Centeno et al., 1998), un agent citotòxic que inhibeix la síntesi de PC (Ramos et al., 2000; 2002a; 2003). Per altra banda, en el moment d'iniciar el projecte d'aquesta tesi el nostre grup disposava de dades preliminars molt prometedores al voltant de l'estudi dels efectes de la C₂-ceramida en cultius d'astròcits, amb l'observació d'alteracions en la localització subcel·lular de la CCT α , l'enzim regulador de la síntesi de PC, que es relacionaven amb el grau d'inhibició de la síntesi de PC. En tractar els astròcits amb liti, s'observava l'efecte invers al de la C₂-ceramida respecte la localització de la CCT α i la síntesi de PC (Ramos, 2002b).

Aquests precedents ens van decidir a prendre l'estudi dels efectes del liti sobre la síntesi de PC en cultius d'astròcits i de neurones granulars de cerebel, com a punt de partida per a la realització d'aquesta tesi.

1.1 El liti incrementa la velocitat de síntesi de fosfatidilcolina

Els efectes beneficiosos del liti sobre els pacients bipolars no apareixen fins que han passat uns dies/setmanes des de l'inici del tractament (revisat a Schloesser et al., 2008). Per aquest motiu, a més d'estudiar els efectes del tractament agut amb aquest fàrmac, vam decidir ampliar l'estudi a temps de tractament més llargs. A la figura R-1 podem observar com el tractament amb liti produeix un increment en la velocitat de síntesi de PC tant en cultius d'astròcits (A) com de neurones granulars de cerebel (B). En ambdós tipus cel·lulars sembla que el tractament agut ja hi produeix un lleu increment en la velocitat de síntesi de PC, però

és a mesura que incrementem el temps de pretractament que l'increment esdevé més important. Els resultats amb astròcits es mostraven més clars i reproduïbles que en les neurones, fet que ens va decidir a realitzar la resta d'experiments en aquest model cel·lular.

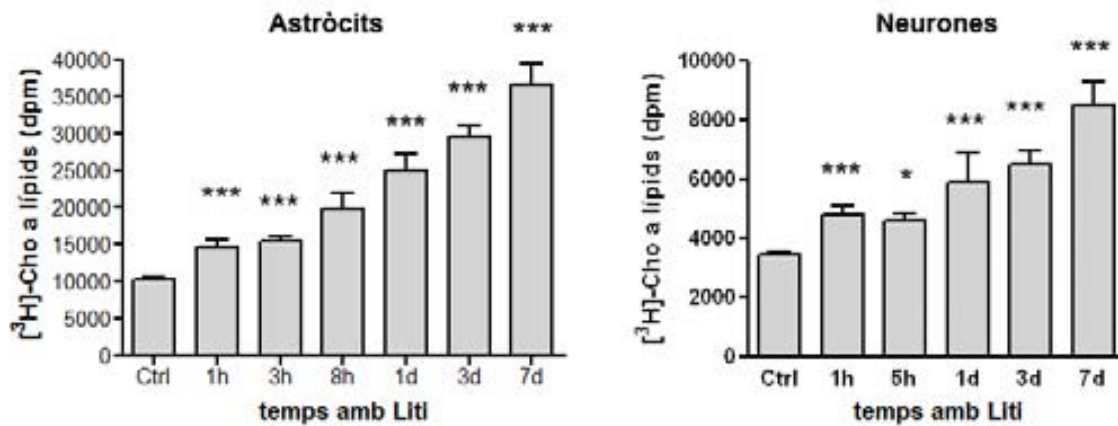


Figura R-1. El tractament amb liti incrementa la velocitat de síntesi de fosfatidilcolina. Els astròcits i les neurones van ser tractats amb LiCl (5 mM) durant els temps indicats. Passat aquest període se'ls va addicionar 0.25 μ Ci de [³H]-Cho per pouet, i després de 2 hores d'incubació, es va realitzar l'extracció dels lípids cel·lulars per quantificar-hi la radioactivitat incorporada, corresponent a la PC. A) Els astròcits secundaris de rata van ser sembrats a 200000 cèls/ml en plaques de 24 pouets. Passats 3 dies proliferant en DMEM + 10 % d'FBS, se'ls va arrestar el cicle cel·lular incubant-los durant 7 dies en DMEM + 0.5 % d'FBS en presència de LiCl durant els temps indicats. B) Les neurones granulars de cerebel es van obtenir de rates de 7-8 dies pel procediment habitual al nostre laboratori (Masgrau et al., 2000), i van ser tractades amb LiCl tal com s'havia fet amb els astròcits. Els resultats representen la mitjana i s.e.m. de 7 (A) i 3 (B) experiments independents, on cada punt va ser analitzat per triplicat (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 respecte el control).

En els experiments successius vam determinar que l'efecte del liti sobre la velocitat de síntesi de PC creix en augmentar la concentració de liti (Figura R-2A), i ja es mostra significatiu a concentracions terapèuticament rellevants (a 1 mM). Per altra banda, en allargar el marcatge amb [³H]-Cho fins a les 72-120 hores, moment en que s'haurà arribat a un estat estacionari on la incorporació del metabòlit marcat a PC per les vies biosintètiques es veu compensada per la seva alliberació per les vies de degradació de la PC, observem que desapareixen les diferències entre els astròcits control i els tractats amb liti (Figura R-2B). Tot i que a temps tant llargs de marcatge altres fosfolípids amb colina poden influir en la senyal de la fase orgànica, aquest experiment sembla indicar que l'increment en la biosíntesi de PC provocat pel liti es veu compensat per un increment en les seves vies de degradació, de manera que el liti no produiria un augment en els nivells cel·lulars de PC sinó que estaria accelerant el recanvi d'aquest fosfolípid. Aquest fenomen també es dona a nivell fisiològic amb l'entrada en fase G1 del cicle cel·lular (revisat a Jackowski, 1996), i és similar a l'efecte observat en sobreexpressar la CCT α (Walkey et al., 1994), de manera que és consistent amb un hipotètic increment de l'activitat CCT en resposta a liti.

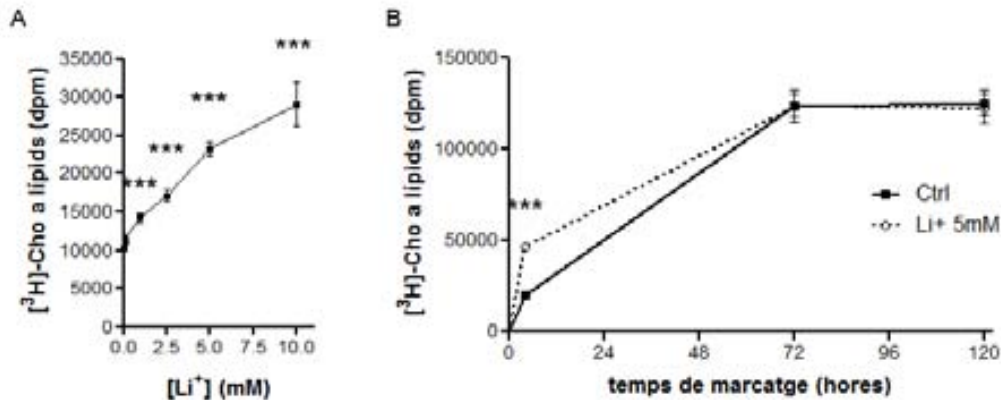


Figura R-2. Caracterització de l'efecte de liti sobre la biosíntesi de PC. A) Els astròcits van ser tractats durant 3 dies amb LiCl a les concentracions indicades, i posteriorment van ser marcats durant 2 hores amb 0.25 μ Ci/pouet de [³H]-Cho per mesurar-li la velocitat de síntesi de PC. B) Els astròcits van ser tractats durant 3 dies amb LiCl 5 mM, i passat aquest temps es van tractar amb 0.25 μ Ci/pouet de [³H]-Cho i a les 4, 72 i 120 hores de marcatge es va realitzar l'extracció dels lípids cel·lulars per quantificar-hi la radioactivitat incorporada. Els resultats representen la mitjana i s.e.m. de 3 experiments independents, on cada punt va ser analitzat per triplicat (*** p <0.001 respecte el control).

1.2 L'increment en la síntesi de fosfatidilcolina no és un artefacte ocasionat per les propietats citoprotectors del liti

Sabent que el liti posseeix propietats citoprotectors, vam voler descartar que l'efecte que observàvem fos degut a una major resistència dels astròcits tractats amb liti davant d'una possible mort per privació de sèrum, que es traduiria en un major nombre de cèl·lules vives en els pouets tractats amb liti i per tant una major quantitat de PC sintetitzada. Amb assaigs de supervivència i per determinació de proteïna total, vam comprovar que el tractament amb liti no afectava al nombre de cèl·lules vives per pouet (Figura R-3A i 3B). També vam determinar la quantitat de fosfolípids totals i tal com era d'esperar a partir dels resultats de la figura R-2B, el liti, tot i incrementar prolongadament la velocitat de síntesi de PC, no augmentava els nivells absoluts de fosfolípids cel·lulars (Figura R-3C).

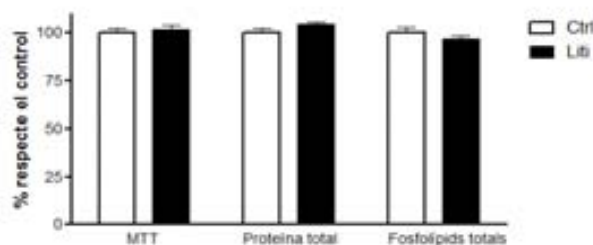


Figura R-3. El liti no afecta la viabilitat cel·lular ni la quantitat total de proteïna o fosfolípids. Els astròcits secundaris de rata van ser sembrats a 200000 cèls/ml en plaques de 24 pouets. Passats 3 dies proliferant en DMEM + 10 % d'FBS, se'ls va arrèstalar el cicle cel·lular incubant-los durant 7 dies en DMEM + 0.5 % d'FBS, en presència o no de LiCl (5mM) els 5 darrers dies. Passat aquest temps es va analitzar la viabilitat cel·lular pel mètode de l'MTT, la quantitat de proteïna per pouet pel mètode de Bradford, i la quantitat de fosfolípids cel·lulars per l'assaig colorimètric de fosfats. Els resultats es mostren com a percentatge respecte al control, amb la mitjana i s.e.m. dels resultats de 3 experiments independents realitzats per triplicat.

1.3 El liti potencia la ruta de Kennedy

La PC és sintetitzada per la ruta de Kennedy (Kennedy i Weiss, 1956), que s'inicia quan la colina (Cho) captada per la cèl·lula o reciclada de la hidròlisi de fosfolípids, és fosforilada per formar P-Cho, que seguidament es transforma en CDP-Cho que reacciona amb DAG per donar lloc a la PC (Figura I-7). En condicions normals, el pas limitant d'aquesta via és la conversió de la P-Cho a CDP-Cho, catalitzada per la CCT, que es considera l'enzim regulador de la síntesi de PC (revisat a Kent, 2005). Per tant era d'esperar que el liti afectés l'activitat d'aquest enzim, i per comprovar-ho vam realitzar experiments de marcatge amb [³H]-Cho mesurant com es formaven els diferents metabòlits de la ruta al llarg del temps. En cas que el liti provoqués un increment en l'activitat de la CCT es produiria un major consum de P-Cho que es manifestaria en una menor quantitat d'aquest metabòlit, mentre que la CDP-Cho i la PC es veurien augmentades.

En aquest tipus d'experiments (Figura R-4A) els nivells de [³H]-P-Cho creixen molt ràpidament, mentre que la [³H]-PC triga més a formar-se però es va acumulant a mesura que passa el temps. Per contra, la [³H]-Cho lliure i la [³H]-CDP-Cho es mantenen a uns nivells molt baixos. Aquest resultat indiquen que la [³H]-Cho que entra a la cèl·lula és ràpidament fosforilada per la CK, produint una acumulació de [³H]-P-Cho que s'anirà consumint lentament per formar [³H]-CDP-Cho, una molècula que es troba en proporcions molt reduïdes perquè un cop sintetitzada es metabolitza ràpidament per donar lloc a [³H]-PC. Tal com està descrit, l'acumulació de [³H]-P-Cho i la ràpida desaparició de la [³H]-CDP-Cho que observem en els astròcits indiquen que el pas limitant de la ruta és el catalitzat per la CCT (revisat a Kent, 2005).

Ara bé, analitzant l'efecte que produeix el liti sobre aquesta via metabòlica, observem en primer lloc que als diferents temps mesurats els astròcits pretractats durant 5 dies amb LiCl 5 mM presenten un increment en tots els metabòlits marcats amb [³H]-Cho (Figura R-4B). Si el liti actua accelerant l'activitat de la CCT, l'enzim limitant de la ruta de Kennedy, hauríem esperat que es produís un increment en la [³H]-CDP-Cho i la [³H]-PC, però els nivells de [³H]-P-Cho haurien de disminuir. En canvi es produeix un clar increment en la P-Cho, fet que ens va fer pensar que el liti podria estar actuant a nivell de la colina quinasa (CK). En condicions normals, la conversió de P-Cho a CDP-Cho és el pas limitant de la ruta de Kennedy, i per tant una major activitat CK hauria de resultar simplement en un increment dels nivells de P-Cho, un metabòlit que ja es troba en proporcions elevades en condicions normals i que difícilment provocaria un augment notori en la producció de PC. Tot i això, en alguns

models s'ha comprovat que el control de la ruta de Kennedy també es pot exercir a nivell de la CK (Yu et al., 2002), motiu pel qual no es pot descartar que el liti actui potenciant l'activitat d'aquest enzim.

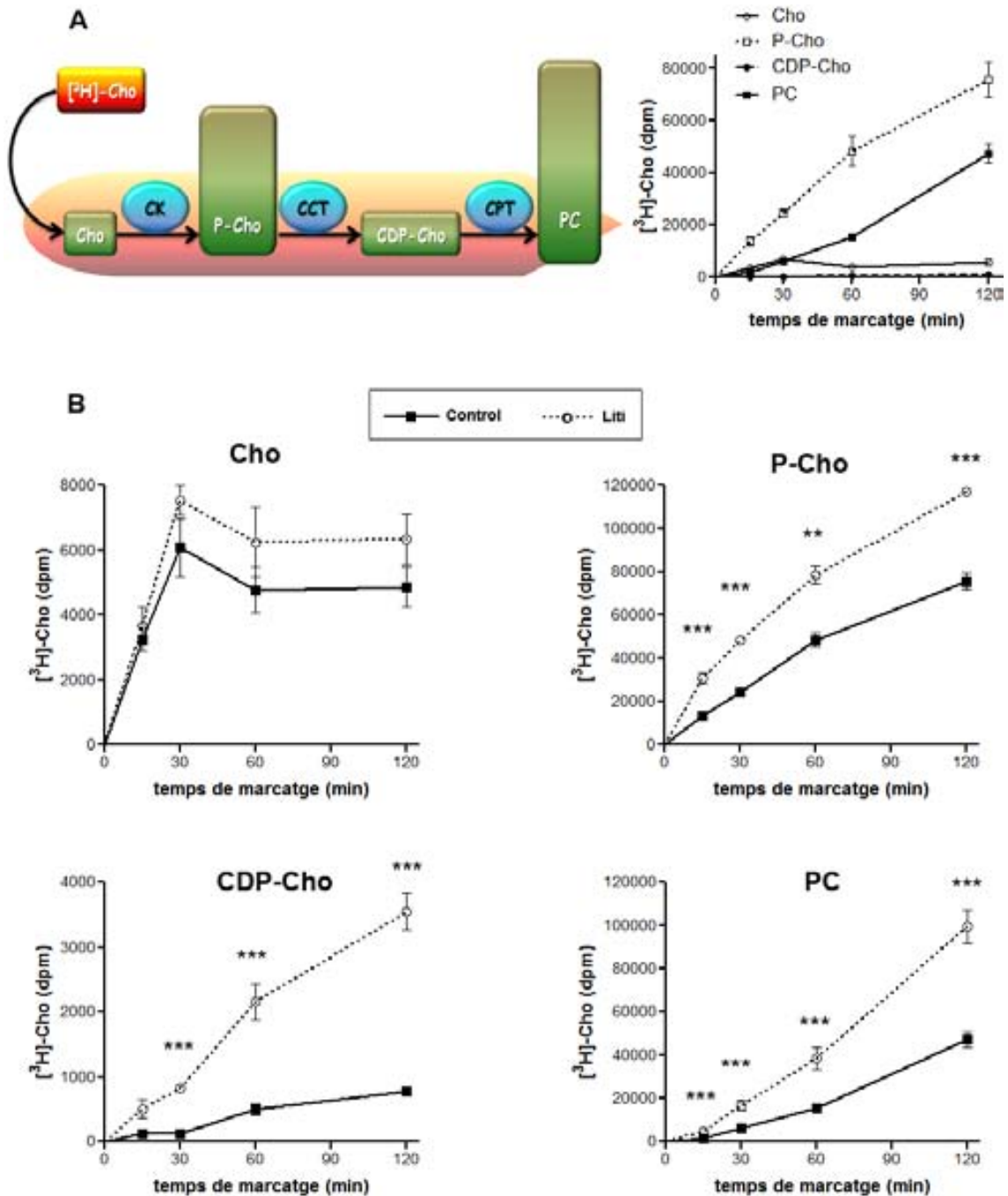


Figura R-4. El liti potencia la ruta de Kennedy. Els astròcits, pretractats (○) o no (■) durant 5 dies amb LiCl (5 mM), van ser marcats amb 1 μCi/pouet de [3H]-Cho, i passats els temps indicats es va analitzar la radioactivitat associada a cada metabòlit de colina. A) representació de la ruta de Kennedy i de les quantitats relatives dels seus metabòlits. En el gràfic de la dreta s'hi observa com els diferents metabòlits es van marcant al llarg del temps. B) Efecte del pretractament amb liti sobre el marcatge amb [3H]-Cho en els diferents metabòlits de la ruta de Kennedy. Es mostra un experiment representatiu de quatre experiments independents, amb la mitjana i s.e.m. de cada punt mesurat per triplicat (***p*<0.01, ****p*<0.001, liti vs control).

Resultats I

Analitzant aquests experiments però, ens vam adonar que no eren adequats per a detectar quin dels enzims de la ruta experimentava un increment en la seva activitat, ja que en el moment de fer l'experiment aquest canvi en l'activitat ja s'hauria produït, i la resta d'enzims ja s'haurien adaptat al nou estat. El protocol seguit permet estudiar l'estimulació o inhibició aguda de la via metabòlica per part d'un agent que modifiqui l'activitat d'algun dels enzims durant el transcurs del marcatge. En el nostre cas, havíem realitzat pretractaments amb liti 5 dies abans de realitzar el marcatge metabòlic, de manera que en el moment de realitzar l'experiment ja s'hauria arribat a un nou estat estacionari on tots els passos de la ruta estarien incrementats, fet que ens impedeix detectar sobre quin enzim actua el liti en primera instància (Figura R-5). Per tant aquest experiment ens permet constatar que la via de Kennedy està accelerada en els astròcits tractats amb liti, però no hi podem deduir sobre quin enzim ha actuat el liti.

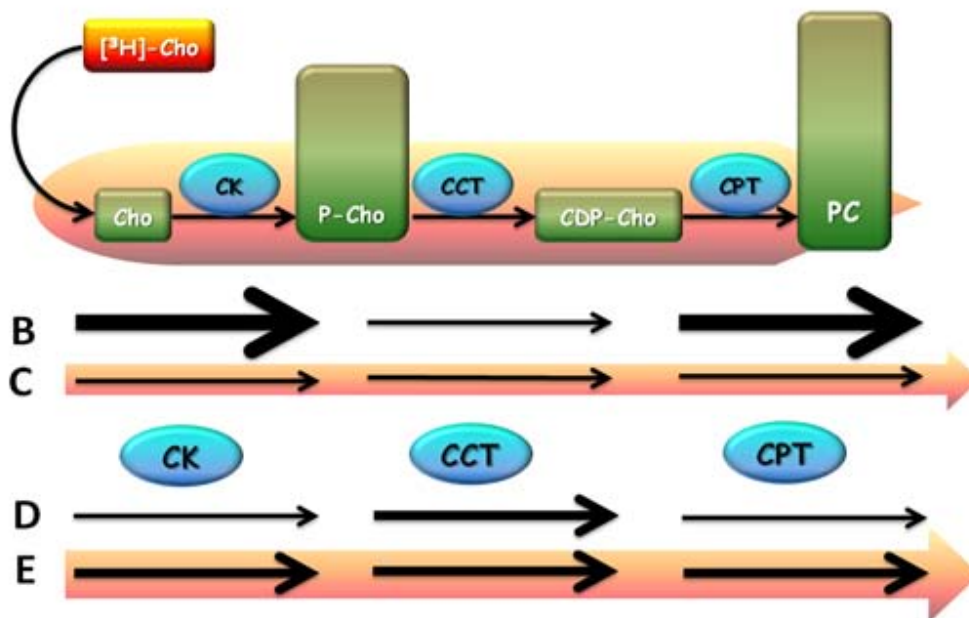


Figura R-5. Representació de l'activitat dels enzims de la ruta de Kennedy. A) Esquema de la ruta de Kennedy, on es representa l'acumulació de metabòlits de colina en forma de P-Cho, i sobretot de PC, el producte final de la via. B) El pas limitant de la ruta de Kennedy és el catalitzat per la CCT, que marcarà la velocitat global de la ruta, a la que s'adaptaran la CK i la CPT (C). D) Si es produeix un increment puntual en l'activitat de la CCT, el pas més lent, els altres enzims incrementaran la seva activitat (E). En realitzar experiments de marcatge amb $[^3\text{H}]\text{-Cho}$, podem detectar canvis instantanis en l'activitat d'algun dels enzims de la ruta, que es traduiran en l'alteració dels nivells dels diferents metabòlits. Un cop s'ha arribat al nou estat estacionari (E) no ens serà possible determinar quin dels enzims ha estat alterat, tal com succeeix amb el tractament crònic amb liti.

1.4 El tractament agut amb liti incrementa l'activitat CCT

Tot i que l'efecte del liti sobre la síntesi de PC es mostra especialment important a temps de pretractament de varis dies, a les poques hores de tractament amb liti ja s'hi observa un lleu increment (Figura R-1). Per aquest motiu vam decidir repetir els experiments aplicant el liti en el mateix moment que la $[^3\text{H}]\text{-Cho}$, per tal de comprovar si hi podíem detectar algun canvi

en l'activitat d'algun dels enzims de la ruta. Respecte l'experiment anterior, a més d'allargar el marcatge fins a les 3 hores per donar temps al liti a actuar, vam realitzar una simplificació del protocol per tal d'estalviar-nos la separació dels metabòlits per TLC. Sabent que en l'extracció de lípids la radioactivitat associada a la fase aquosa de la separació líquid-líquid correspon pràcticament en la seva totalitat a la $[^3\text{H}]\text{-P-Cho}$, i en menor mesura a la $[^3\text{H}]\text{-Cho}$, ambdós metabòlits anteriors a la reacció de la CCT, vam decidir comparar la seva senyal amb la radioactivitat de la fase orgànica, corresponent a la $[^3\text{H}]\text{-PC}$. D'aquesta manera podríem comprovar si l'activitat CCT és incrementada pel liti. A la figura R-6 es mostra com el tractament agut amb LiCl 5 mM produeix un lleu increment en la radioactivitat associada a la fase orgànica, mentre que s'observa una disminució en els metabòlits de colina hidrofíl·lics. Aquests resultats indiquen que el liti provoca un increment en l'activitat CCT que fa augmentar la producció de PC i el consum de P-Cho.

Així doncs, podem concloure que l'increment en la velocitat de síntesi de PC provocat pel tractament agut amb liti es deu a una major activitat CCT. Queda per confirmar si l'increment en l'efecte que s'observa a temps de tractament amb liti més llargs també es deu a un augment en l'activitat CCT.

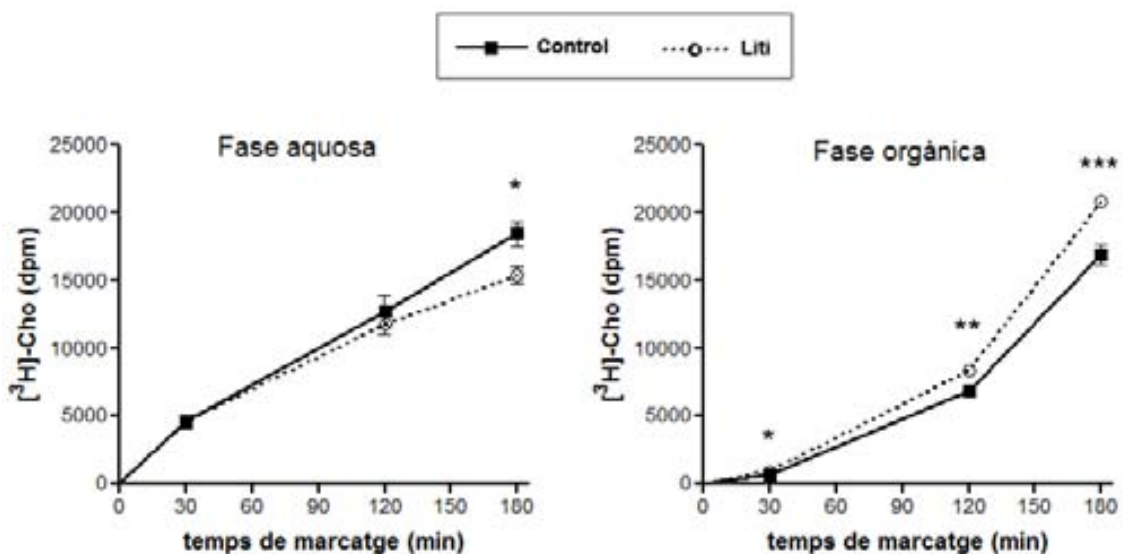


Figura R-6. El tractament agut amb liti activa la CCT. Evolució del marcatge dels metabòlits de colina addicionant $0.25 \mu\text{Ci/pouet}$ de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ al mateix temps que el LiCl (5mM). Passats els temps indicats, es realitzà l'extracció líquid-líquid dels components cel·lulars i es va mesurar la radioactivitat de les fases orgànica i aquosa. Es considerà que la radioactivitat associada a la fase orgànica corresponia a la $[^3\text{H}]\text{-PC}$, mentre que la de la fase aquosa corresponia a la $[^3\text{H}]\text{-P-Cho}$, amb una petita contribució de la $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ lliure. El liti provoca un augment en la formació de $[^3\text{H}]\text{-PC}$ i una disminució en la $[^3\text{H}]\text{-P-Cho}$, fet que indica que està accelerant l'activitat CCT. Es mostra un experiment representatiu de tres experiments independents, amb la mitjana i s.e.m. de cada punt mesurat per quadruplicat (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, liti vs control).

1.5 Rol de la GSK-3 i la IMPasa en l'efecte del liti sobre la fosfatidilcolina

Les dues principals dianes directes del liti són la inhibició de la IMPasa i de la GSK-3 (revisat a Harwood i Agam, 2003). Per comprovar si l'acció del liti sobre la síntesi de PC podia ser deguda al seu efecte inhibitori sobre un d'aquests enzims, vam tractar els astròcits amb inhibidors de la GSK-3 (l'SB216763; Coghlan et al., 2000) i de la IMPasa (l'L-690,488, un precursor permeable a membranes de l'L-690,433; Atack et al., 1994). Ni l'SB216763, ni l'L-690,488, aconseguen estimular la síntesi de PC en les condicions testades (Figura R-7A). És més, l'inhibidor de la IMPasa produeix una forta reducció en la síntesi de PC, probablement degut a la seva toxicitat, que es fa manifesta en l'assaig de viabilitat (Figura R-7B). La inhibició d'una quinasa promotora de mort cel·lular com la GSK-3 confereix propietats citoprotectores a l'SB216763 (Takadera i Ohyashiki, 2004), que en el nostre model es manifesten amb la protecció parcial dels astròcits davant la mort induïda per l'L-690,488 (Figura R-7B). Es podria pensar que el liti compensa els possibles efectes citotòxics de la inhibició de la IMPasa pel fet d'inhibir també la GSK-3, però tot i això la combinació d'ambdós fàrmacs tampoc produeix un increment en la velocitat de síntesi de PC (Figura R-7A).

Un punt a tenir en compte és que el liti inhibeix la IMPasa mitjançant un mecanisme de tipus acompetitiu (Hallcher et al., 1980), és a dir, actua sobre el complex enzim-substrat, de manera que la seva capacitat d'inhibició augmenta en incrementar la concentració de substrat. Per tant el liti inhibirà amb més potència la IMPasa quan la cèl·lula produeixi una gran quantitat d'inositol fosfats, per exemple en situacions d'activació persistent de la PLC. En canvi l'L-690,433 competeix amb el substrat pel centre actiu de l'enzim, inhibint la IMPasa independentment del grau d'activació de les vies que produeixen inositol fosfats, fet que podria explicar la seva toxicitat i que el seus efectes sobre la síntesi de PC siguin diferents als del liti. Ara bé, tot i que actua per un mecanisme diferent que el liti i resulta citotòxic, cal esperar que en presència de L-690,488 la IMPasa dels astròcits es trobarà inhibida, i en aquestes condicions el liti no podrà actuar sobre un enzim que ja està inhibit, de manera que si l'efecte del liti sobre la síntesi de PC és degut a la inhibició acompetitiva de la IMPasa, es veurà molt reduït si realitzem el tractament amb liti en presència de L-690,488. Realitzant aquest experiment vam observar que si bé amb el tractament amb L-690,488 els astròcits veien reduïda la seva velocitat de síntesi de PC, l'efecte relatiu provocat pel liti era el mateix

que en els astròcits sense L-690,488, fet que indicaria que el liti actua per una via independent de la inhibició de la IMPasa (Figura R-7A i B).

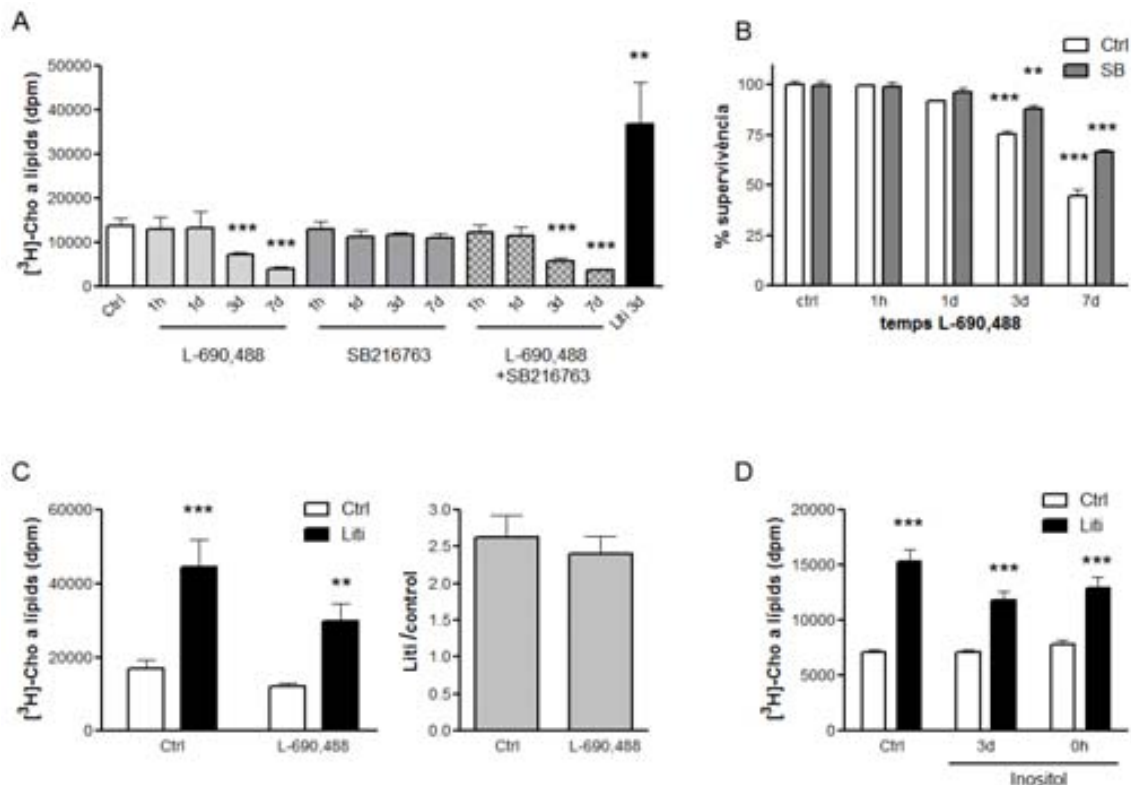


Figura R-7. L'efecte del liti sobre la síntesi de PtdCho no és degut a la inhibició de la IMPasa o de la GSK-3. Els astròcits secundaris es van mantenir durant 7 dies en DMEM + 0.5 % d'FBS. Durant aquest període d'incubació els astròcits van ser tractats durant els temps indicats amb SB216763 (3 μM), L-690,488 (1 μM) o LiCl (5mM). A) Efecte dels inhibidors de la GSK-3 (SB216763) i de la IMPasa (L-690,488), i de la combinació d'ambdós, sobre la incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids. B) Assaig MTT de supervivència cel·lular en astròcits tractats durant els temps indicats amb L-690,488 en presència o absència d'SB216763. C) Efecte del tractament amb LiCl durant 1 dia en presència o absència d'L-690,488 sobre la incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids. Al panell de la dreta es mostra l'efecte relatiu del LiCl respecte al control en ambdues situacions. D) Incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids en astròcits pretractats amb LiCl durant de 3 dies, i amb l'addició al medi d'inositol (10 mM) al mateix temps que el LiCl (3d) o en el moment de realitzar el marcatge amb $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ (0h). Els valors representen la mitjana i s.e.m. de 3 (A, B i C) i 5 (C) experiments, on cada punt es reproduïa per quadruplicat (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecte al control).

Aquests experiments semblaven indicar que la inhibició de la IMPasa no estava implicada en l'efecte del liti sobre la síntesi de PC, però per les seves característiques citotòxiques l'L-690,488 no sembla un fàrmac òptim per a l'estudi de la inhibició de la IMPasa, i de fet, tot i el gran interès que desperta aquest procés, són pocs els treballs on s'empra aquest compost. Per aquest motiu, abans de descartar la IMPasa com a diana del liti per al seu efecte sobre la síntesi de PC, vam decidir emprar una altra estratègia experimental. Un dels mètodes més emprats per discriminar quins efectes del liti són deguts a la depleció d'inositol és l'aportació d'inositol exogen per compensar la depleció d'aquest compost (revisat a Harwood, 2005). Així, si l'efecte del liti sobre la síntesi de PC és degut a la disminució dels nivells d'inositol intracel·lular provocada per la inhibició de la IMPasa, aquest s'hauria de veure revertit en

addicionar una quantitat important d'inositol al medi. A la figura R-7C, podem veure com amb l'addició d'inositol, ja sigui en el moment d'iniciar el tractament amb liti o en el moment de realitzar el marcatge metabòlic, no s'elimina l'efecte del liti sobre la síntesi de PC. Tot i això, l'inositol produeix una lleu disminució de la incorporació de colina a lípids en els astròcits tractats amb liti, sense que els astròcits control es vegin afectats. Això fa pensar que tot i els resultats obtinguts amb l'L-690,488, la depleció d'inositol contribueix, com a mínim parcialment, en l'efecte del liti sobre la síntesi de PC.

Així doncs, l'acció del liti sobre la síntesi de PC no es donaria per la inhibició de la de la GSK-3, però hi podria haver una contribució significativa de la depleció d'inositol provocada pel liti en inhibir la IMPasa.

1.6 Efecte del liti sobre la incorporació de [³²P]-P_i a fosfolípids

Per a comprovar si el liti actua específicament sobre la síntesi de PC o també afecta d'altres glicerofosfolípids, vam realitzar experiments de marcatge amb [³²P]-P_i. A la figura R-8B observem com després de 4 hores de marcatge, la major part del [³²P]-P_i incorporat a fosfolípids es troba en la PC. Sorpren però que el tractament amb liti només provoqui un lleuger increment en la quantitat de [³²P]-P_i incorporat a la PC. La via d'incorporació de [³²P]-P_i a PC passa per la seva unió a ADP per formar [³²P]-ATP, que és incorporat a la ruta de Kennedy en ser emprat per la colina quinasa (CK) per formar [³²P]-P-Cho, amb un fosfat que es mantindrà unit a la Cho fins a incorporar-se a la PC (revisat a Kent, 2005). Per tant a no ser que s'hagi alterat la síntesi d'ATP, és difícil d'acceptar que es pugui observar un increment en el marcatge de la PC amb [³H]-Cho sense que es doni un efecte similar amb el [³²P]-P_i.

Ara bé, en realitzar un experiment de pols de [³H]-Cho en les mateixes condicions (Figura R-8C), vam observar que per algun motiu tampoc es produïa l'efecte que havíem observat en els anteriors experiments d'incorporació de [³H]-Cho a lípids. A part de la PC, l'esfingomielina també és un lípid que conté colina, per la qual cosa ens vam preguntar si podria ser que enlloc d'afavorir la síntesi de PC, el liti estigués incrementant la incorporació de colina a esfingomielina. Ara bé, la taxa d'incorporació de [³H]-Cho a esfingomielina és molt menor a la que es dona en la PC per la qual cosa es pot assumir que la quantitat de [³H]-Cho incorporada a lípids és pràcticament equivalent a la quantitat incorporada a PC. Per a què els canvis observats en la incorporació de [³H]-Cho a lípids fossin deguts a un increment de la velocitat de síntesi d'esfingomielina, caldria que els astròcits tractats amb liti experimentessin un augment descomunal en la síntesi d'aquest fosfolípid. Aquesta idea no era molt probable

per la qual cosa abans d'embarcar-nos en l'estudi de la síntesi d'esfingomielina, vam voler analitzar altres variables del disseny experimental que permetessin explicar l'aparent contradicció entre els experiments de marcatge amb $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ i amb $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$.

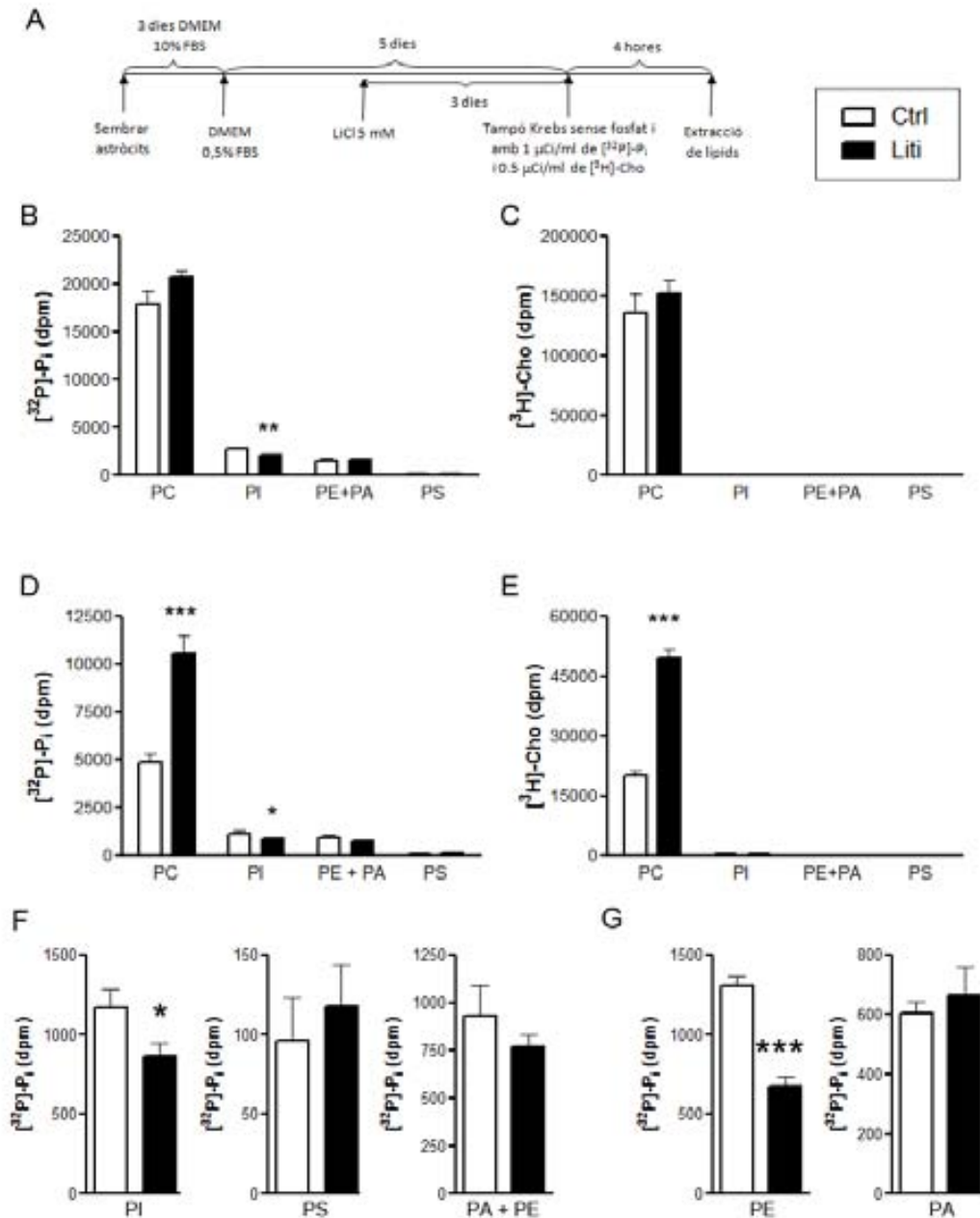


Figura R-8. Efecte del liti sobre la incorporació de $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ a fosfolípids. A) Esquema del procediment experimental per a l'estudi de la incorporació de $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ a fosfolípids. Després del marcatge de 4h, es va extreure els lípids cel·lulars i es van separar per TLC, amb la fase mòbil formada per cloroform:metanol:àcid acètic:aigua (60:50:1:4), que proporciona una bona resolució del PI, la PC i la PS, però no separa la PE i el PA. B i C) Marcatge dels fosfolípids canviant-los el medi per tampó Krebs sense fosfat i amb $1 \mu\text{Ci/ml}$ $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ i $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]\text{-Cho}$, tal com s'indica en l'esquema (A). D i E) Reproducció de l'experiment anterior eliminant el pas del canvi de medi per tampó Krebs, i addicionant $10 \mu\text{Ci/pouet}$ de $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ i $0,25 \mu\text{Ci/pouet}$ de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ directament sobre el medi de cultiu. F) Detall dels resultats de (D). G) Replicació de l'experiment (D) emprant una fase mòbil que permet separar el PA de la PE. Els valors respresenten la mitjana i s.e.m. de 4 experiments, on cada punt es va reproduir per triplicat (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, liti vs control)..

Una de les diferències que podien ser més rellevants entre els dos protocols emprats rau en el fet que tal com es mostra en l'esquema de la figura R-8A, en els experiments de pols de $^{32}\text{P}-\text{P}_i$ es substituïa el medi de cultiu per tampó Krebs sense fosfat. Aquest pas es realitza únicament per augmentar la sensibilitat de mètode incrementant la proporció de fosfat marcat respecte al fosfat fred, però podria ser que afectés d'alguna manera l'efecte del pretractament amb liti. Per comprovar-ho, vam realitzar un experiment de marcatge amb $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ en astròcits pretractats amb liti durant diferents temps, amb la diferència que en alguns dels pouets hi realitzarem un canvi del medi de cultiu per medi nou, restituint-hi el liti quan era necessari, una hora abans del pols de colina. Sorprenentment, aquest fet provocava una gran reducció en l'efecte del liti sobre la incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids (Figura R-13B). Això indica que el fet de canviar el medi en el que s'han incubat els astròcits durant el pretractament amb liti, és suficient per alterar completament els efectes d'aquest fàrmac sobre la síntesi de PC.

Per tant ens vam proposar tornar a realitzar els experiments de marcatge amb $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$, addicionant aquest precursor marcat sobre el mateix medi de cultiu dels astròcits. El problema de la pèrdua de sensibilitat provocat per la competència del fosfat marcat amb el fosfat fred del medi de cultiu el vam resoldre simplement tractant els astròcits amb una concentració més elevada de $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$.

Realitzant l'experiment en aquestes condicions, observem com el liti incrementa la incorporació de $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ a PC (Figura R-8D i 8F), mentre que en el PI s'hi dona una lleugera disminució que podria ser deguda a la inhibició del reciclatge de l'inositol que produeix el liti en inhibir la IMPasa (figura I-3). El marcatge de la PS és molt reduït, però no sembla presentar canvis importants associats al tractament amb liti. Pel que fa a la PE i al PA, la fase mòbil emprada per la TLC no permet separar-los, de manera que per obtenir una millor resolució de la separació dels fosfolípids es va realitzar un experiment complementari on es van unir els extractes lipídics de 6 pouets i es van analitzar per cromatografia en capa fina bidimensional (no es mostra). Pel que fa al PI, la PC i la PS, els resultats obtinguts per aquest mètode són equivalents als obtinguts amb la separació monodimensional, mentre que en la PE s'hi produeix una forta reducció en els pous tractats amb liti, i en el PA no s'hi detecta cap efecte clar. Tot i la millora en la separació, l'ús de TLC's bidimensionals resulta massa llarg i costós, fet que impedeix analitzar un elevat nombre de mostres. Analitzant altres possibilitats, vam aconseguir obtenir una bona resolució dels fosfolípids d'interès emprant una fase mòbil formada per cloroform:metanol:acetona:àcid acètic:aigua (50:10:20:10:5), que va ser emprada

en les successives separacions de fosfolípids. D'aquesta manera podem observar com el liti inhibeix la incorporació de [^{32}P]- P_i a PE, mentre que no sembla afectar al PA (Figura R-8G).

1.7 El liti inhibeix la incorporació de [^{14}C]-acetat a fosfolípids

Un cop analitzada la incorporació de [^{32}P]- P_i als caps polars dels diferents fosfolípids, ens vam preguntar si el marcatge amb [^{14}C]-acetat, que s'incorpora a les cadenes alifàtiques, mostraria el mateix comportament en quant al tractament amb liti. Sorprenentment va resultar que el liti no només no estimula la incorporació de [^{14}C]-acetat a PC, sinó que a temps llargs de tractament produeix una forta reducció en la incorporació d'aquesta molècula als diferents fosfolípids analitzats (Figura R-9).

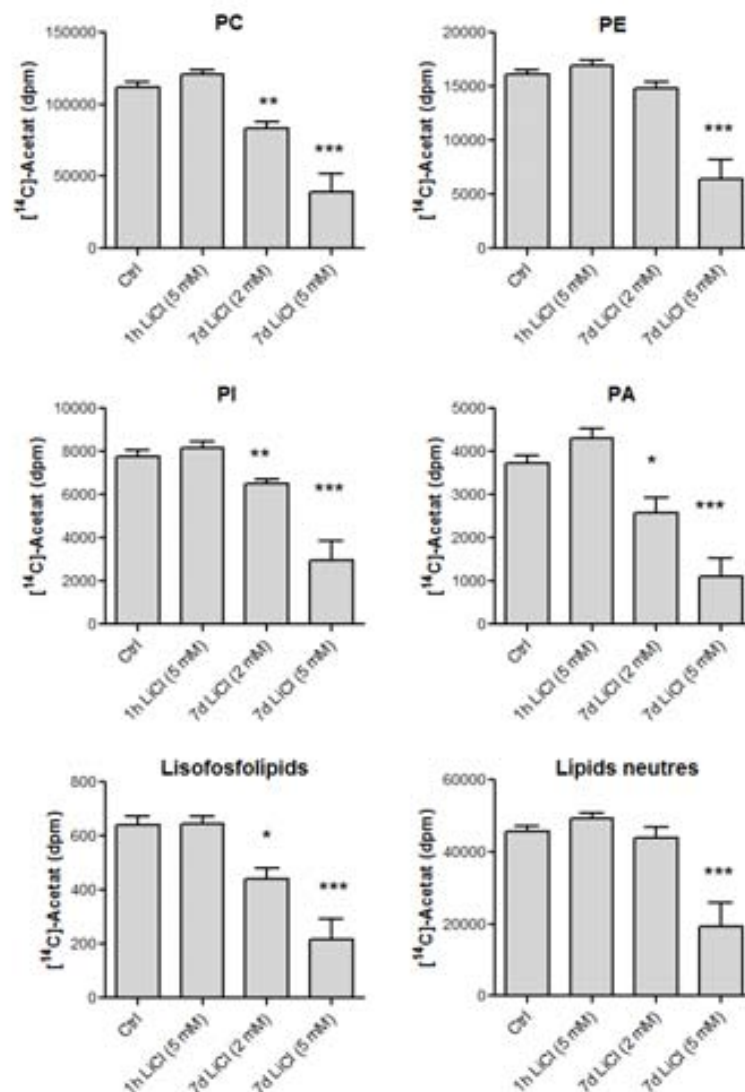


Figura R-9. Efecte del liti sobre la incorporació de [^{14}C]-Acetat a fosfolípids. Els astròcits secundaris es van mantenir durant 8 dies en DMEM + 0.5 % d'FBS en plaques de 6 pouets, període durant el qual van ser tractats amb LiCl a les concentracions indicades durant 1 hora (1h) o 7 dies (7d). Seguidament se'ls va addicionar 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de [^{14}C]-Acetat i es van incubar durant 4 hores. Els extractes lipídics es van separar per TLC, amb una fase mòbil de cloroform:metanol:acetona:àcid acètic:aigua (50:10:20:10:5). Es mostra la mitjana i s.e.m. de 3 experiments, on cada punt es va analitzar per triplicat (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, respecte al control)..

Aquest resultat, que aparentment entra en contradicció amb els experiments anteriors, es pot explicar si analitzem com s'incorporen el $[^{14}\text{C}]$ -acetat, la $[^3\text{H}]$ -Cho i el $[^{32}\text{P}]$ - P_i a la PC (Figura 10). Els dos darrers s'incorporen al cap polar de la PC per la ruta de Kennedy, que estarà accelerada pel liti, mentre que el $[^{14}\text{C}]$ -acetat s'empra per a la síntesi d'àcids grassos que passaran a formar part de les cadenes alifàtiques de la PC. Per tant es pot donar simultàniament un increment en la síntesi de PC per la ruta de Kennedy i una disminució en la incorporació de $[^{14}\text{C}]$ -acetat a PC. D'aquesta manera el liti, o bé inhibeix la síntesi d'àcids grassos, o bé inhibeix la incorporació d'aquesta àcids grassos a la PC. Els àcids grassos s'incorporaran a la PC a través de la síntesi *de novo* de fosfolípids (figura I-6), o per la reacilació de la lisoPC formada per acció de les fosfolipases A sobre la PC (figura R-10A).

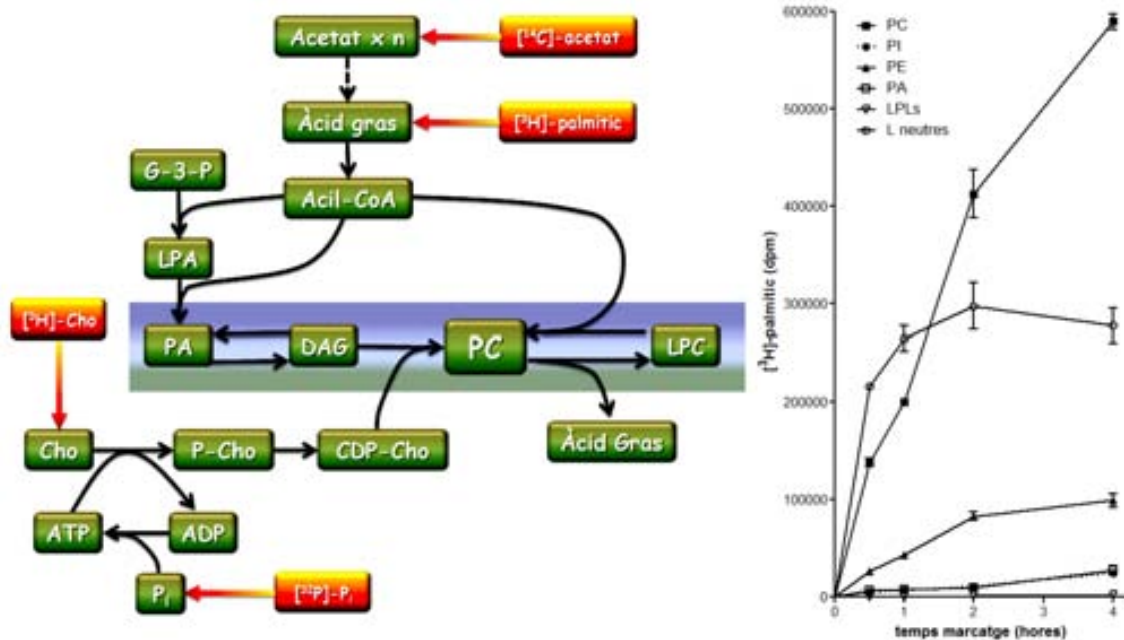


Figura R-10. Incorporació de precursors radioactius a la PC. A) Esquema de les principals reaccions implicades en la biosíntesi de PC on s'indiquen els punts on s'introdueixen els precursors radioactius emprats. Es pot observar com la $[^3\text{H}]$ -Cho i el $[^{32}\text{P}]$ - P_i s'incorporen a la PC a través de la ruta de síntesi de CDP-Cho, mentre que el $[^{14}\text{C}]$ -Acetat i el $[^3\text{H}]$ -Palmític ho fan a nivell de la síntesi *de novo* de PA i posterior formació de DAG o bé a mitjançant la reacilació de la lisoPC a PC. Aquest fet permet explicar que el liti pugui produir simultàniament un increment en la incorporació de $[^3\text{H}]$ -Cho i $[^{32}\text{P}]$ - P_i a PC i una reducció en la incorporació de $[^{14}\text{C}]$ -Acetat. B) Incorporació de $[^3\text{H}]$ -Palmític als diferents fosfolípids. Els astròcits, sembrats en plaques de 24 pouets es van incubar en DMEM al 0.5% d'FBS durant 8 dies, moment en què es van marcar amb 1 μCi /pouet d'àcid $[^3\text{H}]$ -Palmític. Als temps indicats es van extreure els lípids cel·lulars (unint el contingut de 3 pouets per cada punt), es separaren per TLC i es mesurà la radioactivitat associada als diferents fosfolípids.

1.8 El liti no inhibeix la incorporació d'àcid $[^3\text{H}]$ -palmític a fosfolípids

Els fosfolípids sofreixen un continu cicle de desacilació i reacilació per part de l'acció combinada de les fosfolipases A i les aciltransferases, de manera que un alentiment d'aquest cicle es traduiria en una disminució del marcatge dels fosfolípids amb $[^{14}\text{C}]$ -acetat. Per aquest motiu vam estudiar si el tractament amb liti tenia algun efecte sobre la incorporació d'un àcid

gras com el palmític als diferents fosfolípids. Com podem observar a la figura R-11, el tractament amb liti no produeix una alteració important en la incorporació d'acid $[^3\text{H}]$ -palmític als fosfolípids o als lípids neutres. Tot i que per confirmar-ho plenament caldria analitzar altres àcids grassos, aquest experiment sembla indicar que la reducció en el marcatge dels fosfolípids amb $[^{14}\text{C}]$ -acetat produïda pel liti no es deu a un alentiment del cicle d'acilació i desacilació dels fosfolípids.

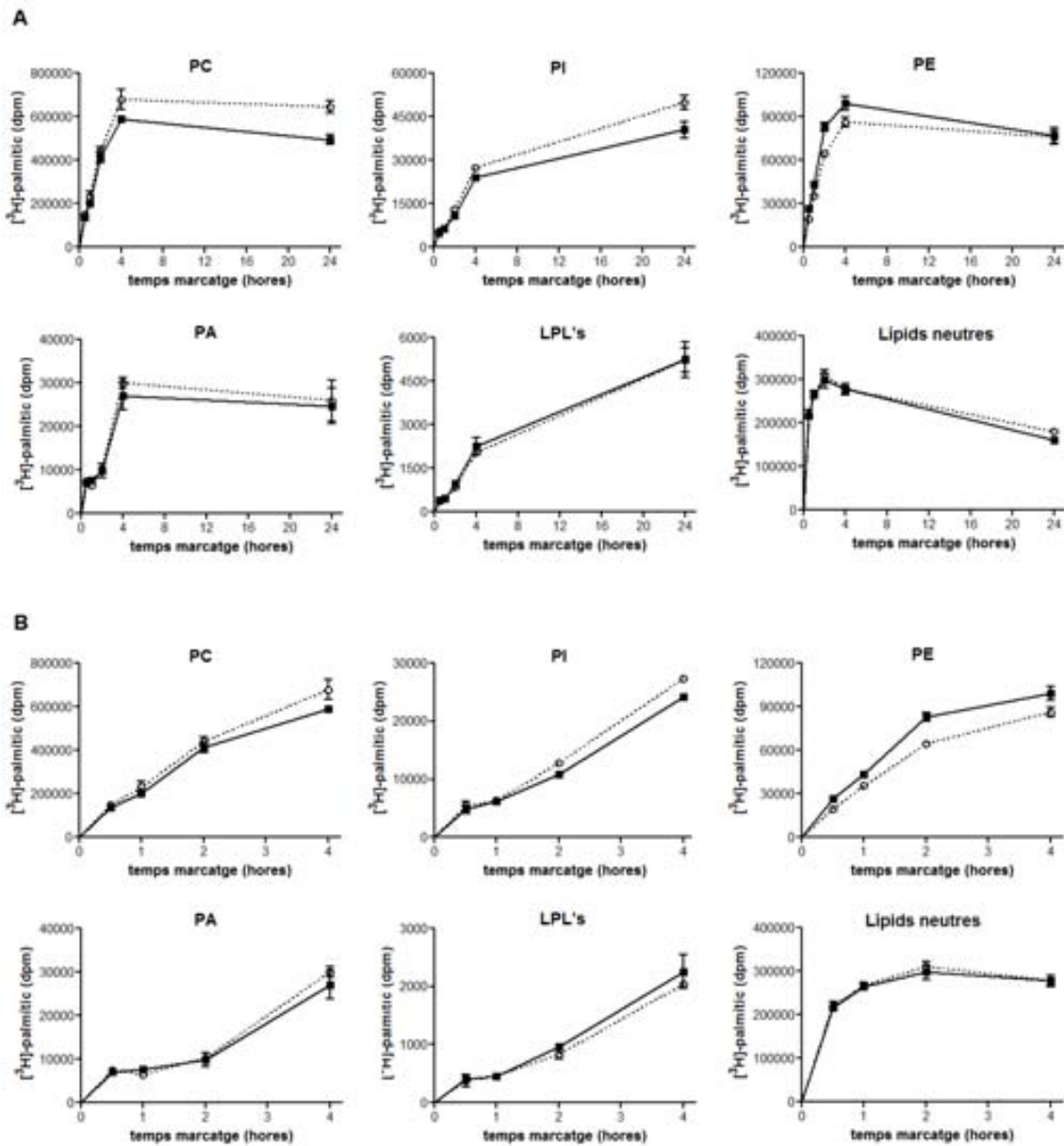


Figura R-11. El liti no inhibeix la incorporació de $[^3\text{H}]$ -Palmític a fosfolípids. Els astròcits sembrats en plaques de 24 pouets van ser incubats en DMEM + 0.5% d'FBS durant 8 dies, en presència de DMSO (■) i LiCl (5mM) (○) durant els darrers 7 dies d'incubació. Passat aquest temps es van marcar amb 1 μCi /pouet d'acid $[^3\text{H}]$ -Palmític i als temps indicats es van extreure els lípids cel·lulars (unint el contingut de 3 pouets per cada punt), es separaren per TLC i es mesurà la radioactivitat associada als diferents fosfolípids. Les dades representen la mitja de dos punts \pm s.e.m. d'un experiment representatiu de 3 experiments independents.

Si la incorporació d'àcids grassos a fosfolípids no es veu afectada pel liti, és probable que la reducció observada en la incorporació de [¹⁴C]-acetat a PC es degui a la inhibició de la síntesi *de novo* d'àcids grassos.

1.9 El liti inhibeix la incorporació de [¹⁴C]-acetat a lípids neutres

La fase mòbil emprada per separar els fosfolípids deixa en un mateix punt els diferents lípids neutres, que també queden marcats amb [¹⁴C]-acetat. La quantificació de la radioactivitat associada a aquests lípids mostra que el liti també hi té un efecte inhibitori (Figura R-9), cosa que ens va decidir a realitzar nous experiments de marcatge amb [¹⁴C]-acetat, separant aquesta vegada els lípids neutres. Altra vegada podem observar com la major part del [¹⁴C]-acetat s'incorpora als fosfolípids, que presenten un menor grau de marcatge en els astròcits tractats amb liti (Figura R-12). El colesterol és el següent compost amb més marcatge, i també en aquest cas el liti hi produeix un efecte inhibitori, tal com també passa amb els àcids grassos però no amb els triglicèrids i els ésters de colesterol, que presenten uns nivells de marcatge superiors en els astròcits tractats amb liti (Figura R-12).

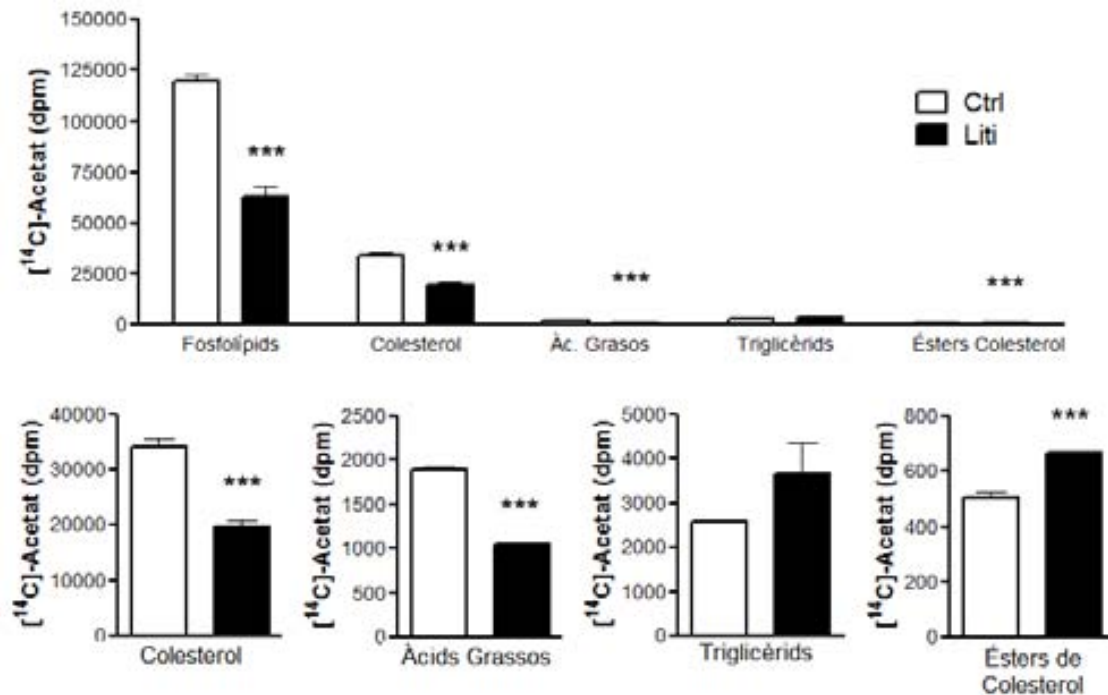


Figura R-12. Efecte del liti sobre la incorporació de [¹⁴C]-Acetat als lípids neutres. Els astròcits secundaris es van mantenir durant 8 dies en DMEM + 0.5 % d'FBS en plaques de 6 pouets, amb els darrers 7 dies en presència o absència de LiCl (5 mM). Seguidament se'ls va addicionar 2 μCi/pouet de [¹⁴C]-Acetat i es van incubar durant 4 hores. Els extractes lipídics es van separar per TLC, amb una fase mòbil formada per hexà:éter etíl·lic:àcid acètic (70:30:1). Els valors respresenten la mitjana i s.e.m. de 3 experiments, on cada punt es va analitzà per triplicat (****p*<0.001, liti vs control)..

Així doncs, podem concloure que el tractament amb liti inhibeix la síntesi *de novo* d'àcids grassos i de colesterol en cultius d'astròcits. Si bé podria ser interessant continuar la caracterització d'aquest fenomen, vam decidir deixar aquesta línia d'investigació en un segon terme i continuar investigant les alteracions produïdes pel liti en el metabolisme de la PC.

1.10 El medi condicionat per astròcits pretractats amb liti estimula la síntesi de fosfatidilcolina

Amb els experiments de marcatge amb [32 P]-P_i hem comprovat que per conservar l'efecte del liti sobre la síntesi de PC, és necessari que en el moment de realitzar el marcatge metabòlic es mantingui el medi de cultiu on s'ha incubat els astròcits durant el tractament amb liti (Figures R-8 i R-13B). Aquest resultat inesperat ens va fer pensar que els astròcits tractats amb liti provocaven una sèrie de modificacions en la composició del seu medi de cultiu, i que aquestes eren necessàries per a l'estimulació observada en la síntesi de PC. Per aquest motiu vam realitzar una sèrie d'experiments per comprovar si amb la incubació dels astròcits amb medi condicionat per altres astròcits, tractats o no amb liti, es produïen canvis en la síntesi de PC (Figura R-13A). Es va prendre el medi de cultiu d'astròcits control o tractats amb LiCl durant 7 dies i, un cop recollit, es va addicionar LiCl al medi condicionat dels astròcits control per tal que la [LiCl] d'ambdós medis fos la mateixa (5 mM). D'aquesta manera les úniques diferències entre ambdós medis condicionats serien aquelles originades durant el període d'incubació amb els astròcits en presència o absència de liti. Aquest medi es va addicionar a astròcits control incubats en paral·lel, i després d'una hora d'incubació s'hi va mesurar la velocitat de síntesi de PC. A la figura R-13C es mostra com tot i que en ambdós tractaments els astròcits són sotmesos a la mateixa concentració de liti, el tractament agut dels astròcits amb medi que prèviament ha estat condicionat per astròcits tractats amb liti, produeix un increment en la velocitat de síntesi de PC superior al que té lloc amb el medi procedent d'astròcits control.

A partir d'aquest tipus d'experiments, vam hipotetitzar que possiblement els astròcits tractats amb liti alliberen una quantitat superior d'algun factor soluble al medi de cultiu que estimula paracrinament la via de síntesi de PC. Que els astròcits responguin al tractament amb liti variant l'alliberació d'alguna molècula de senyalització tindria implicacions que van més enllà de la simple explicació del fenomen experimental que havíem observat al voltant de la síntesi de PC, ja que, sabent que els astròcits poden modular l'activitat neuronal mitjançant

l'alliberació de senyals químics (revisat a Halassa et al., 2007), una alteració en aquest procés podria relacionar-se amb el seu mecanisme terapèutic.

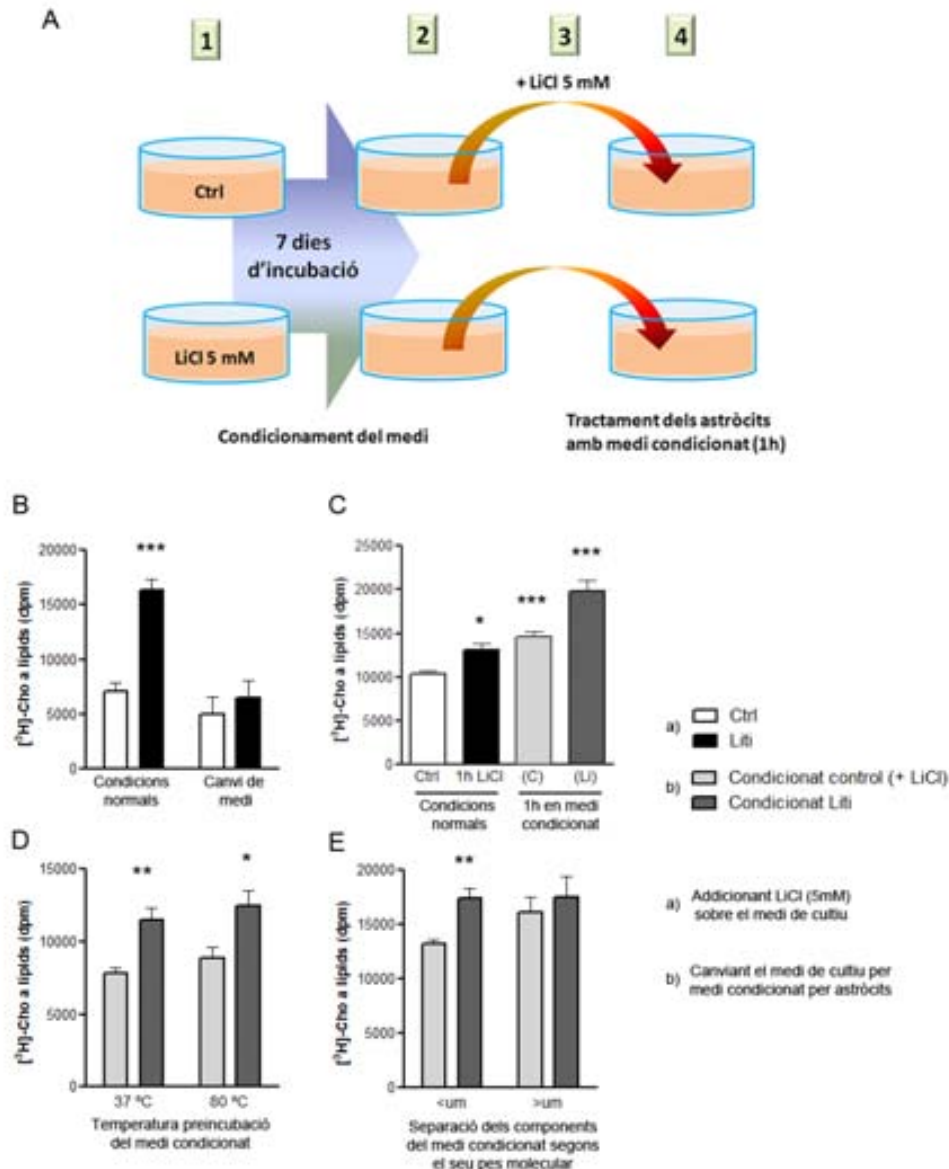


Figura R-13. El medi condicionat per astròcits tractats amb liti estimula la síntesi de fosfatidilcolina. A) Esquema dels experiments amb medi condicionat. 1) Els astròcits es tracten durant 7 dies amb LiCl (5mM), i passat el temps se'n recull el medi condicionat (2). 3) Igualar la [LiCl] dels medis condicionats control i liti afegint LiCl (5mM) al medi control. 4) Es tracten astròcits control amb els medis condicionats durant 1 hora i se'ls addiciona 0.25 μ Ci/pouet de [3 H]-Cho per tal de mesurar-ne la seva incorporació a lípids. B) Els astròcits van ser tractats durant 7 dies amb LiCl (condicions normals), i una hora abans del marcatge amb [3 H]-Cho se'ls va canviar el medi per DMEM (0.5% FBS) (Canvi de medi), restituint el LiCl en els pous que els correspongués. C) Incorporació de colina a lípids en astròcits control (\square), tractats durant 1 hora amb LiCl (5 mM) (\blacksquare), i tractats durant una hora amb medi condicionat provinent d'astròcits control (\blacksquare), o tractats amb liti (\blacksquare), tal com s'indica a l'apartat A. D) Experiment amb medi condicionat anàleg a (C), on es compara l'efecte del medi condicionat incubat durant 1 hora a 37 i a 80 °C abans de ser emprat per tractar les cèl·lules (a 37 °C). E) Abans de ser emprat per tractar les cèl·lules, el medi condicionat va ser filtrat pel sistema Centricon (Millipore) per tal de separar-ne els components de menys de 30 kDa dels de major pes molecular, que van ser diluïts en medi nou per tal de ser addicionats als astròcits seguint l'esquema de (A). Es mostra la mitjana i s.e.m. de 3 experiments, on cada punt s'analitzà per quadruplicat (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, respecte al control).

Els astròcits poden alliberar al medi extracel·lular un gran nombre de molècules senyalitzadores, i és factible que el tractament amb liti modifiqui els nivells d'alguna d'elles. Per aprofundir en la naturalesa química d'aquesta hipotètica molècula senyalitzadora que activa la síntesi de PC, vam realitzar experiments equivalents als anteriors, però amb la particularitat que s'aplicaren diversos tractaments al medi condicionat abans d'addicionar-lo als astròcits. A la figura R-13D podem observar com la preincubació del medi condicionat a 80 °C durant 1 hora, no afecta la seva capacitat d'estimular la síntesi de PC, de manera que el factor que cercàvem no seria sensible a aquest tractament tèrmic. En un altre experiment, es va filtrar el medi condicionat per tal de separar els components de baix pes molecular dels d'elevat pes molecular. Comparant l'efecte de l'addició d'ambdues fraccions del medi condicionat, podem comprovar com les diferències entre els medis condicionats provinents d'astròcits controls o d'astròcits tractats amb liti es deuen a la fracció de baix pes molecular del medi condicionat (Figura R-13E). El filtre emprat per aquest experiment és permeable als components de fins a 30 kDa (Centricon, Millipore), de manera que el factor responsable d'aquest efecte hauria de tenir un pes molecular inferior a aquest valor. Tot i això, els candidats continuaven essent múltiples: NO, aminoàcids, icosanoids, neurotransmissors, purines, proteïnes de baix pes molecular, etc. De totes maneres, abans d'aprofundir en la naturalesa d'aquest hipotètic factor que alliberen els astròcits en resposta al liti, se'ns va acudir una teoria alternativa per explicar els resultats que havíem obtingut.

1.11 Produeix el tractament amb liti una depleció de colina al medi de cultiu?

Dels resultats anteriors podem deduir que el tractament agut amb liti incrementa l'activitat CCT, fet que provoca un augment global en la velocitat de la ruta de Kennedy (Figura R-6). Aquesta via metabòlica s'inicia amb la fosforilació de la colina (Cho), una molècula que no pot ser sintetitzada pels astròcits i que per tant provindrà bàsicament de la hidròlisi de la PC existent i de la recaptació de Cho exògena. Aquesta recaptació té lloc a través de transportadors de Cho que poden ser regulats segons les necessitats de la cèl·lula (revisat a Michel et al., 2006).

Si sumem la contribució dels diversos metabòlits de Cho marcats en l'experiment de la figura R-4, comprovem que el liti produeix un augment en la quantitat total de [³H]-Cho recaptada per la cèl·lula. Si aquest augment no es veu compensat per una major alliberació de Cho al medi extracel·lular, el medi dels astròcits tractats amb liti anirà perdent Cho a una velocitat

superior a la dels control. La importància d'aquest fet dependrà de si els astròcits d'una placa de cultiu poden reduir significativament la [Cho] del medi. Si el consum de Cho és prou gran en relació al total present a cada pouet, i els astròcits tractats amb liti en recapten una major quantitat, és probable que al llarg del temps la [Cho] del medi dels astròcits tractats amb liti sigui inferior a la dels astròcits control. Aquest fet significaria que en el moment de realitzar el marcatge amb [³H]-Cho, la proporció de Cho marcada respecte la Cho total en el medi de cultiu, seria superior en els astròcits tractats amb liti, de manera que es produiria un artefacte experimental que es traduiria en una major recaptació de [³H]-Cho i una major proporció de molècules radioactives en tots els compostos que contenen colina (Figura R-14A).

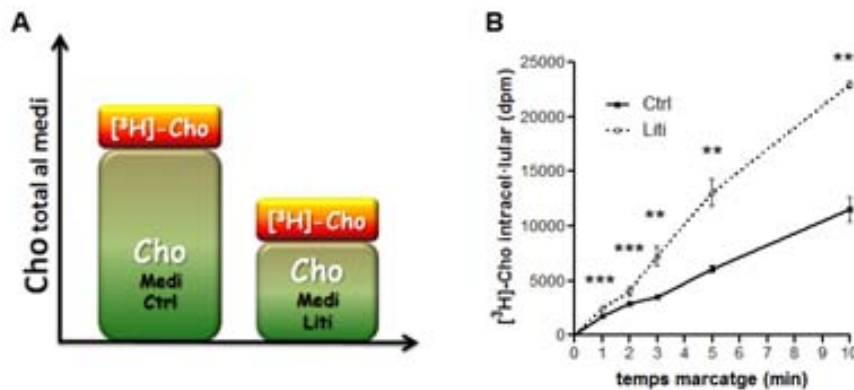


Figura R-14. Hipòtesi de la depleció de colina del medi. A) Si els astròcits tractats amb liti consumeixen més Cho que els control, a mesura que passi el temps la [Cho] del medi dels tractats amb liti serà inferior a la dels controls. Si aquesta disminució és prou significativa, en addicionar-hi la [³H]-Cho la proporció de Cho marcada respecte al total serà superior en els astròcits tractats amb liti, fet que es traduirà en un increment artefactual en el marcatge dels diferents metabòlits de colina, i que podria explicar el major increment en la velocitat de síntesi de PC a temps llargs de pretractament amb liti. B) Determinació de la incorporació de [³H]-Cho en astròcits tractats o no durant 7 dies amb LiCl (5 mM). Passats els temps indicats de marcatge amb 1 μCi/pouet de [³H]-Cho es recolliren els metabòlits de Cho intracel·lulars en cloroform:metanol (1:2) i se'n mesurà la radioactivitat. Es mostra un experiment representatiu de tres experiments independents, amb la mitjana i s.e.m. de cada punt mesurat per quadruplicat (***p*<0.01, ****p*<0.001, liti vs control).

Vam decidir analitzar els medis condicionats per comprovar si s'hi produïen canvis significatius en la [Cho]. Per fer-ho ens vam posar en contacte amb el Servei d'Anàlisi Química de la UAB, que malauradament ens va donar un temps d'espera superior a mig any. Conscients que la possibilitat d'estar davant d'un artefacte experimental no ens podia fer esperar tant, vam decidir realitzar altres aproximacions experimentals per comprovar si es confirmava aquesta hipòtesi. En primer lloc vam decidir mesurar si en els astròcits tractats amb liti s'hi produïa un increment en la incorporació de [³H]-Cho. I tal com es mostra a la figura R-14B, els astròcits tractats amb liti incorporen més [³H]-Cho del medi que els astròcits control.

Un protocol experimental per comprovar si l'increment en la incorporació de [³H]-Cho a la cèl·lula es deu a una menor [Cho] al medi de cultiu dels astròcits tractats amb liti, és

complementar el medi amb una quantitat considerable de colina freda just abans de realitzar-hi el marcatge radioactiu. D'aquesta manera s'aconsegueix reduir les diferències relatives entre la [Cho] dels astròcits control i tractats amb liti, i si l'efecte del liti és degut a aquestes diferències, s'hauria de veure significativament reduït (Figura R-15A). La [Cho] inicial del medi de cultiu emprat és de $28.7 \mu\text{M}$ (DMEM D5796, Sigma), per la qual cosa vam decidir complementar-la amb una dosi extra de Cho de $50 \mu\text{M}$ en el moment d'afegir-hi la $[^3\text{H}]$ -Cho.

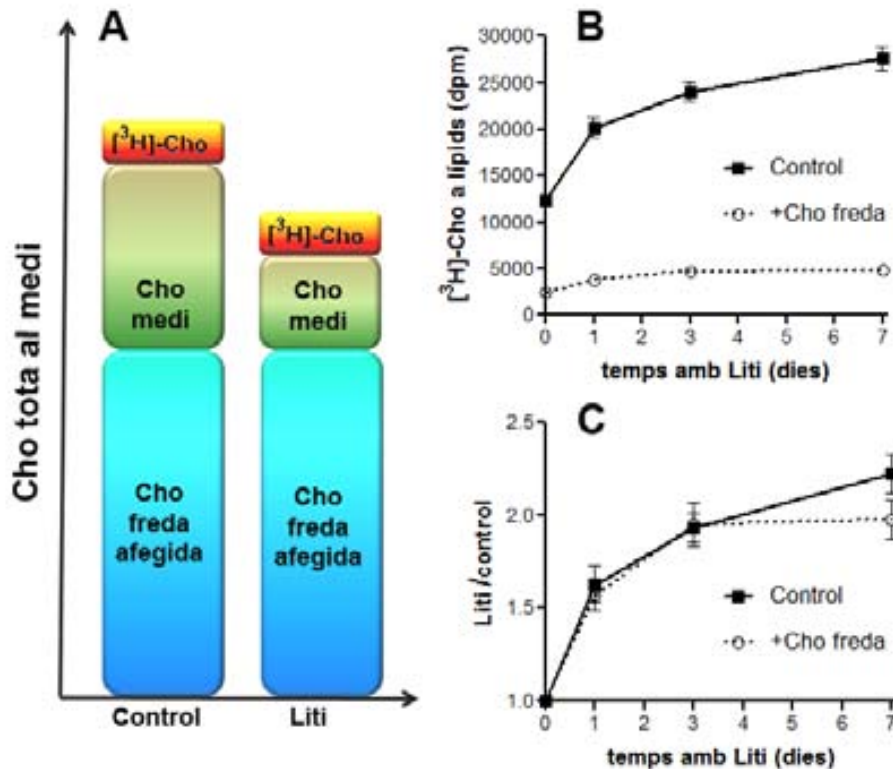


Figura R-15. Cho freda. A) Representació de la colina total que conté el medi de cultiu. Si els pouets tractats amb liti contenen una [Cho] inferior als controls, la relació $[^3\text{H}]\text{-Cho}/\text{Cho}_{\text{total}}$ augmentarà, produint una major incorporació del precursor marcat a la cèl·lula i a la PC. Afegint al medi una quantitat elevada de colina freda just abans de realitzar el marcatge, es reduiran les diferències en la relació $[^3\text{H}]\text{-Cho}/\text{Cho}_{\text{total}}$ entre astròcits control i tractats amb liti. B) Incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids en astròcits arrestats en DMEM + 0.5 % d'FBS i tractats durant els temps indicats amb LiCl (5 mM), en condicions normals (■), o amb l'addició de Cho freda ($50 \mu\text{M}$) (○). C) Representació de les dades de (B) com a increment relatiu en la incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids provocat pel liti en presència o absència d'un excés de Cho freda. Els valors representen la mitjana i s.e.m. de 4 experiments, on cada punt es reproduïa per quadruplicat.

Tal com era d'esperar, l'addició de colina freda al medi provoca una gran disminució en la incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids (Figura R-15B). Ara bé, en calcular l'efecte relatiu del tractament amb liti (Figura R-16C), veiem que aquest pràcticament no es veu afectat per l'addició de Cho, i només el darrer punt, als 7 dies de pretractament amb liti, es mostra significativament reduït en els astròcits complementats amb Cho freda. Aquests experiments indiquen que si bé l'efecte observat en la incorporació de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$ a lípids a temps llargs de

pretractament amb liti, podria estar parcialment sobredimensionat per una diferència en les [Cho] dels medis de cultiu en el moment de realitzar el marcatge, la contribució d'aquest artefacte experimental no seria suficient per explicar perquè a temps de pretractament llargs s'observa un efecte superior que amb el tractament agut amb liti.

Finalment vam poder enviar les mostres de medi condicionat per tal d'analitzar-ne la seva [Cho]. L'informe del servei d'anàlisis químiques ens informava que la baixa concentració d'aquest compost i la complexitat química del medi condicionat havien dificultat en gran mesura l'anàlisi, i que per altra banda, els medis amb liti presentaven un menor percentatge de recuperació de l'analit que els medis control. Per aquest motiu recomanaven realitzar nous anàlisis amb mostres fortificades i estàndards interns. En aquell moment ja havíem realitzat altres aproximacions al problema, per la qual cosa vam decidir no invertir més temps i diners en aquests anàlisis. Tot i això vam rebre els resultats preliminars que havien obtingut, que si bé han de ser interpretats com a resultats orientatius, indiquen que la [Cho] del medi de cultiu es veu reduïda de manera considerable durant els dies d'incubació amb els astròcits, i que tal com temíem, la colina dels pouets tractats amb liti es consumeix més ràpidament que la dels pouets control (Figura R-16A). La concentració de colina tritiada que adicionem al medi de cultiu per realitzar els marcatges és molt menor a la concentració de Cho freda del medi (Taula R-2), de manera que qualsevol canvi significatiu en la [Cho]_{freda} del medi resultarà en un canvi significatiu en el percentatge de [³H]-Cho respecte a la Cho total.

<u>[³H]-Cho adicionada als pouets</u>			<u>DMEM</u>	<u>3d Liti</u>	<u>3d Liti</u>	<u>7d Ctrl</u>	<u>7d Liti</u>
			[Cho] _{freda}				
[³ H]-Cho /pou	Activitat específica	[³ H]-Cho /pou	28,7 μM	~18 μM	~14 μM	~10 μM	~7 μM
			[[³ H]-Cho] respecte [Cho] _{total}				
0.25 μCi	83 Ci/mmol	6 nM	0.021 %	0.033 %	0.043 %	0.060 %	0.086 %
			$\frac{(\% \text{ liti})}{(\% \text{ ctrl})}$		1.3		1.4

Taula R-1. Depleció de colina en els medis de cultiu. Els resultats preliminars de l'anàlisi de colina del medi mostren una reducció important en les [Cho] durant el període d'incubació amb els astròcits, que resulta superior en els astròcits tractats amb liti. Tenint en compte que la quantitat de [³H]-Cho adiciona per pou és molt reduïda (6 nM), el percentatge de Cho marcada respecte al total només dependrà de la [Cho] freda del medi. Si els valors de [Cho] mesurats fossin correctes, significaria que en el moment de fer el marcatge els astròcits tractats amb liti recaptarien per cada mol de Cho, 1.3 vegades (als 3 dies) i 1.4 vegades (als 7 dies) més de [³H]-Cho que els control, fet que interferiria en la mesura correcta de la velocitat de síntesi de PC.

Així doncs, és possible que el tractament amb liti produeixi un increment en la captació de colina extracel·lular que provoqui una progressiva disminució de la seva concentració en el medi de cultiu. Això podria explicar perquè a mesura que augmentem el temps de pretractament amb liti, augmenta la incorporació de colina tritiada a lípids (Figura R-1).

Ara bé, els resultats obtinguts amb l'addició de colina freda abans del marcatge amb [^3H]-Cho (Figura R-15), ens fan pensar que aquest fenomen no és suficient per explicar l'efecte sobre la incorporació de [^3H]-Cho a lípids a temps llargs de tractament amb liti (>1 dia). Per altra banda, si representem les dades de la figura R-1 de manera proporcional al temps d'incubació amb liti (Figura R-16B), observem com el resultat obtingut recorda al d'un assaig d'unió a receptor, on la corba que relaciona la quantitat de lligand unit amb la seva concentració consta de dues components: la unió específica, de comportament hiperbòlic, i la unió inespecífica, de comportament lineal. En el nostre cas, també sembla que l'efecte consti d'una component lineal, que es manifesta clarament a temps llargs de pretractament amb liti, i que podria ser deguda a la progressiva disminució de la concentració de colina del medi de cultiu, i una altra de tipus hiperbòlic, amb un efecte màxim al que pràcticament ja s'arriba a partir de les 24 hores de pretractament amb liti, i que multiplica per ~2.5 la incorporació de [^3H]-Cho a lípids.

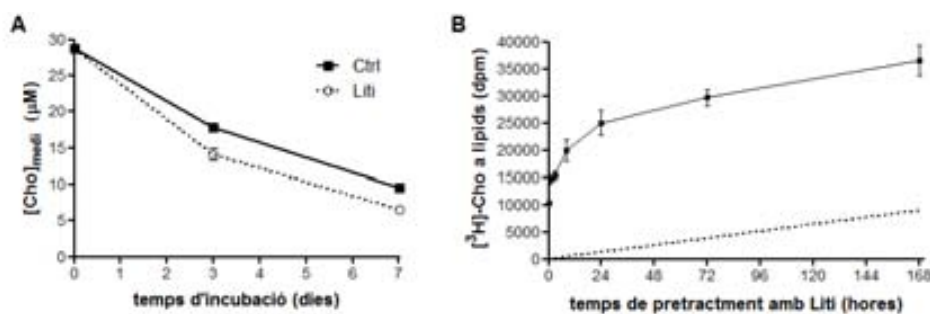


Figura R-16. El tractament amb liti redueix la [Cho] del medi de cultiu. A) Anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS) de la Cho continguda en el medi de cultiu dels astròcits. Els astròcits es van sembrar en plaques de 150 mm a cèls/ml i en arribar a la confluència se'ls va canviar el medi per DMEM amb un 0.5% d'FBS. Passades 24 hores se'ls tractà o no amb LiCl (5 mM) i se'ls deixà en incubació durant els temps indicats, moment en què es prengué en medi de cultiu per tal d'analitzar-lo. B) Representació a escala temporal de la figura R-1A, on s'observa que l'efecte del temps de pretractament amb liti sobre la síntesi de PC, mostra un comportament que recorda la suma d'una component hiperbòlica i una component lineal (representada amb la línia de punts). Es mostra la mitjana i s.e.m. de tres determinacions d'una única mostra per cada tractament.

Un altre punt a tenir en compte és que els experiments de marcatge amb [^{32}P]- P_i , que no s'han de veure afectats per canvis en la [Cho] del medi, mostren un efecte similar als obtinguts amb [^3H]-Cho (Figura R-8D i 8E).

Amb aquests resultats concloem que si bé existeix una diferència en el consum de colina extracel·lular que contribueix en augmentar l'efecte del liti sobre la incorporació de [³H]-Cho a lípids, aquest fenomen no és suficient per justificar per si sol que amb temps de tractament amb liti superiors a 1 dia es produeixi un increment en la síntesi de PC molt superior al que s'observa amb el tractament agut.

1.12 Els canvis de medi de cultiu augmenten l'activitat CCT dels astròcits

Si acceptem que la depleció de colina extracel·lular no és suficient per explicar l'efecte del pretractament crònic amb liti sobre la incorporació de [³H]-Cho a lípids, queda pendent l'explicació de la pèrdua de l'efecte en canviar el medi de cultiu dels astròcits moments abans d'addicionar-hi el precursor marcat. Per estudiar què succeeix amb aquest canvi de medi, vam realitzar un experiment de marcatge amb [³H]-Cho per seguir com evolucionen els metabòlits de la ruta de Kennedy en substituir el medi de cultiu dels astròcits. A la figura R-17A s'observa com, tant en els astròcits tractats amb liti com als controls, el fet de canviar-los el medi de cultiu als 60 minuts de marcatge provoca un increment en la quantitat de [³H]-PC i una disminució en la de [³H]-P-Cho, indicant que s'ha produït una estimulació de l'activitat CCT. Aquest fet ens suggereix que en sotmetre els astròcits a un canvi del medi de cultiu es crea una pertorbació en la ruta de Kennedy que emmascara els efectes del pretractament amb liti.

L'anàlisi de l'estat de la via de senyalització d'ERK1/2 en resposta a un canvi del medi de cultiu ens permet fer-nos una idea de l'abast d'aquesta pertorbació. A la figura R-17B podem observar com els astròcits tractats amb LiCl (5 mM) durant 3 o 7 dies, i incubats en DMEM al 0.5% d'FBS, presenten un grau d'activació similar de la via d'ERK1/2 (carrils 6, 7 i 8). Si als mateixos astròcits se'ls canvia el medi per DMEM al 10% d'FBS (carril 1), es produeix una forta activació d'aquesta ruta, però sorprenentment, el canvi de medi per DMEM al 0% d'FBS també activa la via d'ERK1/2 (carril 2). Per tant, l'addició de medi nou, tingui o no FBS, produeix una activació de la cascada d'ERK1/2. Si el canvi de medi no es realitza amb DMEM nou sinó amb medi condicionat, idèntic al que es troba als astròcits dels carrils 6, 7 i 8, els astròcits també responen amb una activació de la via d'ERK1/2 (carrils 3,4 i 5). Aquest experiment indica que el simple fet de canviar el medi de cultiu als astròcits, encara que sigui substituït per un medi idèntic (condicionat) al que ja tenien, produeix una alteració en vies de senyalització essencials per al control de la fisiologia de la cèl·lula. Aquest tipus de pertorbacions han de ser tingudes en compte a l'hora de dissenyar i interpretar experiments on

es realitzen canvis del medi de cultiu posteriors al tractament que s'estudia, i podrien explicar perquè l'efecte del pretractament amb liti es veu afectat per la realització d'un canvi del medi de cultiu previ al marcatge metabòlic.

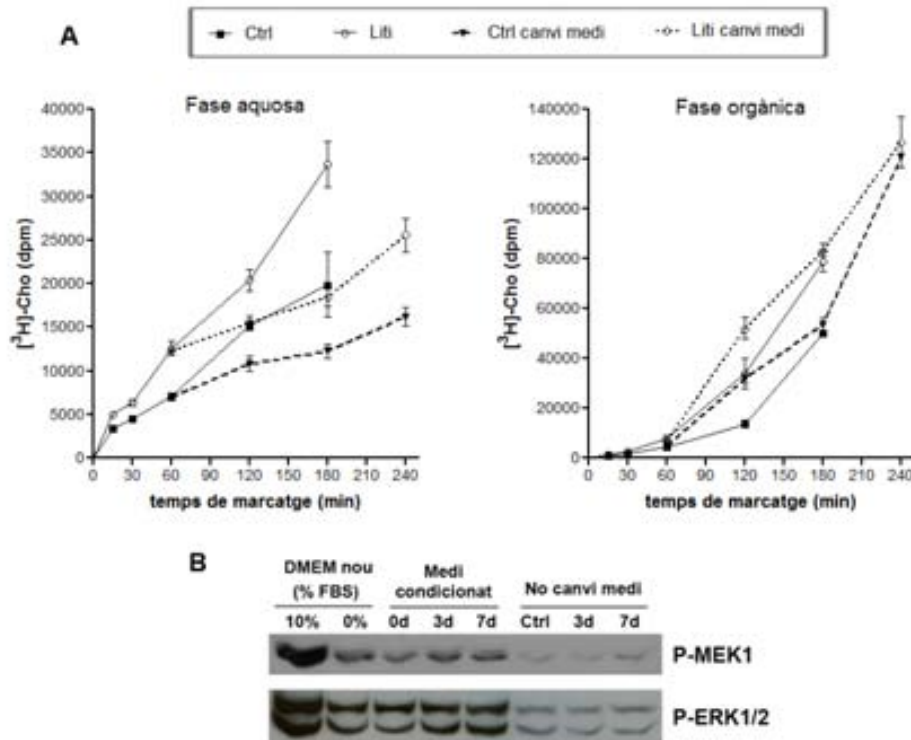


Figura R-18. La CCT dels astròcits s'activa en canviar-los el medi de cultiu. A) Es van marcar els astròcits, pretractats (\circ) o no (\blacksquare) durant 7 dies amb LiCl (5 mM), amb 0.25 μ Ci/pouet de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$. En alguns pouets, als 60 minuts de marcatge se'ls va canviar el medi per medi nou (DMEM + 0.5 % FBS) amb la mateixa concentració de LiCl i de $[^3\text{H}]\text{-Cho}$. Passats els temps indicats, es realitzà l'extracció líquid-líquid dels components cel·lulars i es va mesurar la radioactivitat de les fases orgànica ($\sim [^3\text{H}]\text{-PC}$) i aquosa ($\sim [^3\text{H}]\text{-P-Cho}$). En els astròcits on s'ha canviat el medi (línies discontinúes) s'hi produeix una disminució en la radioactivitat de la fase aquosa i un increment en la de la fase orgànica, fet que indica que s'està incrementant la CCT. Les dades representen la mitjana de 3 punts \pm s.e.m. d'un experiment representatiu de 2 experiments independents. B) Grau de fosforilació de MEK i ERK1/2 en astròcits tractats durant 30 minuts amb DMEM nou al 10% (carril 1) i 0% (carril 2) d'FBS; o amb medi condicionat per astròcits control o tractats amb LiCl 5 mM durant 3 o 7 dies (carrils 3, 4 i 5); o astròcits tractats amb liti durant 3 o 7 dies i mantinguts en el mateix medi de cultiu (DMEM al 0.5% d'FBS) (carrils 6, 7 i 8). Es mostra un resultat representatiu de dos experiments independents, amb la mitjana i s.e.m. de cada punt mesurat per triplicat.

1.13 Comparativa dels efectes del liti, el valproat i la carbamazepina sobre la síntesi de fosfolípids

L'estudi del mecanisme molecular pel que el liti altera el metabolisme de la PC havia estat resultant molt més complex del que vam creure en iniciar aquest projecte. La comprensió d'aquest fenomen requeria uns esforços econòmics i temporals notables, motiu pel qual ens vam haver de preguntar per la conveniència de continuar per aquesta línia d'investigació. Els nostres resultats al voltant del liti i els fosfolípids serien importants en tant que contribuïssin a

aclarir les seves propietats citoprotectores, o encara millor, que es mostressin relacionats amb el seu mecanisme terapèutic. El mecanisme molecular dels fàrmacs emprats en el tractament dels trastorns bipolars continua sent desconegut, però una de les principals estratègies que es segueixen per tal de trobar-lo és identificar quins efectes comuns presenten els diferents fàrmacs emprats (revisat a Hardwood i Agam, 2003). És per aquest motiu que abans d'aventurar-nos en nous experiments al voltant dels efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids, vam volen analitzar si aquests eren reproduïts per algun altre dels fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim.

Anteriorment ja s'havien descrit alguns efectes comuns del liti, el valproat i la carbamazepina (revisat a Williams et al., 2002; Hertz et al., 2004), de manera que vam voler comparar els efectes d'aquestes tres substàncies sobre la incorporació de [32 P]-P_i als diferents fosfolípids. Als panells de la dreta de la figura R-18, que mostren les 4 primeres hores de marcatge amb [32 P]-P_i en astròcits tractats amb liti, valproat o carbamazepina, hi podem observar que la PC és el fosfolípid que es veu més afectat pel pretractament dels astròcits amb els diferents fàrmacs. Malauradament l'efecte que hi produeixen el valproat i la carbamazepina és de signe contrari al que té lloc amb liti, és a dir, redueixen la incorporació de [32 P]-P_i a PC. En canvi els tres fàrmacs coincideixen en l'efecte sobre el PI, amb una disminució en el seu marcatge que si bé és un efecte més lleu que el mesurat en la PC, cal tenir-lo molt present si tenim en compte la controvèrsia existent al voltant de la capacitat dels estabilitzadors de l'estat d'ànim d'afectar la síntesi de fosfoinosítids (Berry et al., 2004). Pel que fa a la PE, el liti hi exerceix un notable efecte inhibitori que també es dona, tot i que en menor grau, en els astròcits tractats amb valproat. Finalment pel PA, el marcatge és molt feble i tenint en compte que la seva separació de la PE per TLC no era perfecta cal analitzar les dades amb prudència, però semblaria que el valproat hi té un efecte reductor mentre que no s'observa un efecte clar per la carbamazepina i el liti.

Si portem el marcatge fins a les 24 hores, on les vies de síntesi i degradació de fosfolípids ja hauran arribat a l'estat estacionari pel que fa al [32 P]-P_i, podem comprovar si els efectes observats es tradueixen en una progressiva acumulació o reducció dels nivells totals de cada fosfolípid. Pel que fa al liti, veiem que a diferència del que passa a temps més curts, el pendent entre els punts 4 i 24 hores és igual pels controls i pels tractats, tant pel que fa a la PC com a la PE, que es veu inhibida pel liti, fet que indica que l'increment o la disminució en la velocitat d'incorporació de [32 P]-P_i al fosfolípid, es veu compensat per un increment o disminució en la seva velocitat de degradació.

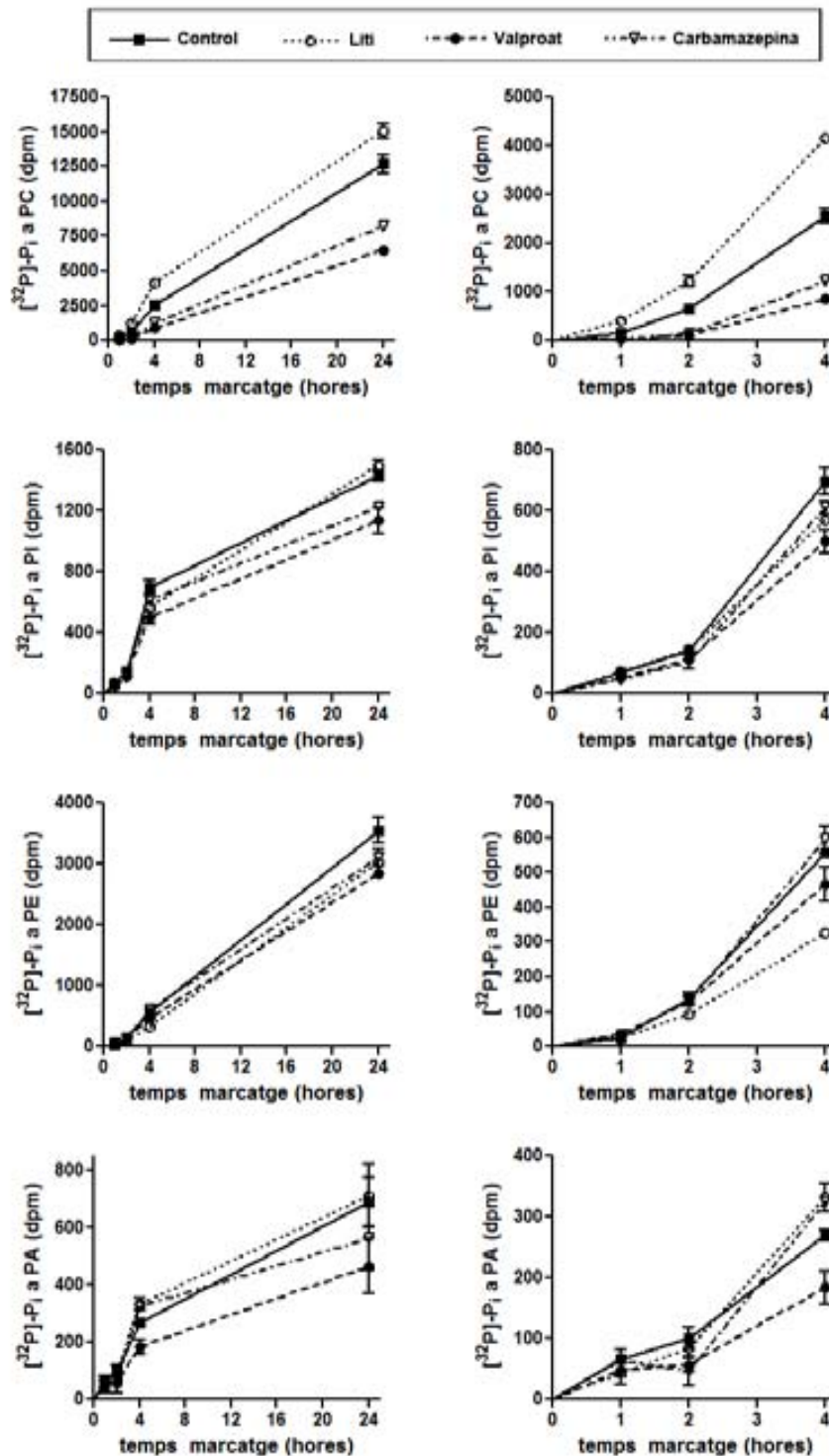


Figura R-18. Els liti, el valproat i la carbamazepina alteren el metabolisme dels fosfolípids. Els astròcits sembrats en plaques de 24 pouets van ser incubats en DMEM + 0.5% d'FBS durant 8 dies, en presència de DMSO (■) i LiCl (5mM) (○), Valproat sòdic (0.5 mM) (●), o Carbamazepina (100 μM) (▽) durant els darrers 7 dies d'incubació. Passat aquest temps es van marcar amb 10 μCi/pouet de $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$ i als temps indicats es van extreure els lípids cel·lular (unint el contingut de 3 pouets per cada punt), es separaren per TLC i es mesurà la radioactivitat associada als diferents fosfolípids. Els panells de la dreta mostren ampliadament les 4 primeres hores de marcatge. Les dades representen la mitja de dos punts \pm s.e.m. d'un experiment representatiu de 3 experiments independents.

Pel que fa al PI, s'observa que la diferència de marca radioactiva entre els astròcits control i els tractats amb liti no només no s'amplia entre les 4 i 24 hores sinó que es va reduint fins al punt que a les 24 hores la quantitat de [^{32}P]-PI dels astròcits control i tractats amb liti és igual o fins i tot superior en aquests darrers. Això podria indicar que tot i que el liti redueix la biosíntesi de PI, també en disminueix el seu catabolisme, de manera que la quantitat total de PI de la cèl·lula no es veuria reduïda pel tractament amb liti, però en canvi algunes vies de senyalització associades a metabòlits derivats del PI es podrien veure atenuades. Ara bé, el ^{32}P s'incorpora al PI a nivell del [^{32}P]-PA, que passa a [^{32}P]-CDP-DAG i posteriorment a [^{32}P]-PI, de manera que aquest increment en el marcatge del PI a temps llargs de marcatge (24h), podria ser degut a un increment en el [^{32}P]-PA format per acció de les PLD sobre la [^{32}P]-PC, que es trobaria incrementada pel tractament amb liti. Per la seva banda, els astròcits tractats amb valproat o carbamazepina, mostren un pendent en les dpm associades al PI entre les 4 i 24 hores equivalent al control, de manera que el seu efecte inhibitori sobre la síntesi de PI també es veuria compensat per la menor velocitat de consum d'aquest fosfolípid. En canvi, els nivells de PC marcada a les 24 hores de marcatge en astròcits tractats amb valproat o carbamazepina són molt inferiors als control, fet que podria indicar que aquests fàrmacs redueixen els nivells de PC cel·lular.

1.14 Connexió entre la síntesi de fosfatidilcolina i de fosfatidilinositol

Havíem comprovat que els efectes del liti no es restringien a la ruta de Kennedy sinó que estaven produint una alteració general en el metabolisme dels fosfolípids. Els diferents fosfolípids estan íntimament relacionats entre ells, i l'alteració d'alguna de les vies del seu metabolisme pot acabar afectant-los a molts nivells, fet que ens va motivar a cercar una explicació unitària pel fenotip que observàvem.

Un dels punts més interessants és que el liti incrementa la ratio *síntesi de PC/síntesi de PI*, un fet que ja s'havia destacat en estudis en llevats tractats amb liti (Ding i Greenberg 2003). Això es podria explicar per un desplaçament general de les rutes de síntesi de fosfolípids cap a les vies dependents de DAG en detriment de les que parteixen del CDP-DAG, tal com es pot deduir de l'esquema de la figura R-19. Segons la hipòtesi de la depleció d'inositol, la inhibició de la IMPasa per part del liti provoca una disminució en els nivells d'inositol, que passen a ser el factor limitant per a la síntesi de PI fins al punt que s'acaba inhibint aquest procés. S'ha descrit que aquesta inhibició de la síntesi de PI per depleció d'inositol es tradueix en una acumulació de l'altre substrat de la PI sintasa, el CDP-DAG (Stubbs i Agranoff, 1993).

Es lògic pensar que la cèl·lula respondrà a l'excés de CDP-DAG frenant la formació de més CDP-DAG a partir de PA, i per tant, afavorint el pas de PA a DAG, és a dir, afavorint les vies de síntesi de fosfolípids de la branca del DAG en detriment de la de CDP-DAG. Un increment en els nivells de DAG afavorirà la síntesi de PC, ja sigui per una major disponibilitat de DAG com a substrat com per l'activació de la CCT pel propi DAG (Slack et al., 1991). D'aquesta manera es podria explicar com la inhibició de la IMPasa pel liti, que disminueix els nivells d'inositol i per tant la síntesi de PI, acaba incrementant la síntesi de PC.

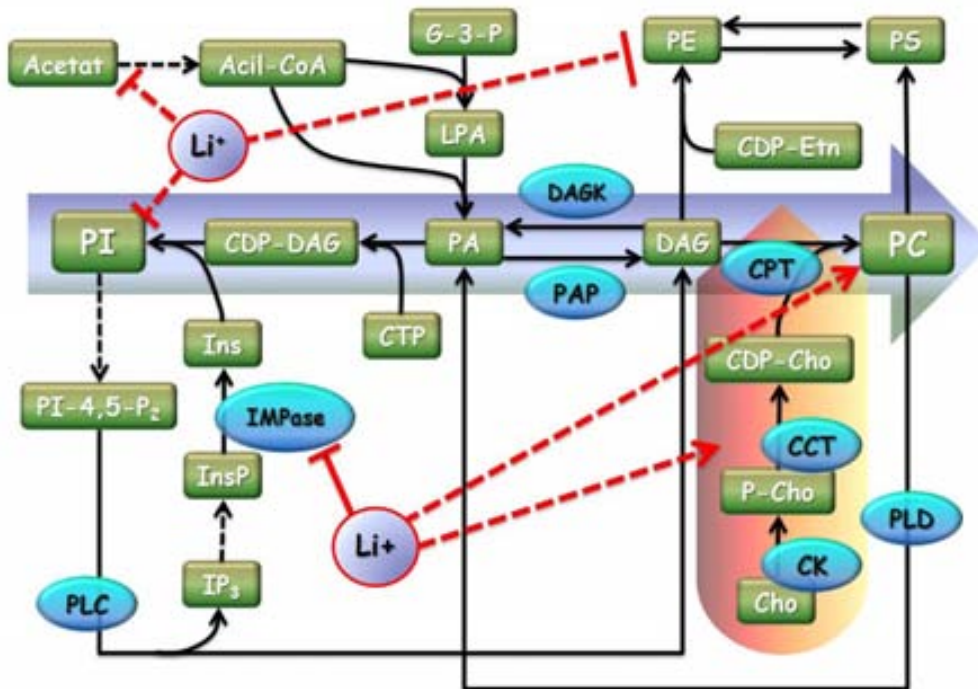


Figura R-19. Principals efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids. Els nostres resultats indiquen que juntament amb la inhibició directa de la IMPasa, el liti augmenta la síntesi de PC per la ruta de Kennedy, mentre que redueix la síntesi de PE i PI, així com la síntesi d'àcids grassos a partir d'acetat. Abreviatures: glicerol-3-fosfat (G-3-P); àcid gras acilat a coenzim A (acil-CoA); àcid lisofosfatídic (LPA); àcid fosfatídic (PA); diacilglicerol (DAG); colina (Cho); fosfocolina (P-Cho); CDP-colina (CDP-Cho); fosfatidilcolina (PC); fosfatidiletanolamina (PE); CDP-etanolamina (CDP-Etn); fosfatidilserina (PS); CDP-diacilglicerol (CDP-DAG); inositol (Ins); fosfatidilinositol (PI); fosfatidilinositol-4-5-bisfosfat (PI-4,5-P₂); inositol-1,4,5-trisfosfat (IP₃); inositol fosfat (InsP); fosfolipasa C (PLC); fosfolipasa D (PLD); inositol monofosfatasa (IMPasa); àcid fosfatídic fosfatasa (PAP); diacilglicerol quinasa (DAGK); colina quinasa (CK); CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT); CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT).

Per estudiar si aquest podia ser el mecanisme d'acció del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids, vam realitzar experiments de marcatge amb [³²P]-P₁ i [¹⁴C]-acetat en astròcits tractats amb liti. Alguns astròcits van ser tractats també amb inositol, per comprovar si amb la seva presència es revertien les alteracions en el metabolisme dels fosfolípids provocades pel liti, fet que indicaria que són degudes a la depleció d'inositol (Figura R-20A). Tal com havíem observat en experiments anteriors, el liti incrementa la síntesi de PC, disminueix la de PI i, simultàniament, redueix la incorporació de [¹⁴C]-acetat a ambdós fosfolípids. L'addició

d'inositol redueix parcialment l'efecte del liti sobre la incorporació de [^{32}P]- P_i a PC, però no modifica la inhibició en la incorporació de [^{14}C]-acetat als fosfolípids. Sorprenentment, l'addició d'inositol no reverteix la inhibició de la síntesi de PI provocada pel liti, és més, la fa més pronunciada en incrementar lleugerament la incorporació de [^{32}P]- P_i a PI en els astròcits control, sense alterar els astròcits tractats amb liti. Aquest fet indicaria que la inhibició de la síntesi de PI provocada pel liti no es deuria a la depleció d'inositol causada per la inhibició de la IMPasa.

Per tal de poder acceptar la nostra hipòtesi de treball, que relaciona la inhibició de la síntesi de PI amb un augment en la de PC, cal que a partir de la mateixa font de PA es pugui sintetitzar tant el CDP-DAG per la síntesi de PI, com el DAG emprat per la síntesi de PC, de manera que es pugui produir una competició entre les vies de síntesi de PI i de PC per als mateixos donadors del seu esquelet alifàtic. Per comprovar-ho, vam voler interferir l'equilibri entre el CDP-DAG, el PA i el DAG inhibint amb propranolol la PAP (Pappu AS, Hauser, 1983), que catalitza la desfosforilació del PA per donar DAG. Si les mateixes molècules de PA poden ser emprades tant per a la síntesi de PI com de PC, el propranolol bloquejarà el flux del PA cap a la formació de DAG i PC, afavorint la branca del CDP-DAG de síntesi de fosfolípids, i per tant incrementant la síntesi de PI. Per altra banda, també vam tractar astròcits amb 1,2-sn-dioctanoilglicerol (DiC8), per tal d'estudiar com responia el sistema a un augment en els nivells de DAG.

A la figura R-20A podem observar com el propranolol, en inhibir la conversió del PA a DAG, afavoreix la síntesi de PI i inhibeix la de PC, tant en astròcits control com en els tractats amb liti. El DiC8, per la seva banda exerceix l'efecte contrari, incrementant la síntesi de PC i inhibint la de PI. El fet que l'increment en la síntesi de PC produït pel DiC8 no es vegi acompanyat d'un increment en el marcatge amb [^{14}C]-acetat, podria indicar que aquest augment es produeix emprant DAG no marcat, com és el cas del propi DiC8 afegit a la cèl·lula, fet que ens podria fer pensar que el DiC8 actua com a substrat de la CPT per tal d'incrementar la síntesi de PC, i que per tant en les nostres condicions en DAG, i no la CDP-Cho, és el factor limitant per a la síntesi de PC. Ara bé, en el marcatge de la PC amb [^{14}C]-acetat, si bé hi ha una contribució de les molècules de [^{14}C]-DAG emprades per a la síntesi de [^{14}C]-PC durant el temps de marcatge, segurament es deu majoritàriament als processos de desacilació/reacilació que sofreix la totalitat de la PC cel·lular, acabada de sintetitzar o no, per la qual cosa, un increment en les vies de síntesi de PC no ha de produir necessàriament un increment important en el marcatge amb [^{14}C]-acetat.

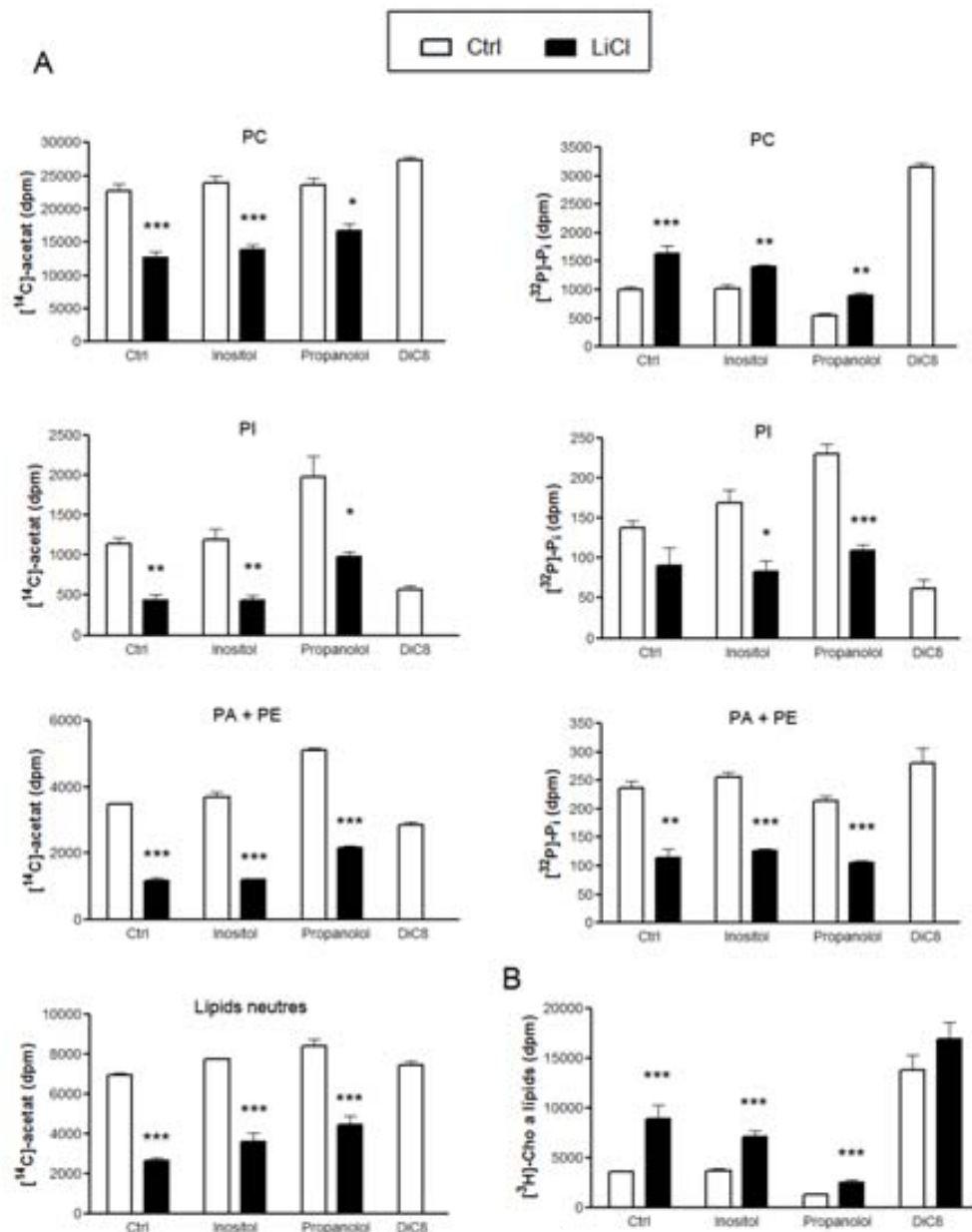


Figura R-20. Connexió entre la síntesi de PC i de PI. A) Els astròcits sembrats en plaques de 24 pouets van ser incubats en DMEM + 0.5% d'FBS durant 7 dies, en presència o no de LiCl (5mM) durant els darrers 3 dies d'incubació. Passat aquest temps alguns pouets es van tractar amb inositol (10 mM), propranolol (60 μ M) o dioctanoilglicerol (DiC8, 25 μ M) i una hora després es van marcar amb 5 μ Ci/pouet de [³²P]-P_i i 1 μ Ci/pouet de [¹⁴C]-acetat. A les quatre hores de marcatge es van extreure els lípids cel·lulars (unint el contingut de 2 pouets per cada punt), es separaren per TLC i es mesurà la radioactivitat associada als diferents fosfolípids. Els panells de la dreta mostren ampliades les 4 primeres hores de marcatge. B) Experiment anàleg a (A) marcant els astròcits amb 0.25 μ Ci/pouet de [³H]-Cho durant 2 hores i mesurant la seva incorporació a fosfolípids. Les dades representen la mitja i la s.e.m de cada punt per quadruplicat d'un experiment representatiu de 3 experiments independents (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, liti vs control).

Per altra banda, si el DiC8 simplement actua com a substrat per a la síntesi de PC, és difícil d'entendre que produeixi una inhibició en la síntesi de PI, ja que a diferència del propranolol, que incrementa els nivells de PA en detriment del DAG, l'addició de DiC8 no hauria de disminuir els nivells de PA i CDP-DAG per a la síntesi de PI. És més, tot i que els àcids grassos del DiC8 no són els que es troben majoritàriament en el PI, que sol contenir àcid esteàric i araquidònic, mitjançant processos de substitució d'àcids grassos la cèl·lula podria emprar el DiC8 exogen per tal de sintetitzar un DAG, PA o CDP-DAG adequat per a la síntesi de PI, de manera que si el DiC8 simplement actués com a substrat, no només no hauria d'inhibir la síntesi de PI sinó que fins i tot podria incrementar-la.

A part de ser un dels substrats per a la síntesi de PC, el DiC8 pot incrementar la velocitat de síntesi d'aquest fosfolípid gràcies a la seva capacitat d'activar la PKC (Capogrossi et al., 1990), fet que augmenta la síntesi de PC (Kiss et al., 1998), o, encara més directament, afavorint la unió a membranes i activació de la pròpia CCT (Slack et al., 1991). D'aquesta manera el DiC8 afavorireix la via de Kennedy, fet que provocarà un major consum de DAG, que no podrà ser processat per tal d'obtenir CDP-DAG per sintetitzar PI, i que explicaria perquè el DiC8 incrementa la síntesi de PC i redueix la de PI (Figura R-19A). Un punt de gran interès hauria estat comparar l'efecte del DiC8 en astròcits control i tractats amb liti, malauradament encara no hem pogut portar a terme aquest experiment en astròcits marcats amb [^{32}P]-P_i i [^{14}C]-acetat. Tot i això, els experiments d'incorporació de [^3H]-Cho mostren que en presència de DiC8, que produeix un increment en la velocitat de síntesi de PC, pràcticament s'elimina l'efecte relatiu del liti sobre la síntesi de PC (Figura R-20B). Aquest resultat té grans implicacions per a la comprensió del mecanisme molecular pel qual el liti incrementa la velocitat de síntesi de PC, fet que fa imprescindible ampliar l'estudi dels efectes del DiC8 sobre les alteracions produïdes pel liti en astròcits.

1.15 El liti no incrementa els nivells de CDP-DAG ni de DAG en astròcits

El fet que la reducció en la síntesi de PI causada pel liti no es pogués revertir amb l'addició d'inositol (Figura R-19A), ens va fer pensar que possiblement no era deguda a la manca d'inositol lliure provocada per la inhibició de la IMPasa. La depleció d'inositol afectarà la síntesi de PI quan els nivells d'inositol siguin el factor limitant per a la reacció de la PI sintasa. En aquestes condicions, la inhibició de la síntesi de PI anirà acompanyada d'una acumulació de CDP-DAG, l'altre substrat de la PI sintasa. Per tant, vam voler comprovar si en el nostre

sistema s'estava produint aquesta acumulació de CDP-DAG. A la figura R-21A podem observar com el tractament amb liti, no només no incrementa els nivells de CDP-DAG, sinó que els disminueix. Paral·lelament, el tractament amb CDP-Cho, el precursor de la PC, també provoca una reducció dels nivells de CDP-DAG. Aquests experiments, juntament amb els de la figura R-20, ens fan pensar que el liti, més que afavorir la síntesi de PC gràcies a la seva capacitat d'inhibir la síntesi de PI actuant a nivell de la IMPasa, està produint l'efecte invers.

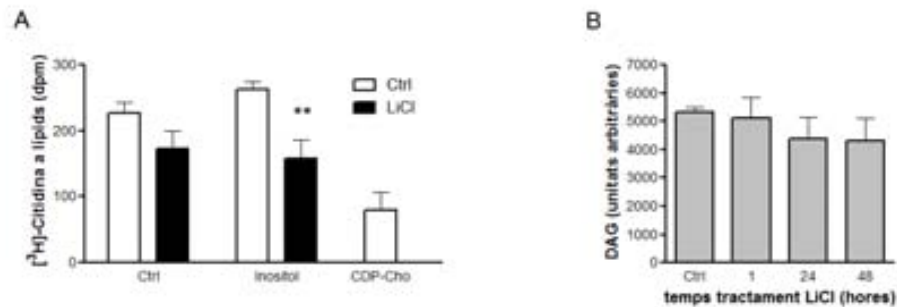


Figura R-21. Efectes del liti sobre els nivells de CDP-DAG i de DAG A) Els astròcits sembrats en plaques de 24 pouets van ser incubats en DMEM + 0.5% d'FBS durant 7 dies. Durant els darrers 3 dies d'incubació, es van tractar els pouets corresponents amb LiCl (5mM), inositol (10 mM), o CDP-Cho (1 mM) i simultàniament es van marcar amb 2 μ Ci/pouet de [³H]-citidina. Passats els 3 dies de tractament i marcatge, es va mesurar la radioactivitat associada als lípids cel·lulars, corresponent als CDP-DAG. B) Nivells absoluts de DAG mesurats pel mètode de la DAGK en astròcits tractats amb LiCl (5 mM) durant els temps indicats. Els resultats de (A) representen la mitjana i s.e.m. d'un experiment representatiu de dues rèpliques, on cada punt va ser analitzat per quadruplicat, mentre que l'experiment de (B) només s'ha realitzat una vegada analitzant cada tractament per triplicat (** p <0.01, liti vs control)..

És a dir, el liti, en potenciar la ruta de Kennedy, està augmentant el consum de DAG, reduint la formació de CDP-DAG a partir del PA provinent del DAG, i per tant, inhibint la síntesi de PI. D'aquesta manera, el factor limitant per a la síntesi de PI que estaria reduint el liti seria el CDP-DAG, i no l'inositol, fet que explicaria perquè l'addició d'inositol no incrementa la síntesi de PI en astròcits tractats amb liti. En consonància amb aquesta possibilitat, a la figura R-21B es mostra un experiment on s'observa com el tractament amb liti, no només no incrementa els nivells de DAG, sinó que els podria estar reduint. Caldrà replicar aquest experiment per confirmar si realment el liti redueix els nivells de DAG cel·lular, fet que tindria grans implicacions per a la comprensió del seu mecanisme d'acció.

2 Efectes del liti sobre l'alliberació de senyals químics

2.1 Paper del liti sobre la secreció de citoquines

Els resultats obtinguts amb medi condicionat per astròcits tractats amb liti ens van fer pensar que el liti alterava l'alliberació, per part dels astròcits, de certes molècules amb activitat paracrina o autocrina. Per altra banda, arran d'una col·laboració amb el grup de la Dra. Jackowski del St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA), havíem observat que en macròfags *knockout* condicional per la CCT- α , que presentaven una menor taxa de síntesi de PC, s'hi produïa una inhibició en la secreció de citoquines com el TNF- α (Tian et al., 2008). Aquest efecte era degut a una alteració en la via secretòria que provocava l'acumulació de les citoquines al Golgi. Això ens va fer pensar que l'increment en la síntesi de PC observat en astròcits tractats amb liti podria resultar en l'efecte contrari, és a dir, estimular la secreció de citoquines i/o altres proteïnes senyalitzadores.

2.1.1 El liti incrementa l'alliberació de TNF- α en cultius d'astròcits

Tal com s'havia realitzat amb els macròfags CCT- α *-/-*, vam decidir estudiar la secreció de TNF- α en cultius d'astròcits, que alliberen aquesta citoquina en ser estimulats amb lipopolisacàrid bacterià (LPS) (Sawada et al., 1989). D'aquesta manera vam comprovar que el tractament amb liti provoca un increment en l'alliberació de TNF- α en astròcits (Figura R-22A). Per altra banda, els astròcits estimulats amb LPS mostraven el mateix comportament que els no tractats en relació als efectes del liti sobre la síntesi de PC (Figura R-22C), per la qual cosa era factible que la major secreció de TNF- α estigués relacionada amb l'increment en la velocitat de síntesi de PC.

Coneixent les propietats citoprotectores del liti (revisat a Chuang, 2005) vam voler comprovar que aquest increment en l'alliberació de TNF- α no fos degut a un efecte protector davant l'estrès produït per l'LPS, que resultés en un major nombre d'astròcits vius en les plaques tractades amb liti. Vam analitzar la viabilitat cel·lular en els cultius tractats amb LPS pel mètode de l'MTT i vam observar que el liti no només no estava protegint els astròcits de la mort cel·lular, sinó que els feia més sensibles a l'LPS (Figura R-22B). Aquest fet podria ser degut a la major quantitat de TNF- α produït pels astròcits tractats amb liti, que pot acabar activant vies de mort cel·lular (revisat a Lorz i Mehmet., 2009).

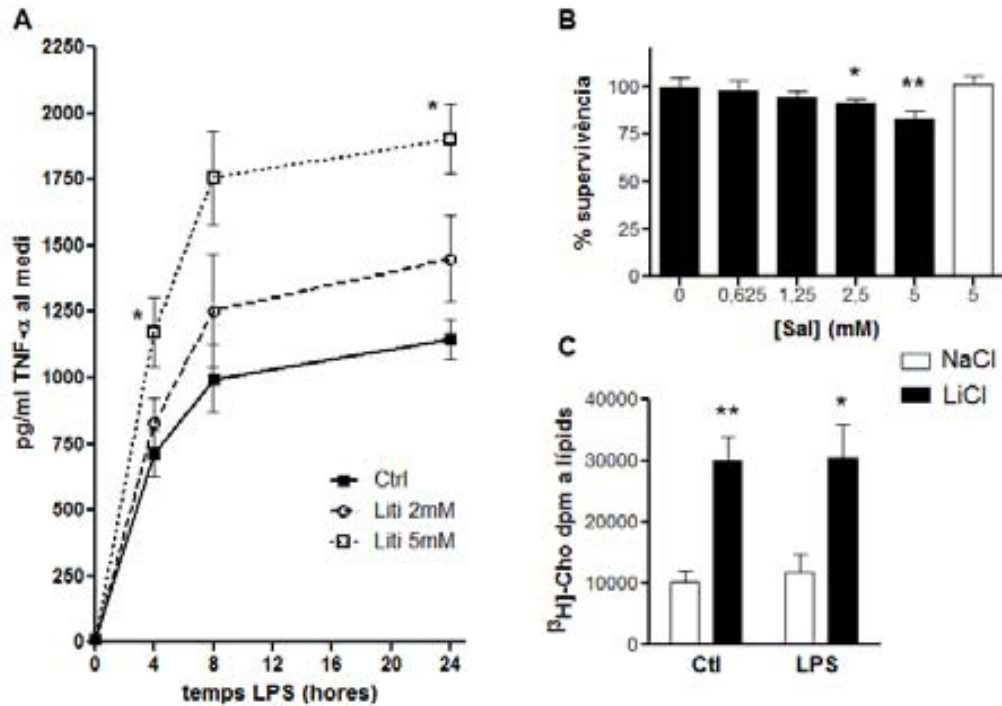


Figura R-22. El liti incrementa la secreció de TNF- α en astròcits. Els astròcits secundaris van ser sembrats a 100000 cèl·luls/pouet en plaques de 24 pouets. Després de 3 dies proliferant (DMEM + 10% FBS), el medi es va canviar a DMEM + 0,5 % FBS per aturar el cicle cel·lular dels astròcits, que es van mantenir en aquest medi durant 4 dies, els 3 darrers en presència o absència de LiCl. Passat aquest temps, es van estimular amb 0,1 mg/ml d'LPS durant els temps indicats. A) Determinació per ELISA del TNF- α en medi de cultiu després de 4, 8 i 24 hores de tractament amb LPS. B) Assaig MTT de supervivència cel·lular a les 24 hores de tractament amb LPS en astròcits pretractats amb LiCl o NaCl a les concentracons indicades. C) Incorporació de [3 H]-Cho a lípids en astròcits pretractats o no amb LiCl 5 mM i estimulats durant 4 hores amb 0,1 mg/ml. Els resultats representen la mitjana i s.e.m. de 3 experiments independents, on cada punt va ser analitzat per triplicat (* p <0.05, ** p <0.01).

En aquest punt, calia comprovar si tal com suposàvem, aquest efecte tenia lloc per un mecanisme similar, però de signe contrari, al que s'observa en els macròfags CCT- α $-/-$, és a dir, afavorint l'exportació de vesícules del Golgi gràcies a l'increment en la síntesi de PC. La complexitat tècnica que requereix l'estudi del transport vesicular intermembranar ens va decidir a realitzar una estada al Consorzio Mario Negri Sud (Itàlia), en el grup de la doctora Daniela Corda, de gran experiència i prestigi en el camp del rol dels fosfolípids en el transport intermembranar. Durant els 7 mesos que vaig treballar en el seu laboratori, vaig poder estudiar l'efecte del liti sobre l'exportació de vesícules del Golgi a la membrana plasmàtica i, paral·lelament, participar activament en un dels projectes d'investigació de la doctora Corda, al voltant del paper de l'acilació de l'àcid lisofosfatídic en la fissió de les vesícules del Golgi promoguda per la proteïna BARS (Weigert, 1999).

2.2 Estudi del transport de vesícules des de l'aparell de Golgi a la membrana plasmàtica.

Per a l'anàlisi de l'exportació de proteïnes des del TGN (*Trans-Golgi Network*) es va emprar l'assaig VSVG (Hirschberg et al., 1998), basat en la monitorització del transport de la proteïna vírica integral de membrana VSVG des de l'aparell de Golgi a la membrana plasmàtica (Figura M-3).

2.2.1 El liti no afecta l'exportació de vesícules del Golgi cap a la membrana plasmàtica en cèl·lules COS-7

Els primers assaigs es van realitzar en cèl·lules COS-7, que es van transfectar amb un plàsmid per a l'expressió de la variant termosensible de la VSVG conjugada a una proteïna que emet fluorescència en la regió del vermell (VSVG-cherry). En cap dels experiments es va observar que el tractament amb liti afecti el transport de vesícules del Golgi a la membrana plasmàtica en cèl·lules COS-7 (Figura R-23). També es va analitzar l'efecte del valproat, que inhibeix la síntesi de PC i per tant, segons la nostra hipòtesi de treball, podria alentir la via secretòria, però tampoc hi vam observar cap alteració en el transport intermembranar.

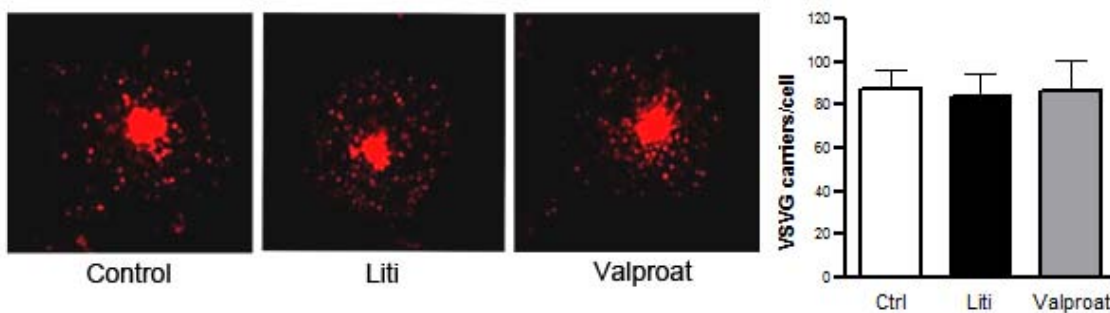


Figura R-23. Assaig VSVG en COS-7 tractades amb liti o valproat. Les cèl·lules COS-7 van ser sembrades a 25000 cèls/ml en DMEM + 10% FBS. Passades 24 hores es van tractar amb liti (5 mM) o valproat (0.8 mM) i es van incubar 24 hores més abans sobreexpressar-hi la VSV-cherry i seguir el protocol de l'assaig VSVG. Passats els 30 minuts finals a 32 °C, les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid, es van permeabilitzar amb saponina i es van preparar per a la immunocitoquímica de la VSVG. La marca principal correspon a la VSVG del Golgi, des d'on es formen les petites vesícules carregades amb la proteïna. L'experiment es va realitzar per triplicat i comptant 15 cèl·lules per tractament en cada ocasió.

Si bé les COS-7 són un bon model per als estudis de transport vesicular, resulten massa allunyades dels cultius d'astròcits, el nostre principal objecte d'estudi. Així doncs, tot i que no havien estat emprats mai en els laboratoris de la Dra. Corda, ens vam disposar a realitzar aquests experiments en cultius primaris d'astròcits.

2.2.2 El liti no afavoreix l'exportació de vesícules del Golgi cap a la membrana plasmàtica en cultius d'astròcits

Els cultius primaris d'astròcits de rata es van ressemar sobre cobreobjectes de vidre en plaques de 24 pous per a la realització de l'assaig de VSVG. Per la poca eficiència de transfecció que es sol obtenir en astròcits, es va optar per infectar les cèl·lules amb la soca ts045 del virus VSV, que indueix l'expressió de la VSVG termosensible (Gallione i Rose, 1985). Una altra dificultat afegida de l'assaig en astròcits era que per la seva morfologia estrellada i amb gran solapament intercel·lular, resultava complicat analitzar-los pel mateix mètode que les COS-7, comptant les vesícules transportadores formades per unitat de temps, ja que les imatges obtingudes eren d'una complexitat massa gran. Per superar aquest entrebanc l'assaig es va portar a terme sense l'àcid tànnic, permetent que les vesícules es fusionessin amb la membrana plasmàtica i s'hi difongués la VSVG. Realitzant la tinció immunocitoquímica de la VSVG sense permeabilitzar la cèl·lula, es pogué mesurar la quantitat de VSVG transportada a la membrana plasmàtica des del Golgi durant el temps d'incubació a 32 °C (figura M-3).

Tal com s'observa a la figura R-24 ni el liti incrementa la capacitat dels astròcits de transportar la VSVG des del Golgi fins a la membrana plasmàtica, ni el tractament amb valproat la disminueix, fet que ens va obligar a replantejar les nostres hipòtesis. Sabíem que el liti incrementa la velocitat de síntesi de PC en astròcits, així com la seva capacitat de secretar TNF- α . Crèiem que ambdós efectes es podien relacionar partint del fet que la inhibició de la síntesi de PC produeix una disminució en la secreció de TNF- α degut a l'alteració del transport del pro-TNF- α del Golgi a la membrana plasmàtica (Tian et al., 2008), i per tant, es podia pensar que els efectes observats amb el liti eren deguts al fenomen oposat, es a dir, a l'acceleració del transport de vesícules del Golgi a la membrana plasmàtica. Descartada aquesta hipòtesi, calia comprovar si l'increment en l'alliberació de TNF- α es devia a un augment general de la resposta inflamatòria dels astròcits en resposta LPS.

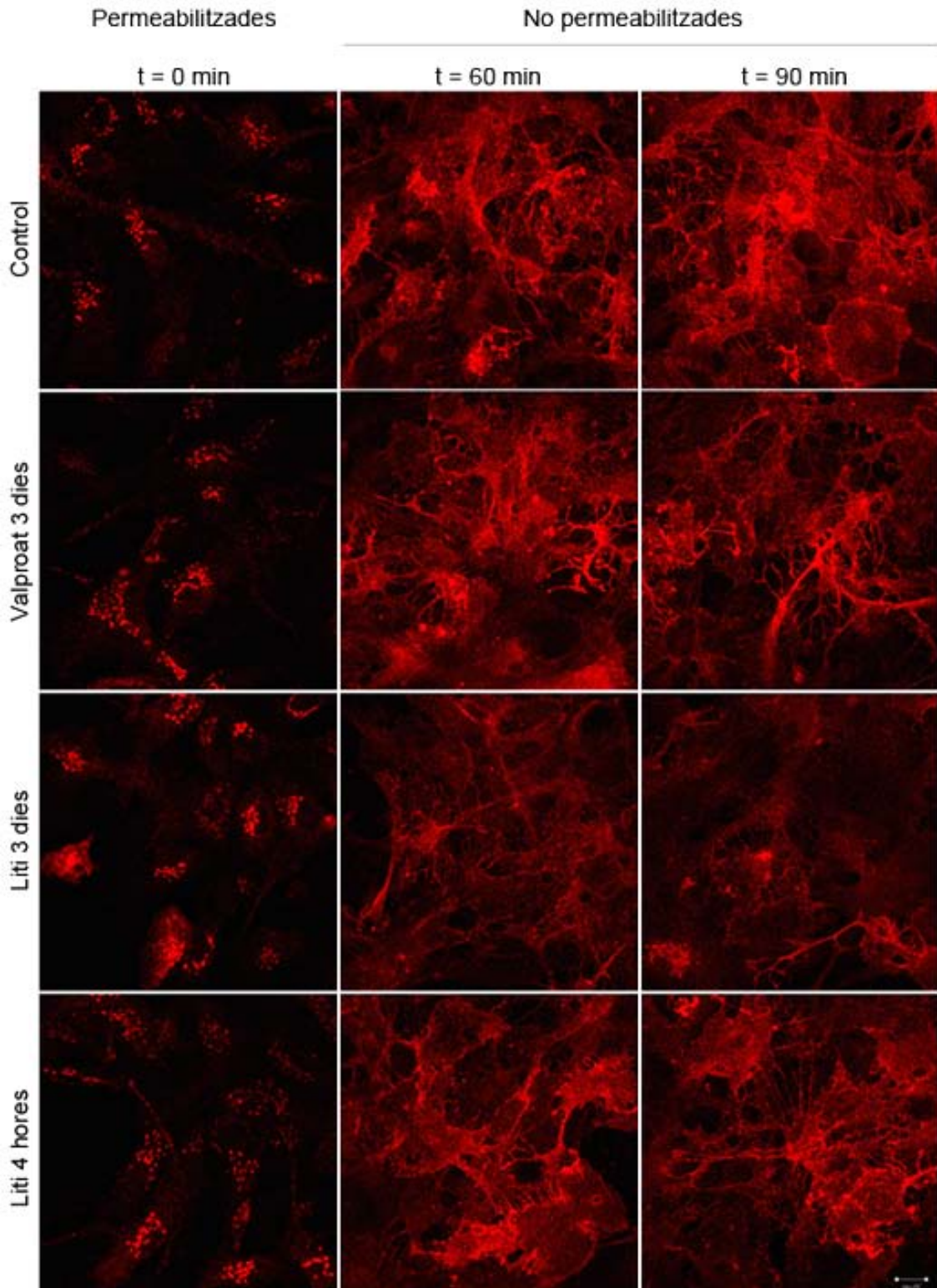


Figura R-24. Assaigs VSVG en astròcits tractats amb liti o valproat. Els astròcits secundaris van ser sembrats a 50000 cèls/ml en DMEM + 10 % FBS. Després de 3 dies, el medi es va canviar a DMEM + 0,5 % FBS per aturar el cicle cel·lular dels astròcits, que es van mantenir en aquest medi durant 4 dies, període durant el qual es van tractar amb LiCl (5 mM) o valproat (0.8 mM) durant els temps indicats. Passats el període d'incubació, es van infectar amb el virus VSV i es va seguir el protocol de l'assaig de VSVG. En els panells superiors es mostren els astròcits a temps 0, amb la VSVG acumulada en l'aparell de Golgi (cèl·lules permeabilitzades), i als panells inferiors es mostra la VSVG que ha arribat a la membrana plasmàtica als 60 i 90

minuts d'incubació a 32 °C (cèl·lules no permeabilitzades). Es mostra un experiment representatiu de dos experiments independents.

2.3 Paper del liti en la resposta inflamatòria en resposta a LPS

Un dels models més emprats per estudiar *in vitro* la resposta inflamatòria en astròcits és el tractament dels cultius amb LPS (revisat a Saura, 2007). La resposta dels astròcits a LPS es caracteritza pels típics marcadors de reactivitat glial, com ara canvis en la seva morfologia, o alliberació de molècules com el TNF- α , l'òxid nítric (NO) o la prostaglandina E2 (PGE₂). Si bé els cultius secundaris d'astròcits secreten TNF- α en resposta a LPS (Figura R-22), teníem moltes dificultats per obtenir resultats reproduïbles ja que la intensitat de la resposta variava molt de cultiu a cultiu. Per altra banda, en la majoria d'experiments realitzats, no s'aconseguia estimular la secreció de NO amb el tractament amb LPS, mentre que l'efecte era clar en cultius de microglia, o en cultius primaris d'astròcits corticals (Figura R-25A).

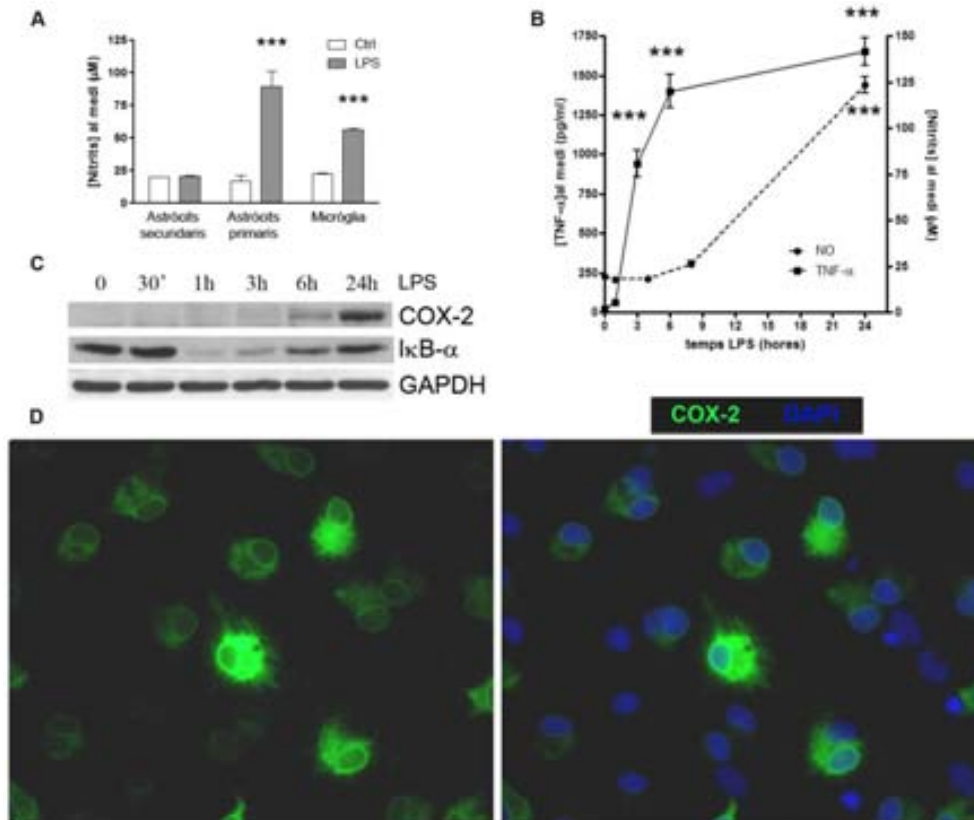


Figura R-25. Caracterització de l'efecte de l'LPS sobre els cultius de glia. Els diferents cultius van ser tractats amb 0,1 μ g/ml d'LPS. A) Efecte de l'LPS sobre l'alliberació d'òxid nítric (NO) en cultius primaris i secundaris d'astròcits i en cultius de microglia, obtinguts com es detalla en l'apartat de materials i mètodes. B) Nivells de TNF- α i NO en el medi de cultiu d'astròcits primaris al llarg del temps d'estimulació amb LPS. C) Inducció de l'expressió de COX-2 i degradació de I κ B- α en cultius primaris d'astròcits estimulats amb LPS. D) Tinció immunocitoquímica de la COX-2 (Verd) i dels nuclis cel·lulars (DAPI, blau) en cultius primaris d'astròcits sotmesos a 0,1 μ g/ml d'LPS durant 18 hores. S'observa que la majoria de cèl·lules expressen la COX-2, que es localitza al ER i l'embolcall nuclear, amb diferents nivells d'expressió segons la cèl·lula. La determinació de NO i TNF- α es mostra com a mitjana de tres experiments independents, on cada punt es mesurà per triplicat, mentre que es mostren experiments representatius de la inducció de COX-2 (***) ($p < 0.001$).

Aquests cultius si bé es troben enriquits en astròcits, també contenen quantitats significatives d'altres tipus cel·lulars, com ara la micròglia, de manera que en realitat són cultius mixtes de cèl·lules glials (figura R-26). El paper de la micròglia en la resposta a LPS dels cultius enriquits en astròcits és un tema controvertit del que no som experts (revisat a Saura, 2007), però amb els nostres experiments, els cultius primaris enriquits en astròcits mostraven una resposta inflamatòria més clara i reproducible que els cultius secundaris, de manera que vam decidir realitzar els experiments en aquests cultius mixtes de glia. En aquest model, podem observar com el tractament amb LPS hi produeix un increment en l'alliberació de TNF- α , de NO i en l'expressió de COX-2, així com una ràpida degradació de I κ B- α , que indica que s'està activant la via de l'NF- κ B (Fig R-25).

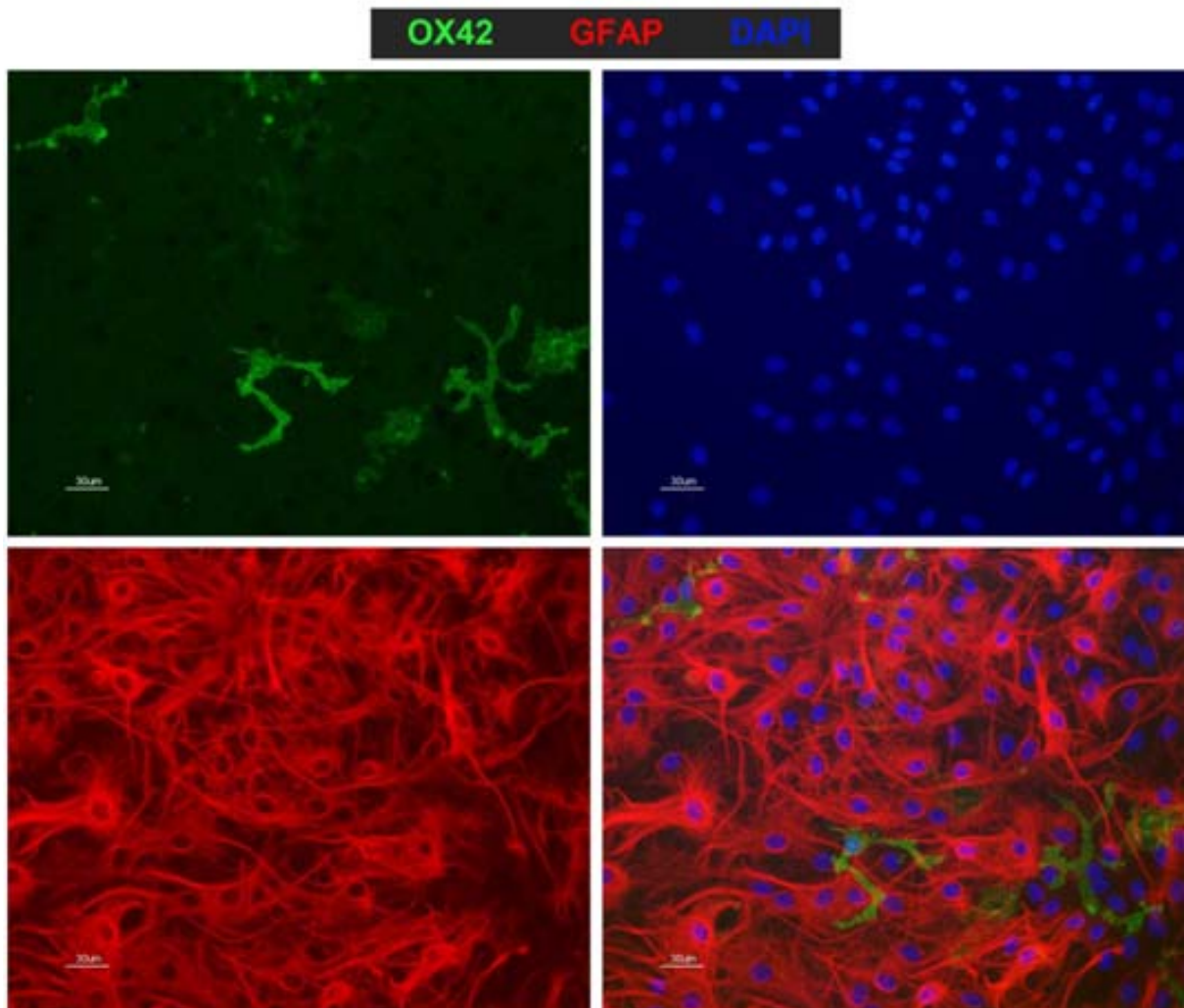


Figura R-26. Presència de micròglia en els cultius primaris d'astròcits. Immunocitoquímica representativa d'un cultiu primari d'astròcits provinents de còrtex de rates nounades, mantingut durant dues setmanes amb DMEM al 10% d'FBS i 8 dies amb DMEM al 0.5% d'FBS. Les cèl·lules van ser tenyides amb el marcador d'astròcits GFAP (vermell) i el marcador de micròglia OX42 (verd). Els nuclis apareixen tenyits amb DAPI (Blau).

2.3.1.1 El liti incrementa l'alliberació de TNF- α de NO i l'expressió de COX-2 en astròcits tractats amb LPS

Tal com podem observar en la figura R-27 el pretractament dels cultius primaris enriquits en astròcits amb liti (5 mM), provoca un increment en l'alliberació de TNF- α , però també en la producció de NO i en l'expressió de COX-2, l'enzim responsable de la síntesi de prostaglandines en situacions d'inflamació (revisat a Wu, 1995), fet que ens indicaria que el liti, més que estar afavorint la via secretòria de proteïnes com el TNF- α , en realitat està incrementant la resposta inflamatòria de la glia.

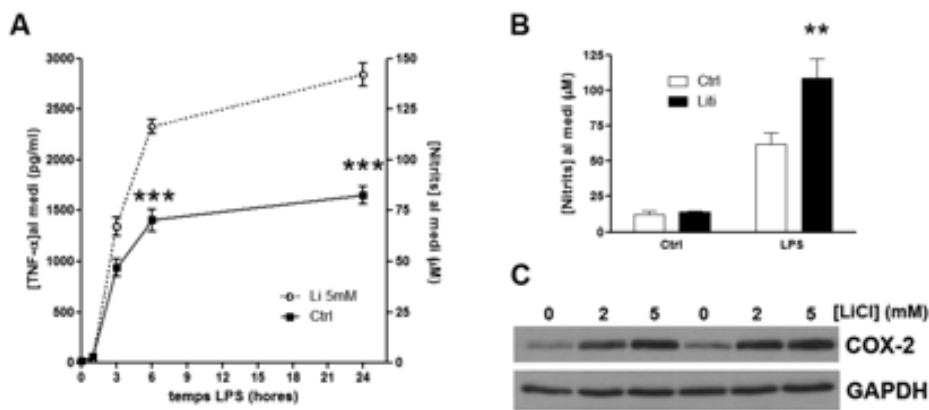


Fig R-27. El liti incrementa l'alliberació de TNF α de NO i l'expressió de COX-2 en astròcits tractats amb LPS. A i B) Els astròcits primaris es van fer créixer durant 2 setmanes en DMEM + 10 % FBS, i seguidament es van incubar durant 8 dies en DMEM + 0.5 % FBS, els 7 últims dels quals en presència de LiCl 5mM. Passat aquest temps, es van tractar amb 0,1 μ g/ml d'LPS i es van anar recollint mostres del medi als temps indicats, per tal d'analitzar-ne el contingut de TNF- α i de nitrits, moment en què es van lliurar per a la realització del western-blot. C) Nivells d'expressió de COX-2 en astròcits tractats com en (A) i estimulats durant 18 hores amb 0,1 μ g/ml d'LPS. Es mostra la mitjana de tres experiments independents, on cada punt es mesurà per triplicat, i un western-blot representatiu de la inducció de COX-2 (** p <0.01, *** p <0.001).

2.3.2 El bloqueig de l'alliberació de TNF- α no altera l'efecte del liti sobre la inducció de la COX-2

A diferència dels efectes sobre la secreció d'una proteïna, com el TNF- α , no sembla que un increment en l'expressió de proteïnes proinflamatòries com la COX-2 o en la producció d'un gas com l'NO, siguin fenòmens que es puguin relacionar directament amb l'alteració de les rutes de transport vesicular intermembranar. Ara bé, tal com s'observa en la figura R-27, a diferència de la inducció de la COX-2 o l'alliberació de NO, que tenen lloc varies hores després de l'addició d'LPS, la secreció de TNF- α és un fenomen primerenc en la resposta dels astròcits a aquest agent inflamatori. Aquest resultat ens va fer pensar que l'increment en l'expressió de COX-2 o en l'alliberació d'NO podria ser degut a l'efecte paracrí o autocrí del propi TNF- α , alliberat en major quantitat en els astròcits tractats amb liti. Per comprovar -ho,

vam bloquejar la secreció de TNF- α mitjançant el tractament amb propranolol. El propranolol a més de ser un antagonista β -adrenèrgic, també actua com a inhibidor de la PAP (Pappu i Hauser, 1983), l'enzim que catalitza la conversió del PA a DAG (Roberts et al., 1998). Inhibint aquesta reacció, les membranes cel·lulars veuen reduïts els seus nivells de DAG, un component indispensable per als processos de transport vesicular (Baron i Malhotra, 2002; Fernández-Ulibarri et al., 2007; Litvak et al., 2005). Alterant el transport intermembranar, el propranolol bloqueja l'exportació del pro-TNF- α del Golgi a la membrana plasmàtica de macròfags tractats amb LPS (Tian et al., 2008), reduint-ne la seva secreció, així com la d'altres citoquines que es processen per la via secretòria.

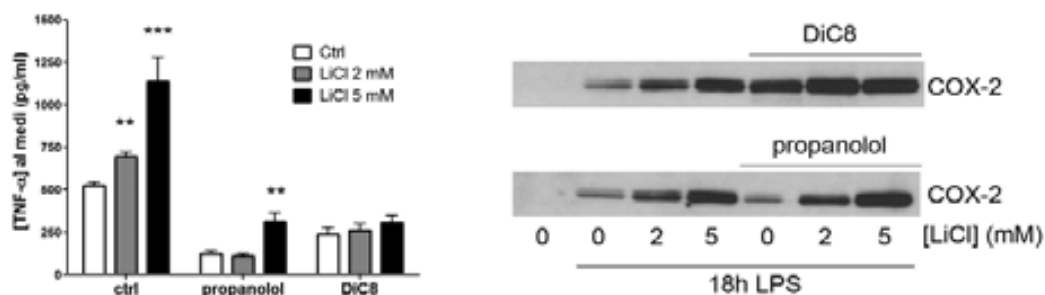


Figura R-28. El bloqueig de l'alliberació de TNF- α amb propranolol no altera l'efecte del liti sobre la inducció de la COX-2. Els astròcits primaris es van deixar proliferant durant 2 setmanes en DMEM + 10 % FBS, i seguidament se'ls va incubar durant 8 dies en DMEM + 0.5 % FBS, retractant-los amb LiCl a les concentracions indicades durant els darrers 7 dies. Passat aquest temps, es van estimular amb 0,1 mg/ml d'LPS, en presència o absència de propranolol (60 μ M) o dioctanoilglicerol (DiC8, 25 μ M). A) Concentració de TNF- α alliberat al medi a les 4 hores d'estimulació amb LPS. B) Nivells d'expressió de COX-2 a les 18 hores d'estimulació amb LPS en presència o absència de DiC8 o propranolol. Es mostra la mitjana de tres experiments independents, on cada punt es mesurà per triplicat, i un western-blot representatiu de la inducció de COX-2 (** p <0.01, *** p <0.001).

Amb el tractament dels astròcits amb propranolol, previ a l'addició d'LPS, observem que la secreció de TNF- α es veu àticament reduïda, però en canvi no desapareix l'efecte estimulador del liti ni s'altera l'expressió de COX-2 (figura R-28). Això ens indica que l'increment en l'expressió de COX-2 no és degut a la major concentració de TNF- α en el medi dels astròcits tractats amb liti, sinó que el liti està afavorint l'activació de rutes inflammatòries que provoquen tant l'alliberació de TNF- α com la inducció de COX-2 per mecanismes independents. Aquest experiment ens va acabar de convèncer que l'increment en la secreció de TNF- α observat és degut a una major resposta inflammatòria dels astròcits tractats amb liti, i que la nostra teoria que el pretenia relacionar amb un hipotètic efecte sobre la via secretòria de proteïnes era errònia. Paral·lelament al tractament amb propranolol, que havia de reduir els nivells de DAG, i inhibir la síntesi de PC, vam voler analitzar quin efecte es produïa incrementant els nivells de DAG i la síntesi de PC amb l'addició de DiC8 (figura R-28). Curiosament el dioctanoilglicerol (DiC8) també inhibia la secreció de TNF- α , però en

canvi l'expressió de COX-2, reflex de la resposta inflamatòria, es veia incrementada. Aquest fet pot indicar que tant la manca com l'excés de DAG afecten la via secretòria, mentre que l'increment en l'expressió de COX-2 podria ser degut a l'activació de les PKC induïda pel DiC8 (Molina-Holgado et al., 2000). El punt més interessant però, és que, a diferència del que succeeix amb el propranolol, el tractament amb DiC8 elimina completament l'efecte del liti sobre l'alliberació de TNF- α , i l'expressió de COX-2. És la segona vegada que observem que un efecte del liti és bloquejat pel tractament amb DiC8 (figura R-20), fet que sens dubte ha de ser rellevant per a la comprensió del mecanisme d'acció del liti sobre els cultius d'astròcits, indicant que el DAG hi podria jugar un paper determinant.

2.3.2.1 Els fàrmacs emprats per al tractament dels trastorns bipolars inhibeixen l'alliberació de prostaglandina E2.

Els principals fàrmacs emprats per al tractament dels trastorns bipolars són les sals de liti, l'àcid valproic, la carbamazepina i la lamotrigina. Com ja s'ha dit, una bona estratègia per intentar trobar la seva diana terapèutica és buscar efectes comuns produïts per aquests fàrmacs (Harwood & Agam, 2003), que si bé presenten estructures químiques molt diferents és possible que actuïn de manera similar. Una d'aquestes dianes comunes està essent àmpliament estudiada pel grup d'Stanley I. Rapoport, que defensa que els estabilitzadors de l'estat d'ànim actuen sobre el metabolisme de l'àcid araquidònic (Rao et al., 2008). En un dels seus nombrosos treballs al voltant d'aquesta qüestió mostren que en rates tractades amb liti a les que s'indueix una resposta inflamatòria amb la injecció intracerebroventricular d'LPS, s'hi dona reducció en els nivells de PGE₂ cerebral (Basselin et al., 2007b). En canvi, els nostres resultats en cultius d'astròcits mostren, en les cèl·lules pretractades amb liti, un increment en l'expressió de COX-2, l'enzim responsable de la síntesi de PGE₂ en resposta a LPS. Per contrastar aquests resultats aparentment contradictoris, vam decidir mesurar la quantitat de PGE₂ que s'alliberava al medi en resposta a LPS pretractant els nostres cultius amb els principals fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim (Fig. 5)

Tal com s'observa a la figura R-29, el pretractament amb liti a la concentració de 5 mM produeix un increment en la resposta dels astròcits a LPS, alliberant una major quantitat de PGE₂, TNF- α i NO. En canvi, a concentracions més reduïdes, el liti provoca l'efecte contrari en quant a la PGE₂, sense que l'alliberació de TNF- α o NO es vegi afectada. La possible rellevància terapèutica d'aquesta reducció en la producció de PGE₂ es fa palesa pel fet que també es produeix en els astròcits tractats amb valproat, carbamazepina o lamotrigina, fet que ens fa pensar que pot ser un efecte relacionat amb el mecanisme d'acció d'aquests fàrmacs.

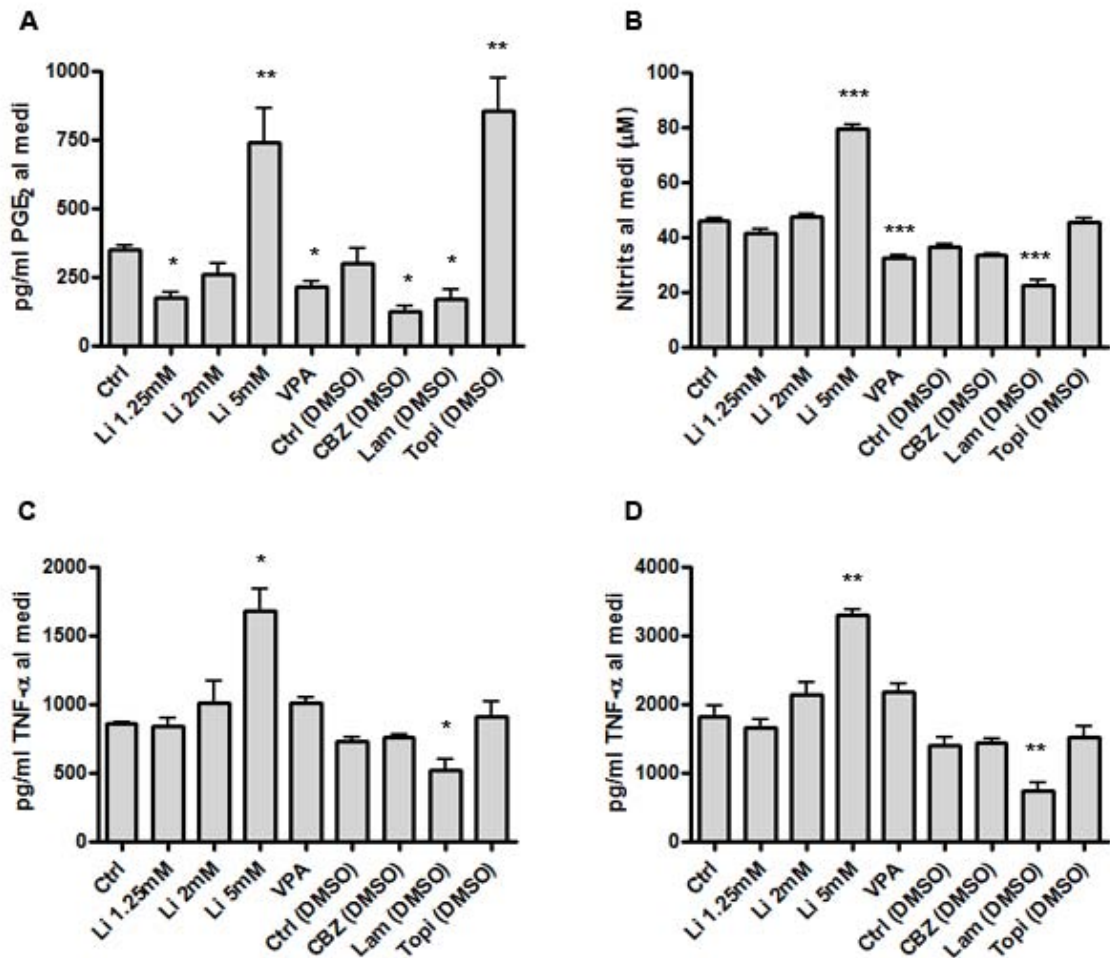


Fig R-29. Nivells de PGE₂, TNF- α i NO alliberats pels astròcits en resposta a LPS. Els astròcits primaris es van deixar proliferant durant 2 setmanes en DMEM + 10 % FBS, i seguidament se'ls va incubar durant 8 dies en DMEM + 0.5 % FBS, pretractant-los amb els fàrmacs indicats durant els darrers 7 dies. Passat aquest temps, es van estimular amb 0,1 mg/ml d'LPS, i se'n va analitzar el medi de cultiu als temps indicats, mesurant-hi els nivells de PGE₂ (A), de NO (B) i TNF- α (D) a les 18 hores de tractament amb LPS, i de TNF- α a les 4 hores de tractament (C). El LiCl (1.25, 2 i 5 mM) i el valproat (VPA, 0,5 mM) es van addicionar dissolts en aigua, mentre que la carbamazepina (CBZ, 50 μ M), la lamotrigina (Lam, 50 μ M), i el topiramet (Topi, 50 μ M), estaven dissolts en DMSO. Es mostra la mitjana i s.e.m. de dos experiments independents, on cada punt es mesurà per triplicat (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)..

A més dels estabilitzadors de l'estat d'ànim, també hem analitzat els efectes del topiramet, un anticonvulsiu que s'ha proposat per a la teràpia dels trastorns bipolars (Calabrese et al., 2001). Els nostres resultats mostren que, a diferència dels estabilitzadors de l'estat d'ànim d'eficàcia contrastada, el topiramet no inhibeix l'alliberació de PGE₂, un resultat que està en consonància amb estudis en rates realitzat pel grup de Rapoport (Ghelardoni et al., 2005; Lee et al., 2005), i que podria indicar que no és un fàrmac adequat per al tractament d'aquesta patologia, tal com mostra un recent estudi clínic (Kushner et al., 2006).

2.3.3 El valproat, la carbamazepina i la lamotrigina atenuen la inducció de COX-2 en resposta a LPS, mentre que el liti i el topiramet l'augmenten.

La PGE₂ es sintetitza per acció seqüencial de la COX i la PGE sintasa sobre l'àcid araquidònic alliberat per la PLA₂ (revisat a Murakami i Kudo, 2006). La principal isoforma de la PLA₂ per a l'alliberació de l'àcid araquidònic en el cervell és la cPLA₂ (revisat a Farooqui i Horrocks, 2004), i en presència d'agents proinflamatoris s'indueix l'expressió de la COX-2 per tal de sintetitzar prostaglandines com la PGE₂ (revisat a Wu, 1995). Si els estabilitzadors de l'estat d'ànim inhibeixen la secreció de PGE₂ en resposta a LPS, és probable que estiguin actuant a nivell d'un d'aquests enzims. A la figura R-30 podem observar que després de 18 hores d'incubació amb LPS, els astròcits pretractats amb valproat, lamotrigina o carbamazepina, presenten una quantitat de COX-2 inferior als controls. Per contra, aquells que han estat pretractats amb liti o topiramet, mostren uns nivells més elevats d'aquest enzim.

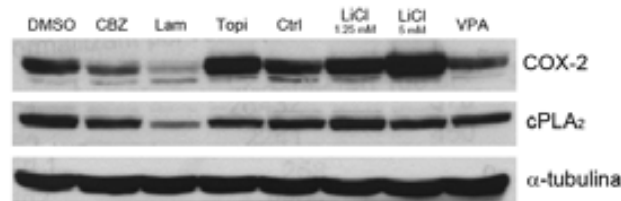


Figura R-30. Nivells de COX-2 i cPLA₂ en astròcits activats amb LPS. Els astròcits primaris es van fer créixer durant 2 setmanes en DMEM + 10 % FBS, i seguidament es van incubar durant 8 dies en DMEM + 0.5% FBS, els 7 últims dels quals en presència dels fàrmacs indicats: carbamazepina (CBZ, 50 µM), lamotrigina (Lam, 50 µM) i Topiramet (Topi, 50 µM), dissolts en DMSO, i LiCl (1.25 i 5 mM) i valproat (VPA, 0.5 mM), en dissolts en aigua. Passat aquest temps, es van tractar amb 0,1 µg/ml d'LPS per 18 hores, moment en què es van lliurar per a la realització del western-blot. Es mostra un western-blot representatiu de tres experiments independents.

Aquests resultats concorden amb els obtinguts amb l'anàlisi de la quantitat de PGE₂ alliberada al medi de cultiu, excepte pel que fa als astròcits tractats amb liti a la concentració d'1.25 mM. Aquests mostren una reducció en la producció de PGE₂, però en canvi no hi observem una reducció en l'expressió de COX-2, que fins i tot presenta uns nivells superiors al control. Aquest fet ens permet explicar l'increment en la producció de PGE₂ que s'observa en els astròcits tractats amb LiCl a 5 mM, però no concorda amb la reducció observada en astròcits tractats amb LiCl 1.25 mM. Aquesta aparent contradicció podria indicar que el mecanisme per explicar la inhibició observada en l'alliberació de PGE₂ a concentracions baixes de liti, no s'ha de buscar en la COX-2 sinó a nivell de la producció d'àcid araquidònic per la cPLA₂. A la figura R-30 però, observem que ni el liti ni els altres fàrmacs, a excepció de la lamotrigina, exerceixen efectes importants sobre els nivells de cPLA₂.

Així doncs, podem dir que la inhibició de la producció de PGE₂ en resposta a LPS en astròcits tractats amb valproat, lamotrigina o carbamazepina, així com l'efecte contrari observat en astròcits tractats amb topiramato o amb liti a concentracions superiors a la seva finestra terapèutica, es pot explicar pels efectes d'aquests fàrmacs sobre els nivells de COX-2. Però, per quin mecanisme el liti a concentracions terapèutiques inhibeix la producció de PGE₂?

2.4 Efecte dels estabilitzadors de l'estat d'ànim sobre l'àcid araquidònic

Si el medi dels astròcits tractats amb liti 1.25 mM conté menys PGE₂ que els controls, hauria de ser degut a una d'aquestes causes: a) una menor activitat COX, b) una menor activitat de la PGE sintasa c) un increment en la degradació de la PGE₂, d) una reducció en la quantitat d'àcid araquidònic utilitzable per a la síntesi de PGE₂. Aquesta darrera opció per la seva banda, tant pot ser deguda a una menor producció d'àcid araquidònic, com a un major consum d'aquesta molècula per altres vies, ja sigui per reacció a fosfolípids o per la síntesi d'altres icosanoids.

Per analitzar el metabolisme de l'àcid araquidònic en aquests astròcits vam realitzar assaigs de marcatge amb [³H]-araquidonat, que s'incorpora als fosfolípids cel·lulars i és alliberat per acció de les PLA₂. Aquests procediments ens va permetre estudiar l'efecte del pretractament amb liti, a diferents concentracions, sobre l'alliberació d'àcid araquidònic en astròcits estimulats amb diversos agents.

2.4.1 L'endotelina-1 i la ionomicina estimulen l'alliberació d'àcid araquidònic

Amb els experiments d'alliberació de [3H]-araquidonat comprovem que els astròcits veuen incrementada l'alliberació d'àcid araquidònic en ser estimulats amb endotelina 1 (ET-1), un efecte que no es veu afectat pel pretractament amb inositol 10 mM (Fig R-31). Aquest increment apareix just després de l'estimulació amb ET-1 i és de curta durada ja que entre els 15-60 minuts ja ha desaparegut, tal com indica la reducció del gradient d'alliberació d'araquidònic entre aquests temps. Per altra banda, el tractament dels astròcits amb una combinació de ET-1 i ionomicina, produeix un increment en l'alliberació d'àcid araquidònic molt superior en magnitud i durada al que es dona amb ET-1. L'ET-1 actua sobre els astròcits a través dels seus receptors acoblats a proteïna G activant la PLC i provocant el consegüent increment d'IP₃ i de Ca²⁺ citosòlic (Stanimirovic et al., 1995). Aquest Ca²⁺ activarà la cPLA₂, provocant un increment en la producció d'àcid araquidònic, que serà parcialment alliberat al

medi. En canvi, la ionomicina actua permeabilitzant les membranes cel·lulars al Ca^{2+} , fet que provoca un elevat i prolongat increment en la concentració de Ca^{2+} citosòlic, que serà responsable de l'activació de la cPLA₂. En el panell B de la figura R-31 podem observar com al final de l'experiment la majoria de tractaments farmacològics aplicats als astròcits no alteren els nivells intracel·lulars finals de [³H]-araquidonat, fet que ens és útil a mode de control per comprovar que el marcatge cel·lular ha estat similar en tots els casos. L'excepció es troba en aquells pouets que han estat tractats amb ionomicina que, fruit de l'elevada activitat PLA₂ que van experimentar, van veure molt reduïts els seus reservoris de [³H]-araquidonat-fosfolípids. Tot i això, tampoc en aquest cas s'observen grans diferències entre els diferents tractaments, excepte pel que fa als astròcits tractats amb valproat (VPA), que mostren una reducció en el [³H]-araquidonat que concorda amb l'increment que es produeix en la seva alliberació (figura R-31C i D).

2.4.2 El liti inhibeix l'alliberació d'AA en resposta a ET-1 mentre que el valproat la incrementa

En els panells C i D de la figura R-31 es mostra com ni el pretractament dels astròcits amb liti ni amb valproat afecten significativament l'alliberació d'àcid araquidònic en condicions basals. En canvi, en estimular els astròcits amb ET-1 es produeix, a temps curts, un increment en l'alliberació d'AA, que es veu potenciat en els astròcits pretractats amb valproat, i inhibit en els astròcits pretractats amb liti a 1.25 mM i sobretot a 5 mM. Tot i això, el [³H]-araquidonat total que s'ha alliberat durant els 60 minuts de l'assaig és molt similar en tots els tractaments. La menor alliberació d'AA en els pous tractats amb liti pot explicar perquè, tot i presentar uns nivells de COX-2 superiors, sintetitzen menys PGE₂ en resposta a LPS.

Pel que fa el valproat, aquest increment en l'alliberació de [³H]-araquidonat pot semblar contradictori amb la disminució de la producció de PGE₂. Tot i això s'ha descrit que a diferència del liti, que inhibeix l'activitat PLA₂, el valproat redueix el recanvi de l'AA inhibint l'activació de l'AA per acilació al coenzim A (Bazinet et al., 2006b). Tenint en compte que la major part de l'AA alliberat per la PLA₂ és ràpidament reincorporat a fosfolípids, una inhibició d'aquest procés implica una acumulació de d'AA lliure en resposta a una activació de la cPLA₂. El fet que el valproat redueixi la síntesi de PGE₂ en resposta a LPS podria ser degut a la menor inducció de COX-2, o a una menor proporció de fosfolípids amb AA, ja que l'efecte inhibitori del valproat sobre la síntesi d'araquidonil-CoA és més accentuat que sobre altres acil-CoA (Bazinet et al., 2006b). Per tal de comprovar si els efectes del liti i el valproat sobre l'alliberació d'AA es deuen a alteracions en l'activitat PLA₂ o en la

seva reacció a fosfolípids, seria interessant realitzar experiments bloquejant aquest procés amb l'addició de timerosal (Kaeber et al., 1988).

2.4.3 La depleció d'inositol induïda pel liti és responsable de la inhibició en l'alliberació d'araquidonat

Segons la hipòtesi de la depleció d'inositol (Berridge et al., 1989), el liti pot reduir la senyalització per fosfoinosítids bloquejant el reciclatge dels inositol fosfats. Així, en presència de liti es formaria menys IP_3 en resposta a ET-1, i per tant es produiria una menor entrada de Ca^{2+} al citosol i en conseqüència, una menor activació de la $cPLA_2$. Per comprovar-ho, al mateix temps que els aplicàvem el liti vam pretractar part dels astròcits amb una concentració elevada d'inositol (10 mM), que es va tornar a aplicar en el moment de l'estímul amb ET-1 ($t = 0$). D'aquesta manera, tot i que el liti inhibeixi la desfosforilació de l'inositol fosfat, la cèl·lula podrà obtenir l'inositol del medi extracel·lular per mantenir els nivells necessaris de fosfoinosítids per a les vies de senyalització. Com a resultat d'aquest experiment, veiem com la complementació del medi amb inositol elimina completament l'efecte inhibitori del liti sobre l'alliberació d'araquidonat (figura R-31E), fet que ens fa pensar que aquest fenomen és degut a la depleció d'inositol provocada pel liti.

2.4.4 El liti inhibeix l'alliberació d'AA en resposta a ET-1 + ionomicina

La coestimulació amb ionomicina i ET-1 porta a una forta i prolongada entrada de Ca^{2+} extracel·lular que provoca un increment en l'alliberació d'araquidònic molt superior al que s'observa en astròcits que només són estimulats amb ET-1 (Figura R-31A). Cal pensar que si les diferències entre els astròcits control i els pretractats amb liti es deuen a una menor senyal de Ca^{2+} en resposta a ET-1, deguda a una menor mobilització de IP_3 , aquest efecte quedarà emmascarat per una entrada massiva de Ca^{2+} en presència de ionomicina. La ionomicina és un ionòfor que permet al Ca^{2+} travessar les membranes cel·lulars. Tenint en compte que la concentració de Ca^{2+} al citosol és molt inferior a la del medi de cultiu i a la d'altres compartiments intracel·lulars, l'efecte de la ionomicina es tradueix en un gran increment en els nivells de Ca^{2+} citosòlic.

Afegida als astròcits en $t = 0$, la ionomicina provoca un immediat i sostingut increment en l'alliberació d'àcid araquidònic, segurament degut a l'activació de les PLA_2 dependents de Ca^{2+} . Tal com passa amb els astròcits estimulats únicament amb ET-1, també en presència de ionomicina el pretractament amb valproat incrementa l'alliberació d'araquidonat, mentre que el liti hi produeix una clara inhibició (figura R-31C i D).

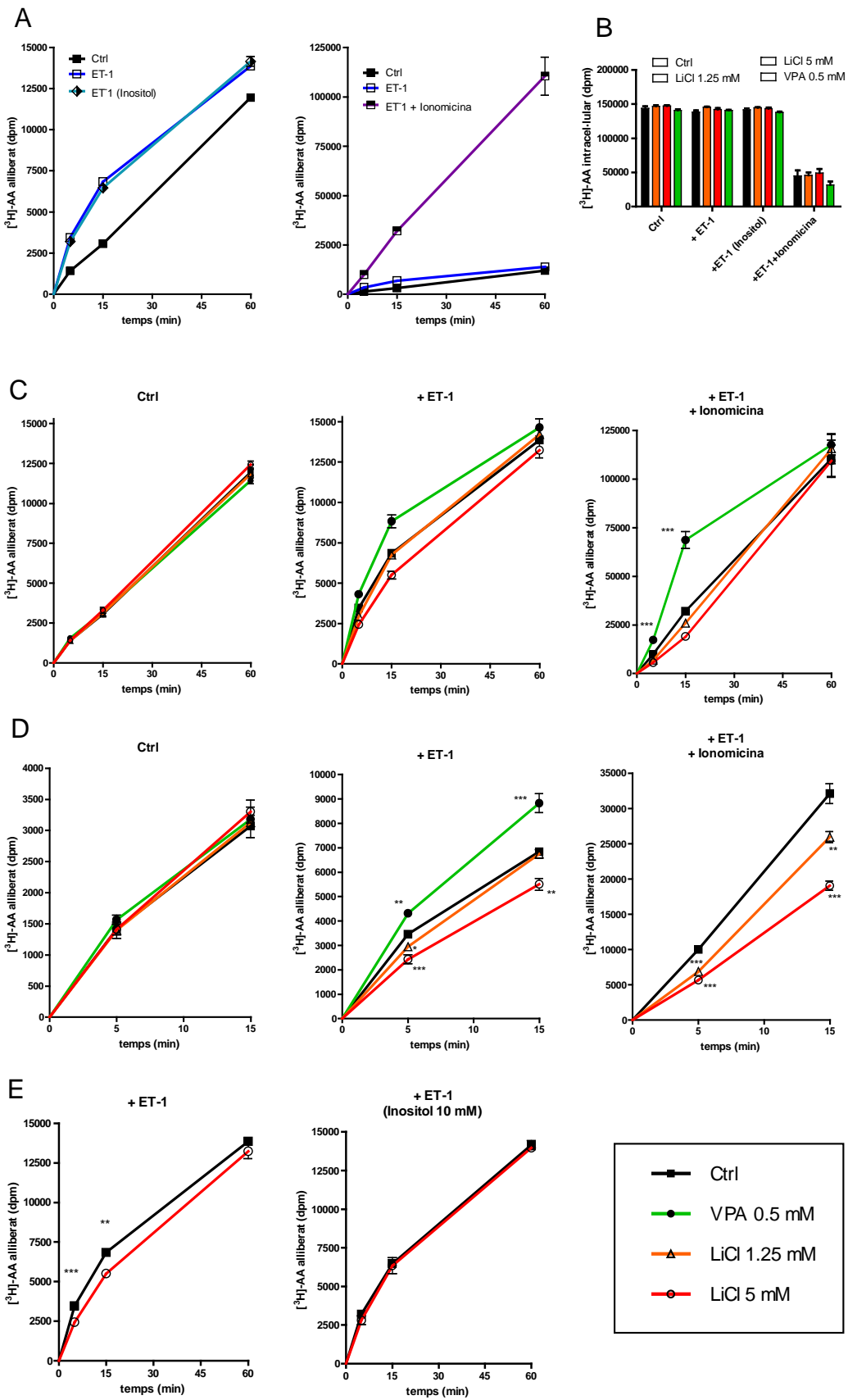


Fig R-31. Alliberació de [³H]-araquidonat. Els astròcits primaris es deixen proliferar en plaques de 24 pouets durant 2 setmanes en DMEM + 10 % FBS, i seguidament es van incubar durant 8 dies en DMEM + 0,5 % FBS els 7 últims dels quals en presència de LiCl (1.25 o 5 mM) o valproat (0.5 mM). Durant les darreres 20 hores es va afegir al medi 0.25 µCi/pouet de [³H]-araquidonat, i seguidament es van rentar els pouets i a t=0 s'hi va afegir medi nou, amb o sense ET-1 (100 nM) o ionomicina (5 µM) i es va mesurar la radioactivitat del medi als temps indicats. A) Alliberació de [³H]-araquidonat al llarg del temps en astròcits control o pretractats durant 7 dies amb inositol (10 mM) i estimulats o no amb ET-1, o amb ET-1 i ionomicina. B) Determinació de la radioactivitat intracel·lular al final de l'assaig (t=60). C) Efecte del pretractament amb LiCl o valproat sobre l'alliberació de [³H]-AA en astròcits control i estimulats amb ET-1 o amb ET-1 i ionomicina. D) ampliació dels primers 15 minuts dels panells de (C). E) Efecte del pretractament conjunt amb inositol 10 mM i LiCl 5 mM sobre l'alliberació de [³H]-AA en astròcits estimulats a t = 0 amb ET-1. Es mostra un experiment representatiu realitzat per duplicat on cada punt representa la mitjana i s.e.m. de 4 pouets (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

Si suposem que l'entrada de Ca²⁺ provocada per la ionomicina no es veu afectada pel pretractament amb liti o valproat, tal com és d'esperar en tractar-se d'un ionòfor, significa que aquests fàrmacs no actuarien modificant la senyal de Ca²⁺ que ha d'activar la cPLA₂, sinó a nivell de l'activació d'aquests enzims en resposta a un mateix increment en els nivells de Ca²⁺ citosòlic.

Per tant podem dir que tant el tractament amb liti com amb valproat modifica la resposta dels astròcits davant d'un increment en la concentració de Ca²⁺ al citosol. Tenint en compte que els senyals de Ca²⁺ són un dels principals elements implicats en la fisiologia dels astròcits (revisat a Agulhon et al., 2008), especialment pel que fa a la modulació de l'activitat neuronal, i que els derivats de l'àcid araquidònic poden estar implicats en aquest procés (Zonta et al., 2003b), no se'ns escapa que aquesta troballa pot tenir una gran rellevància per a la comprensió del mecanisme d'acció d'aquest tipus de fàrmacs.

“En totes les activitats és saludable, de tant en tant, posar un signe d’interrogació sobre aquelles coses que durant molt de temps s’ha tingut com a segures”

Bertrand Russell



Discussió

El treball d'aquesta tesi doctoral ha girat al voltant del mecanisme d'acció del liti, el fàrmac de referència en el tractament dels trastorns bipolars (revisat a Pilcher, 2003). Des que a mitjans del segle XX les propietats farmacològiques d'aquest ió van ser casualment descobertes per John Cade (Cade, 1949), la investigació biomèdica ha anat proporcionant un cúmul d'efectes neurobiològics produïts per aquesta substància en diferents models experimentals. Tot i això, encara no s'ha proposat un mecanisme plenament satisfactori per justificar les seves propietats terapèutiques, fet que dificulta el desenvolupament de nous fàrmacs (revisat a Zarate i Manji, 2008).

Les causes neurobiològiques dels trastorns bipolars continuen essent un misteri, i es poden trobar tant a nivell neuroquímic, amb l'alteració de la transmissió sinàptica, el metabolisme cel·lular, la transducció de senyals, o altres fenòmens moleculars, com a nivell neuroanatòmic, amb alteracions en els circuits neuronals que controlen l'estat d'ànim. Però independentment d'això, és obvi que el mecanisme terapèutic del liti i els altres fàrmacs emprats en el tractament de la malaltia ha de començar necessàriament pel seu efecte sobre una o varies dianes moleculars. El liti és una substància química, un ió que produeix un efecte fisicoquímic sobre el seu entorn, i és a aquest nivell on hi hem de buscar l'origen de les seves propietats terapèutiques. Relacionar els efectes bioquímics del liti amb les seves conseqüències finals sobre l'estat d'ànim del pacient, és una tasca que probablement requereix un coneixement del funcionament de la ment superior al que disposem actualment. Tot i això, el fet és que el liti funciona i que ha d'actuar necessàriament a nivell fisicoquímic, per la qual cosa cal continuar aprofundint en els efectes bioquímics que produeix el liti en diferents models experimentals.

Però, per què tot i l'abundant literatura científica en aquest camp, encara no es coneix el mecanisme molecular del liti? Una possibilitat és que aquest ja hagi estat descrit, però encara no s'hagi pogut correlacionar amb els efectes sobre l'estat d'ànim del pacient. L'altra opció és que encara no s'hagi investigat l'efecte bioquímic responsable d'aquesta acció terapèutica. Aquesta possibilitat fa que sigui necessari abordar el problema des de nous punts de vista. Dins del camp de la bioquímica i del de la neurobiologia, hi ha dues àrees que sovint han estat relegades a un paper secundari: l'estudi dels lípids i l'estudi de les cèl·lules gials. Si ens limitem a consideracions quantitatives, és obvi que per la seva elevada proporció en el sistema nerviós, tant els lípids de les membranes cel·lulars (a nivell bioquímic) com les cèl·lules gials (a nivell cel·lular), han de jugar un paper determinant en el funcionament del cervell, i per tant s'han de tenir en compte a l'hora d'estudiar els efectes d'un psicofàrmac.

En aquest sentit és significatiu que una de les principals peculiaritats del cervell humà és justament la complexitat dels seus astròcits (Oberheim et al., 2006; 2009), mentre que alguns autors defensen que l'origen del salt evolutiu entre el cervell dels grans simis i el dels humans cal cercar-lo en certes mutacions en gens implicats en el metabolisme dels lípids (Horrobin, 1999; Erren i Erren, 2004).

Així doncs queda clar que en estudiar el mecanisme d'acció d'un psicofàrmac com el liti no es pot obviar l'estudi dels seus efectes sobre el metabolisme lipídic i sobre els astròcits. Per aquest motiu vam basar el nostre treball en l'estudi dels efectes bioquímics del liti en cultius d'astròcits, principalment a nivell del metabolisme dels fosfolípids i de l'alliberació de molècules de senyalització que poguessin participar en la modulació de l'activitat sinàptica per part dels astròcits.

1 Efectes del liti sobre el metabolisme dels fosfolípids

Alteracions en el metabolisme de la PC en el context dels trastorns bipolars

Tant els trastorns bipolars com altres desordres neurològics han estat associats a alteracions en els lípids cerebrals (revisat a Piomelli et al., 2007), particularment pel que fa als fosfolípids de membrana i els àcids grassos (Horrobin, 1998). Un metabolisme lipídic anormal pot portar a canvis en les propietats de les membranes biològiques i en la producció de molècules de senyalització que alterin el funcionament de la transmissió sinàptica.

Amb l'anàlisi dels espectres de ressonància magnètica (MRS) s'han determinat canvis en les concentracions relatives de diversos components moleculars del cervell de pacients. Estudis de ^1H -MRS mostren un increment en la proporció de molècules amb colina (Cho) en ganglis basals (Lafer et al., 1994; Kato et al., 1996; Hamakawa et al., 1998), còrtex orbitofrontal i hipocamp (Senaratne et al., 2009) de pacients bipolars. En altres estudis però, no s'ha trobat alteracions en el senyal de Cho en còrtex anterior cingulat i prefrontal dorsolateral (Stoll et al., 1992; Amaral et al., 2002; Brambilla et al., 2005). La senyal de Cho de l'espectre correspon a la P-Cho i la PC, i es considera un marcador del metabolisme lipídic (Moore i Galloway, 2002). En aquest sentit és significatiu que en el model de mania en rates per administració de dextro-amfetamina (revisat a Gessa et al., 1995), que afavoreix l'alliberació de dopamina, un neurotransmissor que estimula la hidròlisi de PI-4,5-P₂ de manera sensible a liti (Undie, 1999), es produeix una reducció en la relació dels pics Cho/Cr de l'espectre de ^1H -MRS, un efecte que es veu compensat pel tractament amb liti o valproat (Silverston et al., 2004).

Així doncs, la Cho podria jugar un paper important en els trastorns bipolars, i en aquest sentit, agents que incrementen els nivells de Cho al cervell posseeixen propietats antimàniques (Cohen et al., 1982; Janowsky et al., 1973), i fins i tot la pròpia Cho ha estat emprada com a adjuvant en el tractament de pacients bipolars de cicle ràpid (Stoll et al., 1996). L'administració de Cho incrementa la PC cerebral (Millington i Wurtman, 1982), i per tant el consum d'ATP per a la seva síntesi. En pacients tractats amb liti, el cotractament amb Cho produeix una reducció en els nivells de purines que és consistent amb una disminució dels nivells d'ATP, fet que podria estar relacionat amb els seus efectes antimànics (Lyo et al., 2003). L'activitat mitocondrial és essencial per al metabolisme dels fosfolípids, fins al punt que es calcula que el 10-15% de tot l'ATP consumit al cervell es consumeix en el manteniment de l'asimetria en els fosfolípids de membrana i en l'activació dels àcids grassos lliures a acil-CoA (Purdon i Rapoport, 1998). S'ha proposat que en l'etiologia dels trastorns bipolars hi intervenen certes alteracions de la funció mitocondrial (revisat a Quiroz et al., 2008), i tenint en compte el paper primordial que hi juguen els fosfolípids, les alteracions que hi produeixen els estabilitzadors de l'estat d'ànim podrien contribuir a restituir l'activitat mitocondrial. En aquest sentit, s'ha descrit que tant l'etanolamina (Etn) com la P-Etn, però no la Cho, la PC o la PE, inhibeixen la funció mitocondrial in vitro, fet que s'ha relacionat amb la fisiopatologia dels trastorns bipolars (Modica-Napolitano i Renshaw, 2004). Per tant seria interessant comprovar si la reducció en la taxa de síntesi de PE que observem en els astròcits tractats amb liti, va acompanyada d'una alteració en els nivells d'Etn o P-Etn.

Mitjançant l'anàlisi de la composició lipídica de mostres de cervell postmortem, un estudi recent mostra alteracions específiques en els nivells de PC, àcids grassos i ceramides associades als trastorns bipolars i a l'esquizofrènia (Schwarz et al., 2009). Així, els cervells de pacients bipolars i esquizofrènics mostren uns nivells superiors d'àcids grassos lliures tant en matèria gris com blanca, i de ceramida en matèria blanca. En canvi els nivells de PC es troben incrementats en matèria gris i blanca de pacients bipolars, mentre que els pacients amb esquizofrènia presenten un increment en els nivells de PC en matèria gris i una reducció en matèria blanca. Aquesta reducció en els nivells de PC ja havia estat associada a l'esquizofrènia per altres autors (Yao et al., 2000; Schmitt et al., 2004), i podria ser deguda a un increment en el recanvi de l'esfingomielina, especialment abundant en la mielina. Si bé les alteracions en els nivells d'àcids grassos lliures no estarien influenciades per la teràpia farmacològica rebuda, els nivells de PC en matèria gris de pacients no tractats són similars als controls, indicant que l'increment observat en la PC en matèria gris de pacients bipolars i

esquizofrènic és degut al tractament. Aquest fet concorda amb l'increment dels nivells de PC en mostres perifèriques de pacients esquizofrènic com a conseqüència de la teràpia farmacològica (Kaddurah-Daouk et al., 2007).

Efectes del liti sobre la síntesi de PtdCho

Si bé la senyalització per derivats dels fosfoinosítids ha centrat bona part de l'atenció de les investigacions al voltant del liti (revisat a Halstead, 2005), hi ha molts altres aspectes del metabolisme dels lípids que poden estar alterats en diverses patologies del sistema nerviós (revisat a Adibhatla i Hatcher, 2008). En experiments previs del nostre grup (Ramos, 2002b), havíem observat que el liti incrementava la velocitat de síntesi de PC, fet que ens va decidir a submergir-nos en l'estudi d'aquest fenomen.

Els resultats que hem obtingut en cultius d'astròcits suggereixen que el tractament amb liti afavoreix la biosíntesi de PC incrementant la velocitat de la ruta de Kennedy. Aquest efecte augmenta en incrementar la concentració de liti, i ja es mostra significatiu a concentracions terapèuticament rellevants (1 mM), fet que ens fa pensar que es podria produir en el cervell dels pacients tractats amb liti. Aparentment aquest efecte té lloc en dues fases: un primer increment que apareix immediatament després de l'addició de liti, seguit d'un augment més important en la velocitat de síntesi de PC que s'observa a temps de tractament més llargs, i que es manté almenys durant els 14 dies durant els que hem allargat el tractament.

Una qüestió que no ha quedat ben resolta és per quin mecanisme el liti incrementa la síntesi de PC. És possible que el liti actuï directament sobre l'activitat d'algun dels enzims de la ruta de Kennedy, per la qual cosa seria interessant realitzar assaigs *in vitro*, però el fet que l'efecte del liti augmenti a temps de pretractament llargs, fa difícil que aquest sigui el seu únic mecanisme d'acció.

Un punt interessant és la qüestió de la captació cel·lular del Li^+ . Es creu que el Li^+ podria ser internalitzat per l'intercanviador Na^+/H^+ i per la bomba Na^+/K^+ , que també participaria en la seva sortida de la cèl·lula (Orlowski, 1993; Walz i Hertz, 1982). En astròcits tractats amb LiCl (1 i 2 mM) s'observa un ràpid increment en els nivells de Li^+ intracel·lulars, tot i que la concentració de Li^+ extracel·lular quadruplica la intracel·lular (Song et al., 2008). A partir d'aquí els astròcits es van enriquir lentament en liti, fins a assolir, a les 3 setmanes de tractament, una concentració intracel·lular de Li^+ corresponent a la meitat de la concentració extracel·lular. Aquest fet podria explicar perquè l'efecte del liti sobre la síntesi de PC augmenta en incrementar el temps de pretractament, i podria estar relacionat amb el retard en

l'aparició d'efectes beneficiosos en els pacients. Tot i això, és probable que l'augment en l'efecte del liti observat a temps de pretractament superiors a 1 dia sigui degut a canvis en l'expressió gènica o a l'acumulació progressiva d'alguna alteració produïda pel liti.

Mecanisme d'acció del liti

S'ha descrit que el liti altera nombroses vies de senyalització cel·lular, de manera que és probable que alguna d'aquestes afecti als sistemes de regulació de la síntesi de PC, provocant un augment en la seva biosíntesi. Les dues principals dianes moleculars del liti són la inhibició de la IMPasa i de la GSK-3 (revisat a Harwood i Agam, 2003). Mentre que amb el tractament dels astròcits amb un inhibidor selectiu de la GSK-3 no observem un increment en la síntesi de PC, amb l'addició d'inositol exogen, un mètode àmpliament utilitzat per discriminar aquells efectes del liti produïts per la depleció d'inositol induïda per la inhibició de la IMPasa (revisat a Harwood, 2005), observem una reducció en l'efecte del liti, fet que ens fa pensar que aquest fenomen contribueix, almenys parcialment, en l'estimulació de la síntesi de PC provocada pel liti. Faran falta noves aproximacions experimentals per tal de determinar si aquest és realment el mecanisme pel que el liti incrementa la síntesi de PC.

El fet que la reversió de l'efecte amb l'addició inositol no sigui total podria ser degut a una restauració incompleta dels nivells d'inositol intracel·lular en realitzar l'addició exògena d'aquest compost. Els nivells d'inositol al cervell són especialment elevats en astròcits (Brand et al., 1993), que l'incorporen més ràpidament que les neurones (Glanville et al., 1989), tot i que entre aquestes hi ha una gran heterogeneïtat en quant a l'inositol (revisat Fisher et al., 2002). Hi ha evidències que en astròcits, però no en neurones, existeix una compartimentalització de l'inositol cel·lular en diferents reservoris (revisat a Wolfson et al., 2000), on l'inositol emprat en senyalització és independent del que participa en regulació osmòtica (Bersudsky et al., 1994). Tot plegat podria implicar que els astròcits fossin especialment sensibles al bloqueig de la IMPasa, i que es produís una depleció considerable en certs reservoris d'inositol que alterés significativament el cicle dels fosfoinosítids en determinades regions de l'astròcit, sense que l'aportació exògena d'inositol pugui compensar completament aquest dèficit.

Per altra banda, juntament amb la inhibició de la IMPasa, és possible que altres dianes moleculars del liti menys estudiades contribueixin al seu efecte sobre la síntesi de PC, o que estigui actuant sobre alguna diana molecular que encara no ha estat descrita. En aquest sentit,

l'estudi de l'efecte del liti sobre la síntesi de PC podria ser una eina experimental útil per a la detectar noves dianes moleculars del liti.

El liti és un ió que es troba a molt baixa concentració a la biosfera, motiu pel qual els organismes no han evolucionat per incorporar-lo a la seva fisiologia cel·lular. Això fa que la presència de liti a una concentració relativament elevada pugui alterar significativament el sistema cel·lular a diferents nivells. Un dels principals paràmetres que defineixen les propietats dels ions en solució aquosa és la seva relació càrrega/radi. Amb una càrrega positiva i un radi iònic relativament petit, el Li^+ té una relació càrrega/radi molt similar a la del Mg^{2+} , fet que els confereix propietats similars. En aquest sentit cal destacar el fet que tant la GSK-3 com la IMPasa empenen Mg^{2+} per la seva activitat, i que el liti les inhibeix justament desplaçant aquest Mg^{2+} (revisat a Harwood i Agam, 2003). Molts dels enzims que catalitzen reaccions on hi intervé l'ATP, utilitzen el Mg^{2+} per estabilitzar les càrregues negatives d'aquesta molècula al seu centre actiu, i per tant podrien ser susceptibles de ser alterats pel liti. Tot i això, els enzims que s'han mostrat sensibles a liti a concentracions terapèutiques, posseeixen llocs d'unió a Mg^{2+} de baixa afinitat, d'un tipus que només es coneixen per les fosfomonoesterases com la IMPasa i per les GSK-3 (revisat a Harwood i Agam, 2003), però no es pot descartar que en determinades condicions el liti interfereixi en el mecanisme d'altres enzims dependents de Mg^{2+} . Una altra possibilitat seria que el Li^+ , més que actuar selectivament sobre determinades proteïnes, simplement amb la seva presència provoqués una pertorbació fisicoquímica en l'homeòstasi iònica, o sobre determinades molècules carregades, com ara els fosfolípids, que acabés afectant determinats processos moleculars de la cel·lula.

Si bé queda clar que els astròcits tractats amb liti experimenten un increment en la ruta de Kennedy, no podem afirmar amb rotunditat quin dels seus passos es veu afectat pel liti en primer terme. En la majoria de condicions, s'accepta que el pas limitant per a la síntesi de PC és la conversió de P-Cho a CDP-Cho catalitzada per la CCT (revisat a Kent, 2005). Aquest és també el principal punt de control de la ruta, per la qual cosa és d'esperar que el liti actuï a nivell d'aquesta reacció. Els nostres resultats indiquen que això és així pel que fa a l'efecte agut del liti, però no hem pogut realitzar experiments per demostrar-ho per l'efecte crònic, de major magnitud. Si bé l'explicació més lògica continua sent aquesta, no podem descartar que el liti actuï sobre un altre procés. En aquest sentit, hem observat que els astròcits tractats amb liti experimenten un increment en la recaptació de Cho extracel·lular. En ser recaptada, la Cho és fosforilada per la CK, de manera que una major recaptació de Cho es traduirà en una major disponibilitat de P-Cho. En comparació a altres metabòlits de Cho, els nivells de P-Cho

cel·lulars ja són molt elevats en condicions normals, ja que el seu consum per la CCT és relativament lent, de manera que no sembla que un increment en els nivells de P-Cho s'hagi de traduir en un increment en la velocitat de síntesi de PC. Per tant, ens sembla que l'alteració de la recaptació de colina és més una conseqüència que la causa dels efectes de liti sobre la síntesi de PC. Un raonament similar es pot fer pel que fa a la CK, que si veu incrementada la seva activitat provocarà una acumulació de P-Cho que no hauria de fer variar ostensiblement l'activitat CCT. Finalment, la darrera reacció de la ruta, on la CDP-Cho reacciona amb DAG per formar la PC, tampoc és considerada un punt de regulació de la ruta, ja que un increment en l'activitat CPT portaria a una disminució dels nivells de CDP-Cho, que si no es veu compensada per la CCT no hauria d'afectar significativament a la velocitat global de la via. Això és vàlid si considerem la CDP-Cho com l'únic factor limitant de la reacció, però en algunes situacions s'ha observat que la síntesi de PC es veu governada pels nivells de DAG (Araki i Wurtman, 1997; Jamil et al., 1992). En aquest sentit és interessant destacar que en presència de DiC8, que provoca una fort increment en la síntesi de PC, l'efecte del liti pràcticament desapareix, indicant que el liti podria actuar incrementant els nivells de DAG disponible pels astròcits per a la síntesi de PC, en unes condicions on aquesta molècula seria el reactiu limitant. Tot i això, el DAG és també un dels principals activadors de la CCT (Kolesnick i Hemer, 1990; Slack et al., 1991), per la qual cosa un canvi en els nivells de DAG cel·lulars probablement no afectarà la síntesi de PC com a substrat, sinó actuant a nivell de la translocació a membranes i activació de la CCT, per la qual cosa aquest podria ser el procés afavorit pel liti.

Alteracions del metabolisme dels glicerofosfolípids en astròcits tractats amb liti

És interessant destacar el fet que el liti no actua únicament sobre el metabolisme de la PC sinó que acaba provocant una alteració general del metabolisme dels fosfolípids. Així, mentre que la síntesi de PC es veu afavorida pel tractament amb liti, el PI i sobretot la PE, sofreixen una reducció en la seva velocitat de síntesi. Això ens fa pensar que el liti provoca un reajustament del metabolisme dels fosfolípids, portant la cèl·lula a un nou equilibri on s'afavoreix la incorporació d'alguns caps polars en sn-3 en detriment d'altres.

La inhibició de la síntesi de PI provocada pel liti és l'eix sobre el que es justifica la hipòtesi de la depleció d'inositol (Berridge, 1989). Segons aquesta, el liti podria atenuar una excessiva activació de la senyalització pel sistema PI-4,5-P₂/PLC, inhibint la IMPasa, fet que bloquejaria el reciclatge de l'IP₃ format per la PLC, i faria disminuir els nivells d'inositol fins al punt de reduir la síntesi de PI, i per tant reduir la senyalització per fosfoinosítids (figura I-3).

Partint d'aquesta hipòtesi, podem pensar que, en els nostres astròcits, la inhibició de la IMPasa per part del liti provoca una disminució dels nivells d'inositol lliure i això es tradueix en la lleu inhibició de la síntesi de PI que hi observem. Aquesta menor síntesi de PI per manca d'inositol, produirà una acumulació de CDP-DAG tal com s'ha descrit en alguns models experimentals (Stubbs i Agranoff, 1993). És probable que la cèl·lula respongui a aquesta anomalia afavorint les rutes biosintètiques basades en la formació de DAG en detriment d'aquelles basades en la formació de més CDP-DAG (revisat a Kent, 1995). Si tenim en compte que el principal fosfolípid sintetitzat a partir de DAG és la PC, podem suposar que en inhibir el reciclatge d'inositol, el liti provoca una disminució en la síntesi de PI, que provoca una acumulació de CDP-DAG, fet que produeix una reconducció de les vies de síntesi de fosfolípids cap a les de la branca del DAG, afavorint la síntesi de PC. En aquest sentit són d'especial interès els estudis realitzats amb rates tractades conjuntament amb liti, que inhibeix la IMPasa, i pilocarpina, que estimula la degradació del PI-4,5-P₂, fet que els indueix una sèrie de convulsions que es poden evitar amb l'administració d'inositol (Kofman et al., 1993). Una possibilitat a tenir en compte és que aquests atacs podrien ser deguts a una prolongació temporal en l'increment de DAG produït per la hidròlisi del PI-4,5-P₂, degut a la menor capacitat de consumir CDP-DAG per a la síntesi de PI.

Així, durant un cert temps la nostra hipòtesi de treball era que en inhibir la IMPasa i la síntesi de PI, es produïa un excés de DAG en la cèl·lula que era compensat amb una major síntesi de PC. Però hi havia diversos punts que trontollaven, com ara que la inhibició de la síntesi de PI no es revertís amb l'aportació d'inositol, i el fet que el liti també inhibís la síntesi de PE.

Per explicar l'efecte que observem en la PE hem d'interrogar-nos sobre com s'hi incorpora el ³²P. La PE cel·lular es sintetitza principalment per la via de la CDP-Etn i per la descarboxilació de la PS (revisat a Vance, 2008). El ³²P de la PE sintetitzada per descarboxilació de la PS provindrà de molècules de [³²P]-PS formades a partir de [³²P]-PC per l'intercanvi del grup colina per L-serina catalitzat la PSS1. La població de molècules de [³²P]-PC respecte la PC total del ER, el lloc d'actuació de la PSS1 (revisat a Vance, 2008), serà molt reduïda, de manera que la probabilitat que una molècula de PE formada per descarboxilació de la PS incorpori el ³²P durant el temps de marcatge serà molt petita. Això fa pensar que la [³²P]-PE s'haurà format principalment per la via de la CDP-Etn, i per tant és aquest procés el que es troba inhibit pel liti. Ara bé, si tal com suposàvem, la major disponibilitat de DAG provocada per la inhibició de la síntesi de PI fos la causant de la major

síntesi de PC, per què la PE, que també es sintetitza a partir de DAG per la via de la CDP-Etn no només no es veu igualment afavorida sinó que sofreix una forta inhibició en la seva síntesi?

Una explicació rau en el mecanisme pel que un increment en els nivells de DAG pot acabar afavorint la síntesi de PC. El nostre primer supòsit era que el DAG que no s'envia cap a la formació de CDP-DAG per a la síntesi de PI, és emprat com a substrat per a la síntesi de PC. Però aquest hauria de poder ser emprat també per a la síntesi de PE, fet que no encaixa amb l'efecte observat. Una de les principals diferències entre la via de la CDP-Cho i la de la CDP-Etn és que mentre que la CCT, l'enzim limitant de la primera, és activat per DAG (Kolesnick i Hemer, 1990; Slack et al., 1991), no es té constància que això succeeixi amb l'enzim anàleg per a la síntesi de CDP-Etn, la CET (Bleijerveld et al., 2004). Per tant, un increment en els nivells de DAG podria resultar en una sobreactivació de la CCT, augmentant la producció de CDP-Cho sense que es modifiquessin els nivells de CDP-Etn. Tenint en compte que la PE es sintetitza al ER per acció de la CEPT, un enzim que uneix al DAG tant la CDP-Etn com la CDP-Cho per donar lloc a PE i PC (Henneberry i McMaster, 1999), un increment en la producció de CDP-Cho resultarà en una major producció de PC i menor de PE.

Aquesta explicació topa amb un problema experimental. Per a la síntesi de PE per la via de la CDP-Etn la cèl·lula necessita incorporar etanolamina, un component que no forma part del medi de cultiu emprat en els nostres experiments (DMEM D5796, Sigma). Si bé tant la ruta de la CDP-Etn com la de la descarboxilació de la PS són necessàries durant el desenvolupament embrionari (Fullerton et al., 2007; Steenbergen, et al., 2005), molts tipus cel·lulars poden créixer en cultiu sense necessitat d'etanolamina exògena, obtenint la seva PE per descarboxilació de la PS. Si aquesta és la única via per la que els nostres cultius d'astròcits sintetitzen la PE, haurà de ser la ruta inhibida pel tractament amb liti. Tot i això, no podem descartar que la ruta de la CDP-Etn també hi tingui lloc, a partir d'etanolamina provinent de l'FBS o de la hidròlisi de la PE dels astròcits, i que aquest sigui el principal procés pel que la PE és marcada amb $[^{32}\text{P}]\text{-P}_i$, i per tant sigui la via inhibida pel liti pel mecanisme de competició de la CDP-Cho amb la CDP-Etn que hem proposat. En aquest sentit és interessant destacar que la relació $[^{32}\text{P}]\text{-PE}/[^{32}\text{P}]\text{-PC}$ en els experiments realitzats en tampó Krebs sense fosfat, és molt menor a l'obtinguda en els experiments on es mantenia el medi de cultiu, fet que podria indicar l'existència d'una aportació externa d'etanolamina que permeti la síntesi de PE per la via de la CDP-Etn. Serà necessari realitzar nous experiments, complementant el DMEM amb etanolamina, i realitzant marcatges amb $[^3\text{H}]\text{-etanolamina}$ per tal de resoldre aquesta qüestió.

L'altre obstacle per a l'acceptació del mecanisme que consideràvem responsable de l'augment en la síntesi de PC en resposta a la inhibició de la síntesi de PI, era que si bé amb l'aportació d'inositol aconseguíem revertir parcialment l'increment en la velocitat de síntesi de PC produït pel liti, no es produïa un increment en la síntesi de PI, que suposadament es trobava inhibida per la depleció d'inositol que provoca el liti en inhibir la IMPasa. Aquesta és justament la principal objecció que ha rebut la hipòtesi de la depleció d'inositol per explicar els efectes terapèutics del liti: no s'ha pogut demostrar inequívocament que la disminució en els nivells d'inositol provocada pel liti es tradueixi en una reducció en la síntesi de PI, i conseqüentment, en la senyalització per fosfoinosítids (revisat a Harwood, 2005).

Per tant ens vam proposar abordar el fenomen des del punt de vista invers: l'increment en la velocitat de síntesi de PC era la causa de la inhibició en la síntesi de PI? Un major consum de DAG per a la síntesi de PC es podria traduir en una menor disposició de CDP-DAG per a la de PI, provocant una inhibició en la seva síntesi. Aquesta hipòtesi concorda amb la forta inhibició observada en la síntesi de PE, que es podria deure a una inhibició de la via de la CDP-Etn, que es troba limitada tant per l'activitat CET com per la disponibilitat de DAG com a substrat (Bleijerveld et al., 2004). Així doncs, si el liti manté sobreactivada la síntesi de PC, es podria produir una disminució en els nivells de DAG, tal com s'ha descrit en cèl·lules tractades amb activadors de la CCT (Lagace i Ridgway 2005). Per altra banda, en analitzar els experiments de marcatge metabòlic, s'ha de tenir en compte que el [^{32}P]-P_i s'incorpora a la ruta de síntesi de PI a nivell del PA, i no en la reacció de la PI sintasa. El [^{32}P]-PA es formarà per síntesi *de novo*, per hidròlisi de la [^{32}P]-PC per part de la PLD o bé per la fosforilació del DAG amb [γ - ^{32}P]-ATP catalitzada per la DAGK. En relació a la PC total accessible a la PLD, els nivells de [^{32}P]-PC seran reduïts, i en tot cas, seran superiors en els astròcits tractats amb liti, de manera que, a no ser que el liti inhibeixi la PLD, l'aportació de [^{32}P]-PA per a la síntesi de PI a partir de la hidròlisi del [^{32}P]-PC no hauria de veure's reduïda amb el tractament amb liti. En canvi, si suposem que el liti incrementa el consum de DAG per a la síntesi de PC, hi haurà menys DAG disponible per la DAGK per sintetitzar [^{32}P]-PA, i en conseqüència es reduirà la síntesi de [^{32}P]-CDP-DAG i de [^{32}P]-PI, tal com observem. Si el factor limitant per a la síntesi de PI en astròcits tractats amb liti no és l'inositol sinó el CDP-DAG, s'entén perquè l'addició d'inositol no reverteix la inhibició observada en la seva síntesi.

Els nostres resultats preliminars mostren que el liti podria estar reduint els nivells de DAG dels astròcits, però caldrà realitzar més experiments per confirmar aquesta possibilitat. El DAG de les membranes biològiques prové principalment de la hidròlisi del PI-4,5-P₂ per la

PLC i de la PC per l'acció seqüencial de la PLD i la PAP (Dennis et al., 1991; Hodgkin et al., 1998). Si bé aquest DAG produït per senyals extracel·lulars apareix principalment a la membrana plasmàtica, d'on serà eliminat per acció de les DAGK, s'ha comprovat que pot ser transportat al ER per ser emprat per a la síntesi de TAG o fosfolípids (Pagano et al., 1985; Igal et al., 2001). Així, una sobreactivació de la síntesi de PC produïda pel liti podria portar a una disminució en els nivells del DAG produït per cascades de senyalització, fet que tindria una gran transcendència per a la comprensió del mecanisme d'acció del liti, que s'ha proposat que podria estar relacionat amb la inhibició de l'activitat PKC (revisat a Catapano i Manji, 2008; Arnsten et al., 2009). El DAG pot activar les PKC, i altres proteïnes amb dominis C1, promovent la seva translocació a membrana (Kishimoto et al., 1980; Ono et al., 1989), un procés que es veu reduït pel liti (Wang et al., 2001), i incrementat en cervells *postmortem* de pacients bipolars (Wang i Friedman, 2001). Cal destacar el fet que s'han realitzat estudis clínics que mostren una reducció significativa en els símptomes de mania en pacients bipolars tractats amb un inhibidor de la PKC (Bebchuk et al., 2000; Zarate et al., 2007).

La implicació de la senyalització per DAG/PKC amb els trastorns bipolars es fa palesa pel fet que dos estudis independents associen el gen de la DAG quinasa eta (DAGKH), que participa en l'eliminació del DAG per aturar la seva cascada de senyalització, amb el risc de patir trastorns bipolars (Baum et al., 2008; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). La DAGKB, per la seva banda, s'expressa en oligodendròcits i en cervell de rata mostra un patró d'expressió que la relaciona amb àrees implicades en l'emoció i cognició (Goto i Kondo, 1999). En humans, el gen de la DGKB pot generar múltiples isoformes per *splicing* alternatiu, i són d'especial interès aquelles que mostren una delecció de 35 aminoàcids en C-terminal, ja que en pacients amb trastorns bipolars s'hi ha detectat preferentment aquest tipus de mRNA (Caricasole et al., 2002). Sobreexpressades en cèl·lules COS, la DGKB completa es transloca a membranes en resposta a ésters de forbol, mentre que la versió truncada no es transloca correctament, tot i que manté la presència de dominis C1.

El DAG (i els seus anàlegs sintètics) actua a nivell presinàptic com a potenciador de la neurotransmissió, incrementant transitòriament l'alliberació de neurotransmissors segons el mecanisme conegut com a potenciació sinàptica (revisat a Zucker i Regehr, 2002), possiblement incrementant el nombre de vesícules alliberables (Virmani et al., 2005) o l'eficiència d'alliberació (Lou et al., 2005). L'acció presinàptica del DAG es coopera amb altres formes de plasticitat presinàptica, potenciant l'efecte del Ca^{2+} residual, incrementant la taxa d'alliberació espontània de neurotransmissors (Lou et al., 2005; Micheva et al., 2001). La

PKC, la principal diana del DAG, fosforila diverses proteïnes involucrades en l'alliberació de neurotransmissors, entre les que destaca Munc-18 (Barclay et al., 2003). Per altra banda, el DAG i els ésters de forbol també activen directament Munc-13, una proteïna que conté un domini C1 i que coopera amb la PKC per potenciar la transmissió presinàptica (Wierda et al., 2007).

Els efectes inhibitoris del liti sobre l'activitat PKC s'han explicat principalment a nivell de canvis en l'expressió de diverses isoformes de la PKC, i per la reducció en la senyalització per PI-4,5-P₂/PLC degut a la menor disponibilitat de PI-4,5-P₂ provocada per la inhibició de la síntesi de PI (revisat a Catapano i Manji, 2008). Tot i la popularitat d'aquest darrer mecanisme, no està clar que realment el liti inhibeixi aquest sistema de senyalització (veure apartat 2.2.4 de la Introducció), i d'altra banda, la inhibició de la síntesi de PI per depleció d'inositol va lligada a una acumulació de CDP-DAG (Godfrey, 1989), que podria implicar un augment en els nivells de DAG que incrementaria l'activitat PKC. Per altra banda, una downregulació de certes isoformes de la PKC (Manji i Lenox, 1999), podria resultar beneficiosa en cas d'un excés de DAG produït per un dèficit en l'activitat DAGK, però no interferiria en altres processos regulats pels nivells de DAG, com l'activació de Munc-13. En canvi, la síntesi de PC és una de les principals rutes de consum de DAG, i per tant, un increment en aquest procés podria compensar els efectes d'una alteració en l'eliminació del DAG.

Per tant, una hipotètica disminució dels nivells de DAG provocada per la sobreactivació de la ruta de Kennedy en astròcits tractats amb liti tindria importants implicacions en la comprensió del seu mecanisme terapèutic, i permetria explicar la inhibició que observem en la síntesi de PE i de PI, així com d'altres aspectes del fenotip observat que es discutiran més endavant. Però tenint en compte que el DAG és un substrat i un dels principals activadors de la síntesi de PC, és compatible aquesta reducció en els nivells de DAG amb l'increment sostingut en la síntesi de PC? Aquesta aparent contradicció podria ser salvada si tenim en compte la compartimentalització cel·lular dels processos implicats.

Tot i que existeix un transport continu de lípids entre les diferents membranes cel·lulars, cal esperar que aquesta hipotètica depleció de DAG sigui especialment important en els llocs on es consumeix per a la síntesi de PC, és al dir, al ER i al Golgi, on es troben la CEPT i la CPT (Henneberry et al., 2002; Tian et al., 2008). En aquests compartiments, una disminució dels nivells de DAG podria afectar els processos que depenen de la proporció de DAG a la membrana, sense que la seva disminució alterés la síntesi de PC per manca de substrat, ja que

es considera que el factor limitant per a la CPT no és el DAG sinó la CDP-Cho. En canvi, serà important que es mantinguin uns nivells suficientment elevats de DAG en els llocs on es trobi la CCT, per tal de permetre la seva activació per translocació a membranes. La CCT α , la principal isoforma responsable de la síntesi de CDP-Cho, es troba majoritàriament al nucli, tot i que també s'ha detectat en el citosol i microsomes (revisat a Jackowski i Fagone, 2005). Si bé s'havia proposat que la CCT α del nucli forma un reservori inactiu que s'envia al citosol en situacions d'elevada demanda de PC (Northwood et al., 1999), nombrosos autors afirmen que la seva activitat es produeix principalment al nucli (DeLong et al., 2000; Hunt i Postle, 2004), on s'activa per translocació a les membranes de l'embolcall nuclear (Gehrig et al., 2009). D'aquesta manera un increment en la velocitat de la ruta de Kennedy podria produir una disminució en els nivells de DAG del ER i el Golgi, sense afectar als del nucli, de manera que s'hi podria mantenir incrementada l'activitat de la CCT α (Figura D-1).

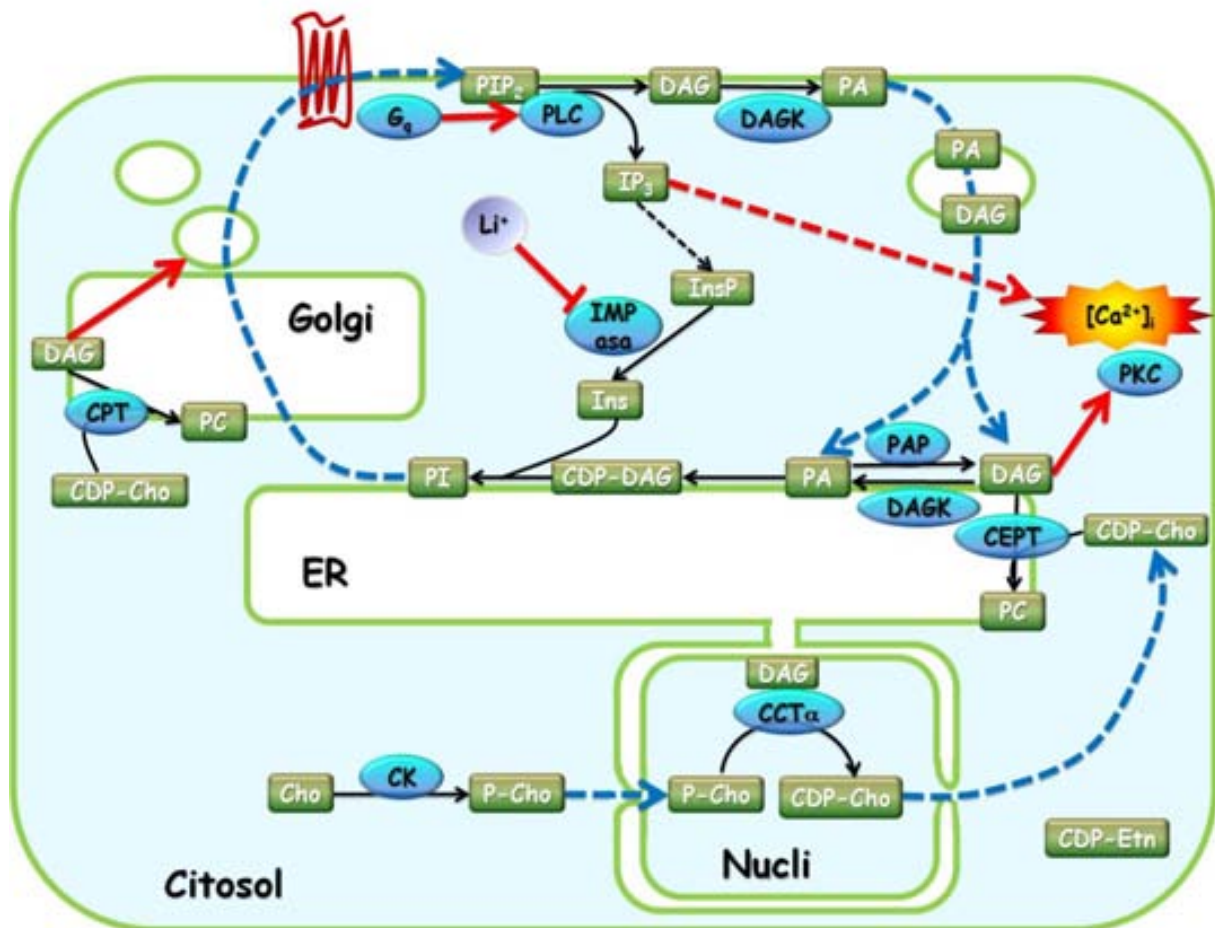


Figura D-1. Hipòtesi de la depleció de DAG en astròcits tractats amb liti. Un increment en la velocitat de síntesi de PC en resposta al liti comporta un increment en el consum de DAG en el Golgi i reticle, fet que pot contribuir a atenuar una excessiva senyalització dependent de DAG. Els nivells de DAG nuclears no es veuran afectats per la síntesi de PC de manera que la CCT α es podrà mantenir activa en aquest compartiment tot i que disminueixin els nivells de DAG del ER i Golgi.

En aquest punt se'ns planteja quin és el mecanisme pel qual el liti podria mantenir una CCT α sobreactivada al nucli. Hem comprovat que la inhibició de la síntesi de PI causada pel liti no es reverteix amb l'addició d'inositol, fet que ens fa pensar que és una conseqüència de la depleció de DAG causada pel liti en incrementar la síntesi de PC. Sorprenentment, aquest increment en la síntesi de PC si que es veu parcialment revertit amb l'addició d'inositol, fet que indica que una de les seves causes seria la inhibició de la IMPasa per part del liti. Un increment en els nivells de DAG causat pel bloqueig del cicle del PI ens havia semblat una explicació plausible per aquest fenomen, però tal com s'ha explicat, no sembla compatible amb altres aspectes del fenotip observat. Però, seria possible que la inhibició de la IMPasa produís un increment en els nivells de DAG de certs compartiments, on s'activaria la CCT, provocant un increment en la síntesi de PC i per tant una reducció en els nivells de DAG dels llocs on es sintetitza aquest fosfolípid?

A més de a la membrana plasmàtica i al Golgi (revisat a Lev, 2006), el DAG també pot ser generat al nucli (revisat a Irvine, 2002; Goto et al., 2006). És interessant ressaltar el fet que, independentment del citosòlic, existeix un cicle del PI al nucli, on s'ha detectat la presència de diverses PI quinases que permeten la síntesi dels principals fosfoinosítids, així com DAGKs i PLCs (revisat a Bunce et al., 2006; Visnjic i Banfic, 2007). En cèl·lules Swiss 3T3 estimulades amb IGF, es produeix un increment en la hidròlisi del PI-4,5-P₂ nuclear i dels nivells de DAG (Divecha et al., 1991) gràcies a l'activació de la PI-PLC- β 1 produïda per la seva fosforilació per ERK, entre altres factors. La PI-PLC- β 1 conté una regió de localització nuclear en la seva seqüència, però altres isoformes de la PLC, com la PLC- γ 1 poden ser translocades al nucli en determinades situacions. El DAG format al nucli, capta diverses isoformes de la PKC, algunes de les quals poden fosforilar i inhibir la pròpia PI-PLC- β 1. Un dels rols de l'IP₃ alliberat al nucli podria ser el de precursor de formes altament fosforilades de l'inositol, que participen en diversos processos nuclears. Els nivells de DAG nuclears es veuen incrementats durant la fase G2 del cicle cel·lular per acció de la PLC- β 1, un procés essencial que en ser bloquejat provoca l'arrest de les cèl·lules en G2/M (Lukinovic-Skudar et al., 2005). En aquest sentit crida l'atenció que en un treball previ del nostre grup es va demostrar que el tractament amb liti arrestava el cicle cel·lular, d'astròcits sincronitzats, en G2/M per un mecanisme independent de la inhibició de GSK-3 (Pardo et al., 2003), de manera que, coneixent la capacitat del liti d'interferir en el cicle del PI, és possible que estigués actuant sobre aquest procés nuclear. Així doncs, reduint els nivells d'inositol, el liti podria interferir tant el cicle dels fosfoinosítids citosòlic com en el nuclear, provocant una

inhibició en la síntesi de PI i una acumulació de CDP-DAG i possiblement de DAG en ambdós compartiments. Ara bé, aquest increment en els nivells de DAG nuclears produiria una sobreactivació de la CCT α , incrementant la velocitat de síntesi de PC, i per tant, el consum de DAG en el Golgi i el ER, fet que produiria una disminució en la síntesi de PI, de PE i l'atenuació de les vies de senyalització citosòliques dependents de DAG, com ara l'activació de les PKC.

Aquest model permetria, a partir de la coneguda inhibició de la IMPasa, explicar bona part dels efectes observats amb el tractament dels astròcits amb liti. Tot i això, caldran més experiments per confirmar aquesta hipòtesi, i seria especialment interessant analitzar els efectes del liti sobre els nivells absoluts de DAG en els diferents compartiments subcel·lulars, per tal de comprovar si la fracció nuclear i microsomal mostren un comportament invers. Per altra banda, encara es desconeixen molts dels aspectes clau del metabolisme lipídic nuclear, i seria de gran interès esbrinar si a més de la DAGK, el nucli presenta activitat CDP-DAG sintasa i PI sintasa, elements clau per tancar el cicle dels fosfoinosítids i essencials per a la nostra hipòtesi, o bé importen el PI del ER, ja sigui per difusió o per proteïnes transportadores. En tot cas, l'existència de dos cicles dels fosfoinosítids independents ha de ser presa en consideració a l'hora d'estudiar els efectes del liti, ja que és probable que mostrin propietats diferents en quant a la influència de la inhibició de la IMPasa, o la capacitat de restituir els nivells d'inositol amb inositol exogen.

Efectes del liti sobre la biosíntesi de colesterol i àcids grassos

El tractament dels astròcits amb liti també produeix una forta reducció en la incorporació de [^{14}C]-acetat a colesterol i a fosfolípids, probablement actuant a nivell de la biosíntesi d'àcids grassos. Tant els àcids grassos que s'incorporaran als fosfolípids com el colesterol, es sintetitzen a partir d'acetil-CoA. Tot i això, a partir d'aquí les seves rutes de síntesi no comparteixen cap altre enzim que pugui ser la diana del liti per inhibir la síntesi d'ambdós tipus de molècules. Per tant, si el liti inhibeix tant la incorporació de [^{14}C]-acetat a fosfolípids com a colesterol, significa que o bé actua a nivell de la producció d'acetil-CoA, és a dir inhibint l'acetil-CoA sintasa, o bé provoca la inhibició d'enzims tant de la via de síntesi de colesterol com de la de síntesi d'àcids grassos. Si es dóna aquesta darrera possibilitat, el més raonable seria pensar que més que inhibir directament aquests enzims, el liti estaria afectant alguna via de senyalització que regulés tant la síntesi de colesterol com la d'àcids grassos. Els SREBPs són una família de factors de transcripció que controlen la biosíntesi de colesterol i d'àcids grassos (revisat a Camargo et al., 2009), per la qual cosa podrien ser els responsables

de l'acció del liti. En aquest sentit, és interessant el fet que el valproat redueix la incorporació de glicerol, mevalonat i lactat a esterols i glicerolípidis en diferents regions del CNS, fet que podria interferir en l'activitat neuronal (Bolanos i Medina, 1997). Per altra banda, s'ha observat que la inducció d'estrès reticular incrementa la biosíntesi i captació de lípids mitjançant l'activació de SREBPs produint una acumulació de lípids en la cèl·lula (Werstuck et al., 2001), i els mateixos autors han comprovat que el valproat protegeix les cèl·lules i bloqueja la formació del fragment actiu de SREBP-2 en resposta a estrès reticular, evitant l'acumulació de colesterol, un efecte que també observen amb liti i amb un inhibidor selectiu de la GSK-3 (Kim et al., 2004). Per tant, seria interessant comprovar si els efectes del liti sobre la incorporació de [^{14}C]-acetat a lípids en cultius d'astròcits, són deguts a la inhibició de la GSK-3, i si els SREBPs hi estan implicats.

Una altra possibilitat a tenir en compte, és que el persistent increment en el metabolisme de la PC produït pel liti podria resultar en un augment del consum d'ATP que afectés l'estat energètic de la cèl·lula. Aquest fet podria portar a un increment en els nivells d'AMP que provocaria l'activació de la AMPK, fet que produiria una inhibició en les biosíntesi d'àcids grassos (revisat a Kahn et al., 2005).

2 Efectes del liti sobre l'alliberació de senyals químics

El liti incrementa la secreció de TNF- α

En la segona part de la tesi s'han exposat els nostres resultats obtinguts provocant una resposta inflamatòria, amb lipopolisacàrid bacterià (LPS), en cultius primaris enriquits en astròcits. L'interès per aquest model experimental ens va venir arran dels resultats obtinguts en una col·laboració del nostre grup amb el de la Dra. Jackowski del St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA), que mostraven que el procés de secreció de TNF- α en macròfags estimulats amb LPS requeria de la síntesi de PC (Tian et al., 2008). La delecció del gen de la CCT α en macròfags alterava la via secretòria provocant l'acumulació de les citocines com el TNF- α al Golgi. Partint d'aquests resultats vam hipotetitzar que el tractament amb liti, en incrementar la síntesi de PC, podria estar estimulando l'alliberació de citocines afavorint el transport de vesícules del Golgi a la membrana plasmàtica. La constatació experimental que el tractament amb liti incrementava l'alliberació de TNF- α en resposta a LPS ens va convèncer de la necessitat d'explorar aquesta hipòtesi. Vist en perspectiva sembla que hauria estat més raonable verificar en primer lloc si l'efecte del liti sobre la secreció de TNF- α era degut a una major activació en la resposta inflamatòria dels

astròcits davant de l'LPS. En aquell moment però, ens trobàvem submergits en els experiments amb medi condicionat amb liti, a la cerca d'algun factor alliberat pels astròcits tractats amb liti que activés la síntesi de PC, i creïem que el liti podria estar alterant l'activitat del Golgi, motiu pel qual ens trobàvem amb una gran predisposició a acceptar hipòtesis que relacionessin l'acció del liti amb canvis en la via secretòria.

En incorporar-me al laboratori de la doctora Corda, de gran experiència en l'estudi del paper dels fosfolípids en el trànsit intermembranal, per tal de dur a terme els experiments que havien de relacionar el tractament amb liti amb fenòmens de trànsit intermembranal, em vaig anar adonant dels febles fonaments sobre els que reposava la nostra hipòtesi. Sense gaires esperances d'èxit vaig realitzar els experiments de transport de la proteïna VSVG des de l'aparell de Golgi a la membrana plasmàtica, amb els que no vam observar un increment en el transport de vesícules secretores en els astròcits tractats amb liti. De fet, si es produeix algun efecte és el contrari al que esperàvem trobar: un alentiment en la via secretòria. Caldria realitzar més experiments per confirmar aquest fenomen però, si realment el liti inhibeix l'exportació de vesícules del Golgi, un possible mecanisme per explicar-ho seria la reducció en els nivells de DAG del Golgi com a conseqüència de la major velocitat de síntesi de PC. El balanç entre la formació i consum de DAG és essencial per als diferents processos que tenen lloc al Golgi (revisat a Fang et al., 1998). El DAG del Golgi es formarà per desfosforilació del PA produït per l'acció de la PLD sobre la PC, per s'esfingomielina sintasa, que produeix SM i DAG consumint PC i ceramida, o per hidròlisi de fosfoinosítids per la PLC. El consum del DAG també es produirà per tres vies: la conversió de l'SM a PC, consumint DAG i alliberant ceramida, la fosforilació del DAG a PA per la DAGK, i per la via de Kennedy per a la síntesi de PC. Així, un increment en la síntesi de PC pot produir una disminució en els nivells de DAG que inhibeixi la secreció de vesícules del Golgi (Litvak et al., 2005).

El TNF- α i la neuroinflamació en el context dels trastorns bipolars

Els trastorns bipolars podrien ser la conseqüència d'un sistema immunoinflamatori alterat. En aquest sentit s'ha relacionat l'expressió aberrant de certs gens inflamatoris amb els trastorns bipolars (Padmos et al., 2008), i s'ha descrit anomalies en la producció de citokines proinflamatories en individus amb trastorns bipolars. Així en cultius de monòcits de pacients s'observa una menor producció de IL-1 β i major de IL-6 en resposta a LPS (Knijff et al., 2007), i s'han detectat concentracions de TNF- α augmentades en sèrum o plasma de pacients bipolars (Kim et al., 2007; Ortiz-Dominguez et al., 2007; O'Brien et al., 2006), així com un increment en els nivells dels seus receptors (Haack et al., 1999). D'aquesta manera les causes

fisiopatològiques dels trastorns bipolars podrien trobar-se en desequilibris entre les citokines pro- i antiinflamatòries. En estats de mania s'han descrit increments en els nivells de TNF- α , IL-2 i INF- γ en relació a IL-4 (Kim et al., 2007). Tot i això, fins al moment no s'han realitzat anàlisis dels nivells de citokines en fluid cerebroespinal de pacients bipolars, tot i que hi ha evidències d'increments en citokines proinflamatòries en depressió unipolar (Levine et al., 1999).

Dins de les diferents citokines que actuen al CNS, les alteracions en el sistema de senyalització per TNF- α han estat especialment relacionades amb els trastorns bipolars i la depressió (revisat a Brietzke i Kapczinski, 2008). Els receptors de TNF- α s'expressen en teixit cerebral, i a més de les seves funcions en supervivència i inflamació, estan implicats en múltiples aspectes de la transmissió sinàptica (revisat a Khairova et al., 2009). La injecció de citokines proinflamatòries com el TNF- α en rosegadors produeix un fenotip amb símptomes similars als de la depressió, amb anorèxia, trastorns del son, defectes neurocognitius i fatiga (revisat a Dantzer et al., 2008). Els nivells de TNF- α en plasma de pacients bipolars es troben augmentats tant durant les fases depressives, com de mania, i probablement durant les fases d'eutímia (O'Brien et al., 2006; Kim et al., 2007; Ortiz-Domínguez et al., 2007), i alguns components de la senyalització per TNF- α han estat genèticament associats als trastorns bipolars BD (Czerski et al., 2008; Pae et al., 2004; Meira-Lima et al., 2003). Alguns treballs mostren una reducció en la producció de TNF- α , IL-1 β i IL-6 en limfòcits i monòcits aïllats de pacients tractats amb liti (Boufidou et al., 2004; Padmos et al., 2008). S'ha proposat que anticossos antagonistes del TNF- α (revisat a Tracey et al., 2008), que ja s'empren en alguns desordres immunoinflamatoris (artritis reumatoïde o malaltia de Crohn), podrien ser beneficiosos pel tractament dels trastorns bipolars i la depressió (revisat a Soczynska et al., 2009). S'han descrit millores en els símptomes depressius i cognitius en pacients no psiquiàtrics tractats amb antagonistes del TNF- α , però encara no s'ha establert la seva eficàcia en trastorns de l'estat d'ànim.

Així doncs, nombrosos estudis apunten a una relació entre una excessiva senyalització per TNF- α i l'aparició de depressió. En canvi, els nostres resultats mostren que el liti incrementa la secreció de TNF- α en astròcits, fet que pot semblar contraproductiu. Tot i això, podria ser que l'efecte prodepressiu del TNF- α fos beneficiós per al tractament de la mania, i que el liti n'incrementés la seva secreció especialment durant els episodis de mania. En aquest sentit són interessants les observacions que a finals del s. XX va realitzar el psiquiatre austríac Wagner-Jauregg, al voltant d'una sèrie de pacients que experimentaven una remissió dels seus

síntomes psicòtics en patir un procés infecció, com ara febre tifoide. Aquesta observació va portar al desenvolupament de la teràpia de malalts mentals amb la inoculació de paràsits de la malària, fet que va portar a l'atorgació del Premi Nobel de Medicina (1927) a Wagner-Jauregg. Els efectes beneficiosos d'aquest tractament es podrien deure a reajustaments en l'homeòstasi dels elements de la senyalització inflamatòria (revisat a Kapczinski et al., 2008).

Efectes del liti sobre la resposta inflamatòria dels astròcits

Els efectes del liti sobre elements de la resposta inflamatòria que, a diferència del TNF- α , no depenen de la via secretòria, com la producció de PGE₂ o de NO, ens va acabar de convèncer que l'efecte del liti sobre la secreció de TNF- α calia buscar-lo a nivell dels processos que regulen la resposta a LPS en astròcits, més que en una hipotètica acceleració del transport intermembranal. Tot i això, els nostres resultats mostren que la secreció de TNF- α pot ser bloquejada, independentment de la resta de manifestacions de la resposta inflamatòria, amb el tractament amb propranolol, un inhibidor de la PA fosfatasa que provoca una reducció en els nivells de DAG, tal com ja s'havia descrit (Tian et al., 2008), però també amb l'aportació extra de DAG, en forma de dioctanoilglicerol (DiC8), fet que suggereix que els canvis en els nivells de DAG, tant en sentit positiu com negatiu, poden interferir en el correcte transport de les vesícules de secreció. És especialment destacable que el tractament amb DiC8, que redueix dràsticament l'efecte del liti sobre la síntesi de PC, elimina totalment l'efecte del liti sobre la secreció de TNF- α i l'expressió de COX-2. Aquest fet podria indicar que en ambdós casos el liti actua a nivell de la senyalització per DAG.

Un punt interessant és que el liti incrementa la toxicitat de l'LPS, possiblement degut a la major alliberació de TNF- α , una citocina proinflamatòria que en certes condicions pot induir mort cel·lular. Tot i que les propietats neuroprotectores del liti són ben conegudes (revisat a Chuang, 2005), en alguns casos pot produir efectes neurotòxics, de manera que no està clar quin és el balanç final del tractament amb liti sobre la supervivència neuronal (revisat a Fountoulakis et al., 2008). En aquesta qüestió es produeix una discrepància evident entre la ciència bàsica i la pràctica clínica: mentre que la majoria de treballs realitzats en animals o cultius cel·lulars mostren clarament els efectes citoprotectors del liti, els estudis clínics en humans fan èmfasi principalment en les seves propietats neurotòxiques.

No hem explorat sistemàticament els mecanismes pels que el liti incrementa la resposta inflamatòria en astròcits. El promotor del gen de la COX-2 conté diversos llocs putatius de regulació, com *cAMP response element*, *IL-6 response element*, AP-2, NF- κ B, Sp-1, PEA-3,

GATA-1 i *glucocorticoid response element* (revisat a Wu, 1995). Per altra banda, un punt que seria important estudiar és el rol de la micròglia en els efectes proinflamatoris del liti observats en cultius primaris d'astròcits. Aquests cultius solen contenir una fracció de cèl·lules microglijals, que juguen un paper determinant en la resposta immune del CNS, i la seva presència i nombre, no s'ha de menystenir a l'hora d'estudiar la resposta del cultiu al tractament amb agents inflamatoris (revisat a Saura, 2007). En cultius primaris enriquits en micròglia, les cèl·lules responen a l'LPS amb canvis morfològics i un increment en la secreció de citokines i òxid nítric (NO) (Zielasek et al., 1992). En cultius d'astròcits també s'observa secreció de citokines en resposta a LPS, però hi ha controvèrsia pel que fa a l'NO. Alguns autors defensen que l'NO és produït tant pels astròcits com per la micròglia present en el cultiu (Galea et al., 1992), mentre que en altres estudis es restringeix a la micròglia l'expressió de iNOS i la subseqüent síntesi de NO, (Yang et al., 1998). En cèl·lules C6, una línia cel·lular de glioma, la inducció de iNOS només s'aconsegueix si el tractament amb LPS (o amb TNF- α o IL-1 β) es fa conjuntament amb IFN γ (revisat a Nomura, 2001). L'LPS seria suficient per activar la via de l'NF-kB, però per a la inducció de iNOS es fa necessari també activar la via Jak2/Stat1 α per part de l'IFN γ .

Deixant de banda el mecanisme molecular i cel·lular que desencadena l'efecte proinflamatori del liti, els nostres resultats indiquen que aquest es manifesta significativament en tractar els astròcits amb dosis lleugerament superiors a la finestra terapèutica del liti. El tractament de pacients bipolars amb liti ha de ser estretament monitoritzat ja que el seu rang d'efectivitat és extremadament estret, amb dosis tòxiques del mateix ordre que les terapèutiques (revisat a Timmer i Sands, 1999). Aquest fet sovint no es té prou en compte a l'hora d'estudiar els efectes del liti en els diferents models experimentals, fins al punt que és probable que molts dels efectes descrits en la literatura científica estiguin més relacionats amb les seves propietats tòxiques que amb les terapèutiques i aquest podria ser el cas de l'increment en la secreció de senyals proinflamatoris que hem observat. En aquest sentit, el tractament amb liti incrementa l'expressió de GFAP i altera la morfologia dels processos en astròcits d'hipocamp de rates, indicant una possible reactivitat astrocitària (Rocha et al., 1998; Rocha and Rodnight, 1994).

L'efecte dual del liti sobre l'alliberació de PGE₂

Una de les nostres observacions més interessants és el fet que en aplicar als astròcits dosis de liti similars a les terapèutiques (1.25 mM), observem una reducció en la producció de PGE₂ en resposta a LPS, l'efecte contrari al que es dona amb dosis més elevades de liti. Aquest estrany fenomen es pot explicar per l'efecte antagònic del liti sobre dos dels elements que

participen en la producció de PGE₂: la COX-2 i l'àcid araquidònic (AA). El liti incrementa l'expressió de COX-2 en resposta a LPS, però al mateix temps inhibeix l'alliberació d'AA. Ambdós efectes augmenten amb la concentració de liti, però sembla que a concentracions terapèutiques la contribució més important seria la inhibició de la producció d'AA, fet que es traduiria en una reducció dels nivells de PGE₂, mentre que a concentracions de liti més elevades, l'efecte sobre la PGE₂ vindria governat per l'increment en la inducció de COX-2. Aquest efecte dual del liti pot estar relacionat amb l'estret marge de concentracions entre les quals el liti passa de ser beneficiós a ser tòxic. Els nivells de Li⁺ en sang recomanats per al tractament dels trastorns bipolars oscil·len entre els 0.8 i 1.5 mM, tot i que concentracions superiors a 1.2 mM ja són potencialment tòxiques, de manera que per al tractament profilàctic es recomana mantenir-les entre 0.6 i 0.9 mM (revisat a Timmer RT, Sands, 1999). En aquest sentit, s'ha descrit que el tractament amb tacrina en rates pretractades amb liti provoca convulsions i dany hipocampal, possiblement a causa d'un increment en els nivells de COX-2 i de PGE₂ anterior a l'aparició de convulsions (Paoletti et al., 1998).

Tot i el caràcter antagònic de l'efecte dual que observem en relació a la PGE₂, tenint en compte que el liti resulta beneficiós tant pel tractament de la depressió com de la mania, podria ser que en funció de l'estat del pacient predominés l'efecte potenciador o inhibidor de la síntesi de PGE₂, compensant possibles alteracions en aquest sistema de senyalització. En aquest sentit és significatiu que s'ha detectat una disminució en l'expressió de la PGE sintasa en certes regions corticals de pacients bipolars, que no es mostra en pacients que segueixen la medicació en el moment de la seva mort (Maida et al., 2006). Per contra, s'ha detectat un increment en els nivells de PGE₂ en plasma, fluid cerebroespinal i saliva de pacients deprimits (Lieb et al., 1983; Linnoila et al., 1983; Nishino et al., 1989). En tot cas, el fet que la resta de fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim amb els que hem tractat els astròcits (valproat, carbamazepina i lamotrigina), també produeixen una reducció en l'alliberació de PGE₂, dóna pes a la rellevància terapèutica d'aquest fenomen.

S'ha proposat inhibir directament la COX-2 com a teràpia pels trastorns bipolars (revisat a Rapoport i Bosetti, 2002). Sembla que l'aspirina podria tenir certes propietats com a estabilitzadora de l'estat d'ànim (revisat a Ketterer et al., 1996), o com a complement de la fluoxetina en depressió unipolar (Mendlewicz et al., 2006), mentre que el celecoxib es mostra com un complement útil per a la teràpia antidepressiva amb reboxetina (Muller et al., 2006; Kauer-Sant'Anna et al., 2008). Un estudi clínic en pacients bipolars mostra que el tractament

adjuntiu amb celecoxib produeix una ràpida aparició dels efectes antidepressius en pacients que experimentaven episodis depressius o mixtes (Nery et al., 2008).

Inhibició de l'alliberació d'àcid araquidònic en respostes a senyals de calci

La inhibició en l'alliberació d'AA en astròcits tractats amb liti no s'observa en condicions basals sinó en resposta a estímuls que produeixin un increment en la $[Ca^{2+}]$ citosòlica, com la endotelina-1 (ET-1) o la ionomicina. En un primer moment havíem pensat que l'efecte del liti sobre l'alliberació d'AA en resposta a ET-1 es devia a una menor producció de IP_3 deguda a la depleció d'inositol, fet que portaria a un senyal de Ca^{2+} més feble, i per tant, una menor activació de les cPLA₂. En aquest sentit, el tractament amb liti atenua els senyals de Ca^{2+} induïts per noradrenalina o trombina en cultius primaris d'astròcits (Chen i Hertz, 1996; Kagaya et al., 2000), o induïts per serotonina en cèl·lules C6 de glioma (Yamaji et al., 1997). Tot i això, el fet que el tractament amb liti també inhibeixi l'alliberació d'AA en resposta a un ionòfor com la ionomicina, indica que, més que disminuir la senyal de Ca^{2+} , el liti redueix l'alliberació d'AA en resposta a una mateixa oscil·lació del Ca^{2+} citosòlic. Tot i que s'ha descrit que el tractament amb liti produeix una disminució en els nivells de cPLA₂ cerebrals en rates (Rintala et al., 1999) els nostres resultats no mostren cap canvi important en la seva expressió en astròcits tractats amb liti. Per altra banda, un treball realitzat en cultius d'astròcits tractats durant 1-4 setmanes amb LiCl, valproat o carbamazepina descriu un increment en l'expressió de cPLA₂, tot i que en el cas del liti la sobreexpressió només s'observa a les 2 setmanes de tractament, i a les 3-4 setmanes s'acaba produint una reducció en els nivells de cPLA₂ (Li et al., 2007). En el nostre cas, que no observem diferències en l'expressió de cPLA₂, la menor alliberació d'AA en resposta a Ca^{2+} podria ser deguda a canvis en els nivells de fosforilació de la cPLA₂, especialment a nivell de la Ser505, implicada en l'activació de l'enzim (Gubern et al., 2008). Per altra banda, es coneix que la presència de DAG crea una pertorbació en la membrana que afavoreix l'acció de certes fosfolipases sobre els fosfolípids (revisat a Gómez-Fernández i Corbalán-García, 2007), de manera que el DAG amb àcids grassos insaturats de cadena llarga incrementa l'activitat PLA₂ (Dawson et al., 1983; 1984), fet que, juntament amb la capacitat del DAG d'inhibir la lisofosfatidat aciltransferasa (Goppelt-Strube et al., 1987) afavoreix la síntesi de derivats de l'AA. Per tant, la reducció dels nivells de DAG que hem hipotetitzat també podria ser responsable de la menor alliberació d'AA en astròcits tractats amb liti, per un mecanisme independent dels nivells d'expressió de la cPLA₂. En tot cas, la reversió de l'efecte en

astròcits complementats amb inositol indicaria que aquest efecte està relacionat amb la inhibició de la IMPasa.

Els nostres resultats estan en consonància amb la hipòtesi que relaciona els trastorns bipolars amb alteracions en la senyalització per AA (revisat a Sublette et al., 2004, Rao et al., 2008). Rapoport i col·laboradors han realitzat nombroses aportacions a aquest camp, detectant que, en rates tractades amb liti, valproat o carbamazepina, es produeix una reducció en la producció de PGE₂ i en el recanvi de l'AA, sense que el recanvi del DHA (àcid docosahexaenoic) es vegi alterat (revisat a Rao et al., 2008). A grans trets, els derivats dels àcids grassos omega-3, com el DHA, promouen efectes antagònics als dels omega-6, com l'AA (revisat a Serhan i Savill, 2005; Kang and Weylandt, 2008), fet que fa pensar que els fàrmacs estabilitzadors de l'estat d'ànim podrien actuar desplaçant el balanç d'aquestes rutes de senyalització en favor dels efectes de la cascada del DHA en detriment de la de l'AA. En aquest sentit, la privació d'àcids grassos poliinsaturats n-3 en rates incrementa els seu comportament agressiu i depressiu (DeMar et al., 2006), i aquest comportament es veu associat a un increment en els nivells i l'activitat cPLA₂, i en els nivells de COX-2 al còrtex frontal (Rao et al., 2007c). El consum d'àcids grassos omega-3 redueix la producció d'icosanoids i de TNF- α , IL-1 i IL-6, i l'expressió de molècules d'adhesió (revisat a Calder, 2006). Algunes revisions resumeixen els possibles beneficis clínics de tractar els pacients bipolars amb àcids grassos omega-3 com el DHA (Bourre, 2005; Freeman, 2000; Sinclair et al., 2007; Stoll et al., 1999). Cal tenir en compte que els nivells de DHA en la dieta occidental són especialment reduïts (Denomme et al., 2005; Stark et al., 2005) i que pacients bipolars mostren un baix contingut de DHA en eritròcits (Chiu et al., 2003).

Els antidepressius poden induir mania quan són administrats a un pacient bipolar (Yatham et al., 2005; Ghaemi et al., 2003; 2004; Post et al., 2006). En aquest sentit, al contrari que els fàrmacs antibipolars, la fluoxetina incrementa l'activitat cPLA₂ en còrtex de rata, els seus nivells de proteïna i mRNA, i el recanvi de l'AA en fosfolípids cerebrals, però no altera els nivells de COX-2 ni de PGE₂ (Lee et al., 2006; Rao et al., 2006). La fluvoxamina, un altre antidepressiu inhibidor de la recaptació de serotonina, també incrementa l'activitat PLA₂ en còrtex de rata (Kucia et al., 2003). De manera similar al nostre model in vitro, alguns dels treballs del grup de Rapoport es basen en la infusió intracerebroventricular de lipopolisacàrid bacterià en rates, on observen que incrementa els nivells de PGE₂, l'activitat cPLA₂, la incorporació d'AA a fosfolípids i el seu recanvi, uns efectes que són bloquejats pel pretractament amb liti (Basselin et al., 2007).

Sigui quin sigui el seu mecanisme d'acció, la qüestió és que liti modifica la resposta de l'astròcit a les senyals de Ca^{2+} . Tenint en compte que les oscil·lacions de Ca^{2+} són el principal mecanisme que controla l'activitat dels astròcits, aquest resultat dona pes a la hipòtesi que relaciona les propietats terapèutiques d'aquest fàrmac amb la modulació de l'activitat dels astròcits. S'han descrit alteracions en la morfologia i reduccions en la quantitat de cèl·lules glials associades als trastorns bipolars (revisat a Brauch et al., 2006), fet que distingiria els trastorns bipolars dels desordres neurodegeneratius marcats per pèrdues neuronals i increments en la densitat glial (revisat a Rajkowska, 2002). Per altra banda, l'anàlisi postmortem del còrtex prefrontal dorsolateral mostra un increment en els nivells de glutamat (Glu) associat als trastorns bipolars (Lan et al., 2008), i paral·lelament, per 1H -MRS s'ha detectat una elevada taxa Gln/Glu en pacients en estats de mania (Öngür et al., 2008), mentre que en depressió unipolar s'observa l'efecte invers (Sanacora et al., 2004), fet que suggereix una relació entre l'estat d'ànim del pacient i la relació Gln/Glu, i que podria indicar que en pacients bipolars, més que un defecte o excés en aquest neurotransmissor, s'hi produïrien alteracions en la regulació de la seva homeòstasi. El Glu alliberat per les neurones és recaptat pels astròcits i convertit a Gln que s'envia a les neurones, de manera que la relació Gln/Glu dona informació de la integritat de la sinapsi glutamatèrgica i l'acoblament neurona-astròcit. Si paral·lelament tenim en compte que els astròcits poden modular l'alliberació neuronal de Glu (revisat a Hertz i Zielke, 2004), és factible que els trastorns bipolars estiguin relacionats amb l'alteració de les interaccions astròcit-neurona.

S'ha descrit que en resposta a oscil·lacions de Ca^{2+} , els astròcits alliberen PGE_2 , una molècula que pot estar implicada en la modulació de l'activitat sinàptica, actuant sobre els seus receptors en neurones (Zonta et al., 2003b). L'alliberació de PGE_2 en astròcits estimulats amb agonistes dels seus GPCRs, és de magnitud i radi d'acció reduïda, de manera que és difícil que pugui ser detectada per immunoassaigs sobre mostres del medi de cultiu. Ara bé, tot i que aquesta situació és molt llunyana als nostres experiments, on induïm una producció massiva de PGE_2 amb el tractament amb LPS, aquests indiquen que l'efecte del liti sobre l'alliberació d'AA podria provocar una reducció en l'alliberació de PGE_2 en resposta a oscil·lacions de Ca^{2+} . Es creu que en condicions fisiològiques, la PGE_2 produïda pels astròcits, juntament amb altres icosanoids, participa en el control del flux sanguini cerebral (revisat a Iadecola i Nedergaard, 2007). Un augment en l'activitat sinàptica d'una determinada zona del cervell es tradueix en una major irrigació sanguínia (hiperèmia), un procés en el que els astròcits hi jugarien un paper determinant. Els astròcits poden detectar un increment en

l'activitat sinàptica mitjançant els seus GPCRs, que desencadenaran senyals de Ca^{2+} que portaran a l'alliberació de PGE_2 i altres icosanoids, produint una dilatació dels vasos adjacents que afavorirà la irrigació sanguínia d'aquella regió. Creiem que si durant els episodis patològics dels trastorns bipolars es produeix una sobreactivació de determinades àrees cerebrals, és possible que el liti, inhibint la capacitat dels astròcits d'alliberar derivats de l'AA en resposta a senyals de calci, redueixi l'augment d'irrigació d'aquella zona, produint una pèrdua energètica en les neurones sobreactivades que les retorni al seu estat basal.

Així doncs, amb aquest treball hem mostrat que el liti i els altres fàrmacs emprats en el tractament dels trastorns bipolars produeixen una sèrie d'alteracions en la fisiologia dels astròcits que poden estar implicades en el seu mecanisme terapèutic. La possible reducció en els nivells de DAG produïts per l'increment en la síntesi de PC pot ser un nou mecanisme per explicar els efectes inhibitoris del liti sobre la senyalització per PKC. Per altra banda, l'efecte comú dels estabilitzadors de l'estat d'ànim sobre l'alliberació de PGE_2 , indica que aquest pot ser un dels elements clau de la seva acció terapèutica, que podria estar relacionada amb alteracions en l'alliberació de derivats de l'AA en resposta a senyals de Ca^{2+} en astròcits.

“Si tu te tomas la vida en serio
estás perdido”

Albert Pla



Conclusions

Capítol I

- El liti incrementa la síntesi de fosfatidilcolina tant en astròcits com en neurones. Aquest efecte ja es mostra significatiu a concentracions terapèutiques, i es deu a la potenciació de la ruta de Kennedy, probablement actuant a nivell de la CCT.
- L'increment en la síntesi de fosfatidilcolina provocat pel liti no es tradueix en un increment en els nivells de fosfatidilcolina totals, indicant que el liti potencia el recanvi de la fosfatidilcolina, afavorint tant les vies biosintètiques com de degradació.
- La depleció d'inositol produïda pel liti en inhibir la IMPasa contribueix als seus efectes sobre la síntesi de fosfatidilcolina, mentre que la inhibició de la GSK-3 no hi estaria relacionada.
- El tractament amb liti inhibeix la síntesi de fosfatidilinositol i, en major grau, de fosfatidiletanolamina.
- De manera similar al liti, el tractament amb valproat i amb carbamazepina provoca una reducció en la velocitat de síntesi de fosfatidilinositol i de fosfatidiletanolamina en astròcits, però l'efecte d'aquests fàrmacs sobre la síntesi de fosfatidilcolina és de sentit oposat al del liti.
- El tractament crònic amb liti redueix la síntesi *de novo* d'àcids grassos i de colesterol en astròcits.
- Els efectes produïts pel liti sobre el metabolisme dels fosfolípids indiquen que la potenciació de la ruta de Kennedy podria resultar en una reducció dels nivells de diacilglicerol de certs compartiments cel·lulars. Aquest fenomen podria traduir-se en una menor capacitat d'activació de les PKC dependents de diacilglicerol, fet que tindria gran rellevància per la comprensió del mecanisme terapèutic del liti.

Capítol II

- La secreció de TNF- α per part d'astròcits estimulats amb LPS es veu incrementada pel tractament amb liti.
- La major alliberació de TNF- α no es deu a un increment en el transport de vesícules de secreció des de l'aparell de Golgi a la membrana plasmàtica.
- El tractament amb liti a dosis superiors a les terapèutiques incrementa la resposta inflamatòria dels astròcits davant l'LPS, fet que es manifesta amb una major alliberació de TNF- α , de NO i de PGE₂.
- El tractament dels astròcits amb dosis de liti, valproat, carbamazepina o lamotrigina, terapèuticament rellevants, redueix l'alliberació de PGE₂ en resposta a LPS, fet que representa un efecte comú dels quatre principals fàrmacs emprats en el tractament dels trastorns bipolars.
- Els efectes del valproat, la carbamazepina i la lamotrigina sobre l'alliberació de PGE₂ s'expliquen per una menor inducció de COX-2 en resposta a LPS.
- El tractament amb liti incrementa la inducció de COX-2 en resposta a LPS, però inhibeix la producció d'àcid araquidònic, el seu substrat per a la producció de PGE₂, en resposta a estímuls que provoquen increments de la concentració citosòlica de Ca²⁺. És especialment rellevant que el liti modifiqui la resposta dels astròcits als senyals de calci, el principal element regulador de l'activitat d'aquestes cèl·lules.

“Llegir, després de certa edat, desvia massa la ment de la seva recerca creativa. Qualsevol home que llegeix molt i empra poc el seu propi cervell, cau en hàbits mandrosos de pensament”

Albert Einstein



Bibliografia

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan;7(1):41-53.
- Abe M, Herzog ED, Block GD. Lithium lengthens the circadian period of individual suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroreport*. 2000 Sep 28;11(14):3261-4.
- Adibhatla RM, and Hatcher JF. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem. Res*. 2005; 30: 15–23.
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Larsen EC, Chen X, Sun D, and Tsao FH. 2006. CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A2 and CTP:phosphocholine cytidyltransferase after stroke. *J. Biol. Chem*. 281: 6718–6725.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E. Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci*. 2002 Nov 1;22(21):9430-44.
- Akiskal HS, Djenderedjian AM, Rosenthal RH, Khani MK. Cyclothymic disorder: validating criteria for inclusion in the bipolar affective group. *Am J Psychiatry*. 1977 Nov;134(11):1227-33.
- Allen JA, Halverson-Tamboli RA & Rasenick MM. Lipid raft microdomains and neurotransmittersignalling. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8, 128–140.
- Allison JH, Blisner ME, Holland WH, Hipps PP, Sherman WR. Increased brain myo-inositol 1-phosphate in lithium-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976 Jul 26;71(2):664-70.
- Allison JH, Stewart MA. Reduced brain inositol in lithium-treated rats. *Nat New Biol*. 1971 Oct 27;233(43):267-8.
- Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001; 36, 165–79
- Altshuler LL, Bartzokis G, Grieder T, Curran J, Jimenez T, Leight K, Wilkins J, Gerner R, Mintz J. An MRI study of temporal lobe structures in men with bipolar disorder or schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000 Jul 15;48(2):147-62.
- Amaral JAMS, Lafer B, Tamada RS, Issler CK, Cerri GG, de Castro CC A HMRS study of the anterior cingulate gyrus in euthymic bipolar patients taking lithium. *Biological Psychiatry*. 2002; 51S, 87.
- Anderson CM, and Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 2000; 32, 1–14.
- Andreasson KI, Savonenko A, Vidensky S, Goellner JJ, Zhang Y, Shaffer A, Kaufmann WE, Worley PF, Isakson P, Markowska AL. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *J Neurosci*. 2001 Oct 15;21(20):8198-209.
- Andreopoulos S, Wasserman M, Woo K, Li PP, Warsh JJ. Chronic lithium treatment of B lymphoblasts from bipolar disorder patients reduces transient receptor potential channel 3 levels. *Pharmacogenomics J*. 2004;4(6):365-73.
- Angst J, Marneros A. Bipolarity from ancient to modern times: conception, birth and rebirth. *J Affect Disord*. 2001 Dec;67(1-3):3-19.
- Antonsson, B. 1997. Phosphatidylinositol synthase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta*. 1348: 179–186.
- Aoyama C, Liao H, Ishidate K. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res*. 2004 May;43(3):266-81.
- Araki W, Wurtman RJ. Control of membrane phosphatidylcholine biosynthesis by diacylglycerol levels in neuronal cells undergoing neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 28;94(22):11946-50.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, and Buno W. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci*. 2002; 22, 2443–2450.
- Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biology*, 2008, 4(1), 3–10.
- Arnsten AFT. Ameliorating prefrontal cortical dysfunction in mental illness: inhibition of phosphatidyl inositol-protein kinase C signaling. *Psychopharmacology*. 2009; 202:445–455
- Atack JR, Broughton HB, Pollack SJ. Structure and mechanism of inositol monophosphatase. *FEBS Lett*. 1995 Mar 13;361(1):1-7.

- Atack JR, Prior AM, Fletcher SR, Quirk K, McKernan R, Ragan CI. Effects of L-690,488, a prodrug of the bisphosphonate inositol monophosphatase inhibitor L-690,330, on phosphatidylinositol cycle markers. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Jul;270(1):70-6.
- Attard GS, Templer RH, Smith WS, Hunt AN, Jackowski S. Modulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9032-6.
- Aylward EH, Roberts-Twillie JV, Barta PE, Kumar AJ, Harris GJ, Geer M, Peyser CE, Pearlson GD. Basal ganglia volumes and white matter hyperintensities in patients with bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 1994 May;151(5):687-93.
- Bachoo RM, Kim RS, Ligon KL, Maher EA, Brennan C, Billings N, Chan S, Li C, Rowitch DH, Wong WH, DePinho RA. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 1;101(22):8384-9.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996 Oct 4;87(1):13-20.
- Balasubramanian K, Mirmikjoo B, and Schroit AJ. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 18357–64.
- Barclay JW, Craig TJ, Fisher RJ, Ciuffo LF, Evans GJ, Morgan A, and Burgoyne RD. Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 10538–45.
- Baron CL and Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science.* 2002; 295, 325–328.
- Basselin M, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium chloride administration attenuates brain NMDA receptor-initiated signaling via arachidonic acid in unanesthetized rats. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 1659–1674.
- Basselin M, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium chloride administration to unanesthetized rats attenuates brain dopamine D2-like receptor-initiated signaling via arachidonic acid. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 1064–1075. A
- Basselin M, Chang L, Seemann R, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium administration potentiates brain arachidonic acid signaling at rest and during cholinergic activation in awake rats. *J Neurochem* 2003; 85: 1553–1562.
- Basselin M, Chang L, Seemann R, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium administration to rats selectively modifies 5-HT2A/2C receptor-mediated brain signaling via arachidonic acid. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 461–472. B
- Basselin M, Villacreses NE, Lee HJ, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation. *J Neurochem.* 2007. Aug;102(3):761-72.
- Basta-Kaim A, Budziszewska B, Jaworska-Feil L, Tetich M, Kubera M, Leśkiewicz M, Lasoń W. Mood stabilizers inhibit glucocorticoid receptor function in LMCAT cells. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jul 14;495(2-3):103-10.
- Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W, Klemens B, Schulze TG, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, Georgi A, Schumacher J, Schwarz M, Abou Jamra R, Höfels S, Propping P, Satagopan J, Detera-Wadleigh SD, Hardy J, McMahon FJ. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2008 Feb;13(2):197-207.
- Bazan NG. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2005 Aug;32(1):89-103.
- Bazan NG. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res.* 2003 Dec;44(12):2221-33.
- Bazinet RP, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Lee HJ. Chronic carbamazepine decreases the incorporation rate and turnover of arachidonic acid but not docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat: relevance to bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2006a; 59: 401–407.
- Bazinet RP, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Lee HJ. Chronic valproate does not alter the kinetics of docosahexaenoic acid within brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 182: 180–185.

- Bazinet RP, Weis MT, Rapoport SI, Rosenberger TA. Valproic acidselectively inhibits conversion of arachidonic acid to arachidonoyl-CoA by brain microsomal long-chain fatty acyl-CoA synthetases: relevance to bipolar disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 2006b; 184: 122–129.
- Bearden CE, Thompson PM, Dalwani M, Hayashi KM, Lee AD, Nicoletti M, Trakhtenbroit M, Glahn DC, Brambilla P, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Soares JC. Greater cortical gray matter density in lithium-treated patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Jul 1;62(1):7-16.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):5099-104.
- Bebchuk JM, Arfken CL, Dolan-Manji S, Murphy J, Hasanat K, Manji HK. A preliminary investigation of a protein kinase C inhibitor in the treatment of acute mania. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Jan;57(1):95-7.
- Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*. 2007; 28(1):5-11.
- Begley CE, Annegers JF, Swann AC, Lewis C, Coan S, Schnapp WB, Bryant-Comstock L. The lifetime cost of bipolar disorder in the US: an estimate for new cases in 1998. *Pharmacoeconomics*. 2001;19(5 Pt 1):483-95.
- Belmaker RH, Shapiro J, Vainer E, Nemanov L, Ebstein RP, Agam G. Reduced inositol content in lymphocyte-derived cell lines from bipolar patients. *Bipolar Disord*. 2002 Feb;4(1):67-9.
- Belmaker RH. Bipolar disorder. *N Engl J Med*. 2004 Jul 29;351(5):476-86.
- Benazzi F. Bipolar II disorder : epidemiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2007;21(9):727-40.
- Beneyto M, Kristiansen LV, Oni-Orisan A, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1888–1902.
- Bernardinelli Y, Magistretti PJ, Chatton JY. Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14937-42.
- Berns GS, Nemeroff CB. The neurobiology of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2003 Nov 15;123C(1):76-84.
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1989). Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59: 411–419.
- Berry GT, Buccafusca R, Greer JJ, Eccleston E (2004). Phosphoinositide deficiency due to inositol depletion is not a mechanism of lithium action in brain. *Mol Genet Metabolism* 82: 87–92.
- Berry GT, Wang ZJ, Dreha SF, Finucane BM, Zimmerman RA. In vivo brain myo-inositol levels in children with Down syndrome. *J Pediatr*. 1999 Jul;135(1):94-7.
- Berry GT, Wu S, Buccafusca R, Ren J, Gonzales LW, Ballard PL, Golden JA, Stevens MJ, Greer JJ. Loss of murine Na⁺/myo-inositol cotransporter leads to brain myo-inositol depletion and central apnea. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18297-302.
- Bersudsky Y, Shapiro J, Agam G, Kofman O, and Belmaker RH. Behavioral evidence for the existence of two pools of cellular inositol. *Eur Neuropsychopharmacol*. 1994; 4:463–467.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, and Volterra A. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*. 1998; 391, 281–285.
- Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagnetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*. 2001 Jul;4(7):702-10.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*. 2004 Jun;7(6):613-20.
- Bhattacharjee AK, Chang L, Lee HJ, Bazinet RP, Seemann R, Rapoport SI. D2 but not D1 dopamine receptor stimulation augments brain signaling involving arachidonic acid in unanesthetized rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 180: 735–742.
- Binder DK, Steinhäuser C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 2006;54:358–68.

- Birnbaum SG, Yuan PX, Wang M, Vijayraghavan S, Bloom AK, Davis DJ, Gobeske KT, Sweatt JD, Manji HK, Arnsten AF. Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory. *Science*. 2004 Oct 29;306(5697):882-4.
- Bleijerveld OB, Klein W, Vaandrager AB, Helms JB, Houweling M. Control of the CDPethanolamine pathway in mammalian cells: effect of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase overexpression and the amount of intracellular diacylglycerol. *Biochem J*. 2004; 1;379(Pt 3):711-9.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911-7.
- Blumberg HP, Leung HC, Skudlarski P, Lacadie CM, Fredericks CA, Harris BC, Charney DS, Gore JC, Krystal JH, Peterson BS. A functional magnetic resonance imaging study of bipolar disorder: state- and trait-related dysfunction in ventral prefrontal cortices. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Jun;60(6):601-9.
- Blumberg HP, Stern E, Martinez D, Ricketts S, de Asis J, White T, Epstein J, McBride PA, Eidelberg D, Kocsis JH, Silbersweig DA. Increased anterior cingulate and caudate activity in bipolar mania. *Biol Psychiatry*. 2000 Dec 1;48(11):1045-52.
- Bolanos JP and Medina JM. Effect of valproate on the metabolism of the central nervous system. *Life Sci*. 1997; 60, 1933 – 1942
- Bosetti F, Bell JM and Manickam P. Microarray analysis of rat brain gene expression after chronic administration of sodium valproate. *Brain Res. Bull*. 2005; 65, 331 – 338.
- Bosetti F, Rintala J, Seemann R, Rosenberger TA, Contreras MA, Rapoport SI. Chronic lithium downregulates cyclooxygenase- 2 activity and prostaglandin E(2) concentration in rat brain. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 845–850.
- Bosetti F, Weerasinghe GR, Rosenberger TA, Rapoport SI. Valproic acid down-regulates the conversion of arachidonic acid to eicosanoids via cyclooxygenase-1 and -2 in rat brain. *J Neurochem* 2003; 85: 690–696.
- Bostwick JM, Pankratz VS. Affective disorders and suicide risk: a reexamination. *Am J Psychiatry*. 2000 Dec;157(12):1925-32.
- Boufidou F, Nikolaou C, Alevizos B, Liappas IA, Christodoulou GN. Cytokine production in bipolar affective disorder patients under lithium treatment. *J Affect Disord* 2004; 82:309–13.
- Bourre JM. Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J Nutr Health Aging* 2005; 9: 31–38.
- Bowden CL, Calabrese JR, McElroy SL, Rhodes LJ, Keck PE Jr, Cookson J, Anderson J, Bolden-Watson C, Ascher J, Monaghan E, Zhou J. The efficacy of lamotrigine in rapid cycling and non-rapid cycling patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 1999 Apr 15;45(8):953-8.
- Bowden CL, Calabrese JR, Sachs G, Yatham LN, Asghar SA, Hompland M. A placebo-controlled 18-month trial of lamotrigine and lithium maintenance treatment in recently manic or hypomanic patients with bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 392–400.
- Bowden CL, McElroy SL. History of the development of valproate for treatment of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 1995;56 Suppl 3:3-5.
- Bowden CL. Valproate. *Bipolar Disord*. 2003 Jun;5(3):189-202.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
- Brambilla P, Harenski K, Nicoletti M, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Kupfer DJ, Keshavan MS, Soares JC. MRI investigation of temporal lobe structures in bipolar patients. *J Psychiatr Res*. 2003 Jul-Aug;37(4):287-95.
- Brambilla P, Stanley JA, Nicoletti MA, Sassi RB, Mallinger AG, Frank E, Kupfer D, Keshavan MS, Soares JC. H magnetic resonance spectroscopy investigation of the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder patients. *Journal of Affective Disorders*. 2005; 86, 61–67.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR. Inhibition of astroglial nuclear factor kB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med*. 2005; 202, 145–156
- Brand A, Richter-Landsberg C and Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev. Neurosci*. 1993; 15:289–298.

- Brauch RA, El-Masri M, Parker JC Jr, El-Mallakh RS. Glial cell number and neuron/glial cell ratios in postmortem brains of bipolar individuals. *J Affect Disord* 2006; 91:87–90.
- Breder CD, Dewitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol*. 1995 May 1;355(2):296-315.
- Breen G, Harwood AJ, Gregory K, Sinclair M, Collier D, St Clair D, Williams RS. Two peptidase activities decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients. *Bipolar Disord*. 2004 Apr;6(2):156-61.
- Brietzke E, Kapczinski F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32:1355–61.
- Brindley, D. N. 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J. Cell. Biochem*. 92: 900–912.
- Buczynski MW, Dumlao DS, Dennis EA. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res*. 2009 Jun;50(6):1015-38
- Bunce MW, Bergendahl K, Anderson RA. Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1761(5-6):560-9.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, and Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci*. 2002; 22, 183–192.
- Cade JFL. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust* 1949;36:349-52.
- Calabrese JR, Bowden CL, Sachs G, Yatham LN, Behnke K, Mehtonen OP, Montgomery P, Ascher J, Paska W, Earl N, DeVeugh-Geiss J; Lamictal 605 Study Group. A placebo-controlled 18-month trial of lamotrigine and lithium maintenance treatment in recently depressed patients with bipolar I disorder. *J Clin Psychiatry*. 2003 Sep;64(9):1013-24.
- Calabrese JR, Keck Jr PE, McElroy SL, Shelton MD. A pilot study of topiramate as monotherapy in the treatment of acute mania. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21: 340–342.
- Calabrese JR, Rapport DJ, Youngstrom EA, Jackson K, Bilali S, Findling RL. New data on the use of lithium, divalproate, and lamotrigine in rapid cycling bipolar disorder. *Eur Psychiatry*. 2005 Mar;20(2):92-5.
- Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75:197–202.
- Camargo N, Smit AB, Verheijen MH. SREBPs: SREBP function in glia-neuron interactions. *FEBS J*. 2009 Feb;276(3):628-36.
- Capogrossi MC, Kaku T, Filburn CR, Pelto DJ, Hansford RG, Spurgeon HA, Lakatta EG. Phorbol ester and dioctanoylglycerol stimulate membrane association of protein kinase C and have a negative inotropic effect mediated by changes in cytosolic Ca²⁺ in adult rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 1990 Apr;66(4):1143-55.
- Carter, J. M., K. A. Waite, R. B. Campenot, J. E. Vance, and D. E. Vance. 2003. Enhanced expression and activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta 2 during neurite outgrowth. *J. Biol. Chem*. 278: 44988–44994.
- Carter, J. M., L. Demizieux, R. B. Campenot, D. E. Vance, and J. E. Vance. 2008. Phosphatidylcholine biosynthesis via CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta 2 facilitates neurite outgrowth and branching. *J. Biol. Chem*. 283: 202–212.
- Catapano LA, Manji HK. Kinases as drug targets in the treatment of bipolar disorder. *Drug Discov Today*. 2008 Apr;13(7-8):295-302.
- Centeno F, Mora A, Fuentes JM, Soler G, Claro E. Partial lithium-associated protection against apoptosis induced by C2-ceramide in cerebellar granule neurons. *Neuroreport*. 1998 Dec;9(18):4199-203.
- Chalecka-Franaszek E, Chuang DM (1999). Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8745–8750.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13926-31
- Chang MC, Bell JM, Purdon AD, Chikhale EG, Grange E. Dynamics of docosahexaenoic acid metabolism in the central nervous system: lack of effect of chronic lithium treatment. *Neurochem Res* 1999; 24: 399–406.

- Chang MC, Contreras MA, Rosenberger TA, Rintala JJ, Bell JM, Rapoport SI. Chronic valproate treatment decreases the in vivo turnover of arachidonic acid in brain phospholipids: a possible common effect of mood stabilizers. *J Neurochem* 2001; 77: 796–803.
- Chang MC, Grange E, Rabin O, Bell JM, Allen DD, Rapoport SI. Lithium decreases turnover of arachidonate in several brain
- Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem*. 1999 Mar;72(3):1327-30.
- Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Zhao ZH, Manji HK. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem*. 1999 Feb;72(2):879-82.
- Chen Y and Hertz L. Inhibition of noradrenaline stimulated increase in $[Ca^{2+}]_i$ in astrocytes by chronic treatment with a therapeutically relevant lithium concentration. *Brain Res*. 1996; 711, 245–248.
- Cheng L, Lumb M, Polgar L, Mudge AW. How can the mood stabilizer VPA limit both mania and depression? *Mol. Cell. Neurosci*. 2005; 29, 155–161.
- Chiu CC, Huang SY, Su KP, Lu ML, Huang MC, Chen CC. Polyunsaturated fatty acid deficit in patients with bipolar mania. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 99–103.
- Choi J and Koh S. Role of Brain Inflammation in Epileptogenesis. *Yonsei Med J*. 2008; 49(1):1 – 18.
- Chojnacki AK, Mak GK and Weiss S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat rev Neurosci*. 2009; 10:153-63
- Chuang DM. The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Aug;1053:195-204.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*. 2003 Oct 3;302(5642):113-7.
- Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol*. 2000 Oct;7(10):793-803.
- Cohen BM, Lipinski JF, Altesman RI. Lecithin in the treatment of mania: double-blind, placebo-controlled trials. *Am J Psychiatry* 1982; 139: 1162–1164.
- Cohen Y, Chetrit A, Cohen Y, Sirota P, Modan B. (1998) Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med. Oncol*. 15, 32–36 Friesen JA, Campbell HA, Kent C.
- Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation *Progress in Lipid Research*. March 2004; Volume 43, Issue 2, Pages 134-176
- Cornell RB, Northwood IC. Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization. *Trends Biochem Sci*. 2000 Sep;25(9):441-7.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, and Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 1990; 247, 470–473.
- Cotter DR, Pariante CM and Everall IP. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: The evidence and implications. *Brain Research Bulletin*, Vol. 55, No. 5, pp. 585–595, 2001
- Courtney KR, Etter EF. Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. *Eur J Pharmacol* 1983; 88: 1–9.
- Coyle JT, Duman RS. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*. 2003 Apr 24;38(2):157-60.
- Cuadrado A, Carnero A, Dolfi F, Jiménez B, Lacal JC. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene*. 1993 Nov;8(11):2959-68.
- Cui J, Shao L, Young LT, Wang JF. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience*. 2007 Feb 23;144(4):1447-53.

- Cui Z, and Vance DE. Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 is markedly enhanced in long term choline-deficient rats. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 2839–2843.
- Cui Z, Houweling M, Chen MH, Record M, Chap H, Vance DE, Terce F. A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1996 Jun 21;271(25):14668-71.
- Cui Z, Houweling M. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Dec;1585(2-3):87-96.
- Cunnane SC, Ryan MA, Nadeau CR, Bazinet RP, Musa-Veloso K, McCloy U. Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled into lipid synthesis? *Lipids.* 2003 Apr;38(4):477-84.
- Czerski PM, Rybakowski F, Kapelski P, Rybakowski JK, Dmitrzak-Weglarz M, Leszczynska-Rodziewicz A. Association of tumor necrosis factor S308G/A promoter polymorphism with schizophrenia and bipolar affective disorder in a Polish population. *Neuropsychobiology* 2008; 57:88–94.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; 65(1):1-105.
- Dani JW, Chernjavsky A, and Smith SJ. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron.* 1992; 8, 429–440.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:46–56.
- Darlington CL. Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005; 6(7):700-3.
- Davanzo P, Thomas MA, Yue K, Oshiro T, Belin T, Strober M, McCracken J. Decreased anterior cingulate myo-inositol/creatine spectroscopy resonance with lithium treatment in children with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2001 Apr;24(4):359-69.
- Davanzo P, Yue K, Thomas MA, Belin T, Mintz J, Venkatraman TN, Santoro E, Barnett S, McCracken J. Proton magnetic resonance spectroscopy of bipolar disorder versus intermittent explosive disorder in children and adolescents. *Am J Psychiat* 2003; 160: 1442–1452.
- Dawson RM, Hemington NL, Irvine RF. Diacylglycerol potentiates phospholipase attack upon phospholipid bilayers: possible connection with cell stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 117, 196–201.
- Dawson RM, Irvine RF, Bray J, Quinn PJ. Long-chain unsaturated diacylglycerols cause a perturbation in the structure of phospholipid bilayers rendering them susceptible to phospholipase attack. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 125, 836–842.
- De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 267 (2008) 3–16
- De Matteis MA and D'Angelo G. The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochem. Soc. Symp.*,2007; 107–116.
- De Matteis MA and Godi A. Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1666, 264–274.
- De Sarno P, Li X, Jope RS (2002). Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 43: 1158–1164.
- DelBello MP, Zimmerman ME, Mills NP, Getz GE, Strakowski SM. Magnetic resonance imaging analysis of amygdala and other subcortical brain regions in adolescents with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2004 Feb;6(1):43-52.
- DeLong CJ, Qin L, and Cui Z. Nuclear localization of enzymatically active green fluorescent protein-CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha fusion protein is independent of cell cycle conditions and cell types. *J Biol Chem.* 2000; 275, 32325-32330.
- DeLong, C. J., Y-J. Shen, M. J. Thomas, and Z. Cui. 1999. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 29683–29688.
- DeMar Jr JC, Ma K, Bell JM, Igarashi M, Greenstein D, Rapoport SI. One generation of n₃ polyunsaturated fatty acid deprivation increases depression and aggression test scores in rats. *J Lipid Res* 2006; 47: 172–180.
- Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J.* 1991; 5, 2068–2077.

- Denomme J, Stark KD, Holub BJ. Directly quantitated dietary (n-3) fatty acid intakes of pregnant Canadian women are lower than current dietary recommendations. *J Nutr* 2005; 135: 206–211.
- Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM. How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1778(7-8):1591-600.
- Di Daniel E, Cheng L, Maycox PR, Mudge AW. The common inositol-reversible effect of mood stabilizers on neurons does not involve GSK3 inhibition, myo-inositol-1-phosphate synthase or the sodium-dependent myo-inositol transporters. *Mol Cell Neurosci*. 2006 May-Jun;32(1-2):27-36.
- Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*. 2006; 443:651–657
- Dietschy JM & Turley SD (2004) Thematic review series:brain lipids. Cholesterol metabolism in the centralnervous system during early development and in themature animal. *J Lipid Res* 45, 1375–1397.
- Digel M, Eehalt R, Stremmel W, Füllekrug J. Acyl-CoA synthetases: fatty acid uptake and metabolic channeling. *Mol Cell Biochem*. 2009 Jun;326(1-2):23-8.
- Divecha N, Banfic H, Irvine RF. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J*. 1991; 10:3207–3214
- Dixon JF, Los GV, Hokin LE (1994). Lithium stimulates glutamate ‘release’ and inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation via activation of the N-methyl-D-aspartate receptor in monkey and mouse cerebral cortex slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8358–8362.
- Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, and Reue K. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J. Biol. Chem*. 2007; 282:3450–3457.
- Downes CP, Gray A and Lucocq JM. Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol*. 2005; 15, 259–268.
- Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):824-7.
- Du J, Gray NA, Falke C, Yuan P, Szabo S, Manji HK. Structurally dissimilar antimanic agents modulate synaptic plasticity by regulating AMPA glutamate receptor subunit GluR1 synaptic expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Nov;1003:378-80.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, and Swanson RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci*. 2003; 23, 1320–1328.
- Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji HK. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2007;55(3-4):123-31.
- Elmqvist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *J Comp Neurol*. 1997 May 5;381(2):119-29.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:606–619
- Ertley RN, Bazinet RP, Lee HJ, Rapoport SI, Rao JS. Chronic treatment with mood-stabilizers increase membrane GRK3 in rat frontal cortex. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 246–249.
- Evans DL, Charney DS, Lewis L, Golden RN, Gorman JM, Krishnan KR, Nemeroff CB, Bremner JD, Carney RM, Coyne JC, Delong MR, Frasure-Smith N, Glassman AH, Gold PW, Grant I, Gwyther L, Ironson G, Johnson RL, Kanner AM, Katon WJ, Kaufmann PG, Keefe FJ, Ketter T, Laughren TP, Leserman J, Lyketsos CG, McDonald WM, McEwen BS, Miller AH, Musselman D, O'Connor C, Petitto JM, Pollock BG, Robinson RG, Roose SP, Rowland J, Sheline Y, Sheps DS, Simon G, Spiegel D, Stunkard A, Sunderland T, Tibbits P Jr, Valvo WJ. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry*. 2005 Aug 1;58(3):175-89.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, and Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol*. 1992; 148: 2207-2216.

- Fagone P, Sriburi R, Ward-Chapman C, Frank M, Wang J, Gunter C, Brewer JW, and Jackowski S. Phospholipid biosynthesis program underlying membrane expansion during B-lymphocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282 : 7591 – 7605 .
- Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res.* 2009 Apr;50 Suppl:S311-6.
- Fang M, Rivas MP, Bankaitis VA. The contribution of lipids and lipid metabolism to cellular functions of the Golgi complex, *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1404:85– 100.
- Farina C, Aloisi F and Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends immunol.* 2007; 28(3):138-45.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids.* 2000 Jun;106(1):1-29.
- Farooqui AA, Horrocks LA. Brain phospholipases A2: a perspective on the history. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004 Sep;71(3):161-9.
- Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist.* 2006 Jun;12(3):245-60.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron.* 2004; 43(5):729-43.
- Fellin T, Pozzan T, and Carmignoto G. Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 4274–4284.
- Fellin T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem.* 2009; 108, 533–544
- Fernández-Ulibarri I, Vilella M, Lázaro-Diéguez F, Sarri E, Martínez SE, Jiménez N, Claro E, Mérida I, Burger KN, Egea G. Diacylglycerol is required for the formation of COPI vesicles in the Golgi-to-ER transport pathway. *Mol Biol Cell.* 2007 Sep;18(9):3250-63.
- Fiacco TA and McCarthy KD. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2004 Jan 21;24(3):722-32.
- Fiacco TA, Agulhon C, Taves SR, Petravicz J, Casper KB, Dong X, Chen J, and McCarthy KD. Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron.* 2007; 54, 611–626.
- Fiacco TA, and McCarthy KD. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia.* 2006; 54, 676–690.
- Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence Jr JC, and Kelly DP. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.* 2006; 4: 199–210.
- Fioravanti, M., and M. Yanagi. 2005. Cytidinediphosphocholine (CDP-choline) for cognitive and behavioural disturbances associated with chronic cerebral disorders in the elderly. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD000269.
- Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissue: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.* 2002; 82, 736–754.
- Fitch MT, Silver J. Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res.* 1997 Nov;290(2):379-84.
- Fountoulakis KN, Vieta E, Bouras C, Notaridis G, Giannakopoulos P, Kaprinis G, Akiskal H. A systematic review of existing data on long-term lithium therapy: neuroprotective or neurotoxic? *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008 Mar;11(2):269-87.
- Freeman MP. Omega-3 fatty acids in psychiatry: a review. *Ann Clin Psychiatry* 2000; 12: 159–165.
- Frey R, Metzler D, Fischer P, Heiden A, Scharfetter J, Moser E, Kasper S. Myo-inositol in depressive and healthy subjects determined by frontal 1H-magnetic resonance spectroscopy at 1.5 tesla. *J Psychiatr Res* 1998; 32: 411–420.
- Friedman SD, Dager SR, Parow A, Hirashima F, Demopoulos C, Stoll AL, Lyoo IK, Dunner DL, Renshaw PF. Lithium and valproic acid treatment effects on brain chemistry in bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2004 Sep 1;56(5):340-8.

- Friesen JA, Campbell HA, Kent C. Enzymatic and cellular characterization of a catalytic fragment of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13384-9.
- Fukami K. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem.* 2002 Mar;131(3):293-9.
- Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl).* 2001 Oct;158(1):100-6.
- Fullerton MD, Hakimuddin F, and Bakovic M. Developmental and metabolic effects of disruption of the mouse CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase gene (Pcyt2). *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 3327–3336.
- Funfschilling U, Saher G, Xiao L, Mobius W & NaveKA (2007) Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis in vivo. *BMC Neurosci* 8, 1–9.
- Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science.* 2001; 294:1871-5
- Futerman AH, and Riezman H. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 2005; 15: 312–318.
- Galea E, Feinstein DL, Reis DJ. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 15;89(22):10945-9.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):12-8.
- Gallione CJ, Rose JK. A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *J Virol.* 1985 May;54(2):374-82.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F & Cassagne C (2000) Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 267–304.
- Gehrig K, Lagace TA and Ridgway ND. Oxysterol activation of phosphatidylcholine synthesis involves CTP:phosphocholine cytidyltransferase α translocation to the nuclear envelope. *Biochem. J.* (2009) 418, 209–217
- George M. Carman and Gil-Soo Han. Phosphatidic Acid Phosphatase, a Key Enzyme in the Regulation of Lipid Synthesis. *J Biol Chem.* 2009; Jan 30, 284 (5) 2593–2597. Review
- Gessa GL, Pani L, Serra G, Fratta W. Animal models of mania. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1995; 49: 43-66.
- Ghaemi SN, Hsu DJ, Soldani F, Goodwin FK. Antidepressants in bipolar disorder: the case for caution. *Bipolar Disord* 2003; 5:421–433.
- Ghaemi SN, Rosenquist KJ, Ko JY, Baldassano CF, Kontos NJ, Baldessarini RJ. Antidepressant treatment in bipolar versus unipolar depression. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 163–165.
- Ghelardoni S, Bazinet RP, Rapoport SI, Bosetti F. Topiramate does not alter expression in rat brain of enzymes of arachidonic acid metabolism. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 180: 523–529.
- Ghelardoni S, Tomita YA, Bell JM, Rapoport SI, Bosetti F. Chronic carbamazepine selectively downregulates cytosolic phospholipase A2 expression and cyclooxygenase activity in rat brain. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 248–254.
- Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell.* 2006; 127 : 1265 – 1281 .
- Gilroy DW, Newson J, Sawmynaden P, Willoughby DA, Croxtall JD. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J.* 2004 Mar;18(3):489-98.
- Gimeno RE, Cao J. Thematic review series: glycerolipids. Mammalian glycerol-3-phosphate acyltransferases: new genes for an old activity. *J Lipid Res.* 2008; 49(10):2079-88.
- Glanville NT, Byers DM, Cook HV, Spence MW and Palmer FB. Differences in the metabolism of inositol and phosphoinositides by cultured cells of neuronal and glial origin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989; 1004:69–179.
- Godfrey PP. Potentiation by lithium of CMP-phosphatidate formation in carbachol-stimulated rat cerebral-cortical slices and its reversal by myo-inositol, *Biochem. J.* 1989; 258,621–624.
- Gómez-Fernández JC, Corbalán-García S. Diacylglycerols, multivalent membrane modulators. *Chem Phys Lipids.* 2007 Jul;148(1):1-25.

- Goppelt-Strube M, Pfannkuche HJ, Gemsa D, Resch K. The diacylglycerols dioctanoylglycerol and oleoylacetyl glycerol enhance prostaglandin synthesis by inhibition of the lysophosphatide acyltransferase. *Biochem. J.* 1987; 247, 773–777.
- Gordon RJ, Mulligan SJ and Macvicar BA. Astrocyte Control of the Cerebrovasculature. *GLIA* 55:1214–1221 (2007)
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 2002; 111: 927– 930.
- Goto K and Kondo H. Diacylglycerol kinase in the central nervous system: molecular heterogeneity and gene expression. *Chem. Phys. Lipids.* 1999; 98, 109–117
- Goto K, Hozumi Y, Kondo H. Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 176, 535–541.
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):619-23.
- Gould TD and Manji HK. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology.* 2005; 30, 1223-1237
- Gould TD, Einat H. Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(6):825-31.
- Gould TD, Picchini AM, Einat H, Manji HK. Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr Drug Targets.* 2006 Nov;7(11):1399-409.
- Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry.* 2004 Aug;9(8):734-55.
- Green JT, Orr SK, and Bazinet RP. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *Journal of Lipid Research.* 2008; 49: 939-44.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982 Oct;126(1):131-8.
- Grunze H. Lithium in the acute treatment of bipolar disorders-a stocktaking. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2003 Jun;253(3):115-9.
- Gubern A, Casas J, Barceló-Torns M, Barneda D, de la Rosa X, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Baboia MA, Claro E. Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem.* 2008; 10;283(41):27369-82.
- Haack M, Hinze-Selch D, Fenzel T, Kraus T, Kuhn M, Schuld A, Pollmacher T. Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon hospital admission: effects of confounding factors and diagnosis. *J Psychiatr Res* 1999; 33:407–18.
- Halassa MM, Fellin T, and Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* 2007; 13, 54–63.
- Hallcher LM, Sherman WR. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem.* 1980 Nov 25;255(22):10896-901.
- Halstead JR, Jalink K, Divecha N. An emerging role for PtdIns(4,5)P2-mediated signalling in human disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Dec;26(12):654-60.
- Hamakawa H, Kato T, Murashita J, Kato N. Quantitative magnetic resonance spectroscopy of the basal ganglia in patients with affective disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience.* 1998; 248, 53–58.
- Hamakawa H, Murashita J, Yamada N, Inubushi T, Kato N, Kato T. Reduced intracellular pH in the basal ganglia and whole brain measured by 31P-MRS in bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2004; 58:82–88
- Hammond GR, Schiavo G. Polyphosphoinositol lipids: under-PPIning synaptic function in health and disease. *Dev Neurobiol.* 2007 Aug;67(9):1232-47.
- Han, G. S., W. I. Wu, and G. M. Carman. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg21-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* 281: 9210–9218.

- Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, Du F, Yuan P, Gould TD, Manji HK, Chen G. Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J Neurosci*. 2004 Jul 21;24(29):6590-9.
- Harwood AJ, Agam G. Search for a common mechanism of mood stabilizers. *Biochem Pharmacol*. 2003 Jul 15;66(2):179-89.
- Harwood AJ. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol Psychiatry*. 2005 Jan;10(1):117-26.
- Haucke V and Di Paolo G. Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology* 2007, 19:426–435.
- Haydon PG, and Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev*. 2006; 86, 1009–1031.
- Haydon PG. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Mar;2(3):185-93.
- Heacock AM, Agranoff BW. CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Sep 4;1348(1-2):166-72.
- Henneberry AL, and McMaster CR. Cloning and expression of a human choline/ethanolamine-phosphotransferase: synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochem. J*. 1999; 339: 291–298.
- Henneberry AL, Wistow G, and McMaster CR. Cloning, genomic organization, and characterization of a human cholinephosphotransferase. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 29808–29815.
- Henneberry AL, Wright MM and McMaster CC. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. *Mol. Biol. Cell*. 2002; 13, 3148–3161
- Hertle DN, and Yeckel MF. Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isoforms and ryanodine receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2007; 150, 625–638.
- Hertz L, Chen Y, Bersudsky Y and Wolfson M. Shared effects of all three conventional anti-bipolar drugs on the phosphoinositide system in astrocytes. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 2004; 31:1033-48
- Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: Astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*. 2004; 27:735–743.
- Hibbeln JR, Palmer JW, Davis JM. Are disturbances in lipid– protein interactions by phospholipase-A2 a predisposing factor in affective illness? *Biol Psychiatry* 1989; 25: 945–961.
- Higashi M, Maruta N, Bernstein A, Ikenaka K, Hitoshi S. Mood stabilizing drugs expand the neural stem cell pool in the adult brain through activation of notch signaling. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1758-67.
- Higgins, JA. *Biological membranes: a practical approach*. Findlay JBC i Evans WH, Eds.). 1987; pp. 103-137, IRL Press, Oxford.
- Hirase H, Qian L, Barthó P, Buzsáki G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol*. 2004 Apr;2(4):E96.
- Hirrlinger J, Hülsmann S, Kirchhoff F. Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci*. 2004 Oct;20(8):2235-9.
- Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol*. 1998 Dec 14;143(6):1485-503.
- Hodgkin MN, Pettitt TT, Martin A, Michell RH, Pemberton AJ, Wakelam MJO. Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem. Sci*. 1998; 23, 200–204.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 2000 Jul 6;406(6791):86-90.
- Holthuis JC, Levine TP. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 ;6(3):209-20.
- Holtzclaw LA, Pandhit S, Bare DJ, Mignery GA, and Russell JT. Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia*. 2002; 39, 69–84.

- Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14677-87.
- Hooijmans CR & Kiliaan AJ. Fatty acids, lipid metabolism and Alzheimer pathology. *Eur J Pharmacology.* 2008; 585 176–196
- Horibata Y, and Hirabayashi Y. Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1. *J. Lipid Res.* 2007; 48: 503–508.
- Horrobin DF, Bennett CN. Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipid metabolism and to diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. Possible candidate genes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 60: 217–234.
- Horrobin DF. The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1998; 30 (3), 193–208.
- Houweling M, Cui Z, Anfuso CD, Bussière M, Chen MH, and Vance DE. CTP:phosphocholine cytidyltransferase is both a nuclear and cytoplasmic protein in primary hepatocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 1996; 69: 55–63.
- Houweling M, Cui Z, Anfuso CD, Bussière M, Chen MH, Vance DE. CTP: phosphocholine cytidyltransferase is both a nuclear and cytoplasmic protein in primary hepatocytes. *Eur J Cell Biol.* 1996 Jan;69(1):55-63.
- Hunt AN, Postle AD. Phosphatidylcholine biosynthesis inside the nucleus: is it involved in regulating cell
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1369-76.
- Igal RA, Caviglia JM, de Gomez Dumint INT, Coleman RA. Diacylglycerol generated in CHO cell plasma membrane by phospholipase C is channeled towards triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res* 2001; 42:88–95.
- Imagawa M, Chiu R, Karin M. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 1987; 51: 251–260.
- Innocenti B, Parpura V, Haydon PG. Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 2000 Mar 1;20(5):1800-8.
- Irvine RF. Nuclear lipid signalling. *Sci. STKE* 2002; (150), RE13.
- Jackowski S, Fagone P. CTP: Phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):853-6.
- Jackowski S, Rehg JE, Zhang YM, Wang J, Miller K, Jackson P, and Karim MA. Disruption of CCTbeta2 expression leads to gonadal dysfunction. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 4720–4733.
- Jackowski S. Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23;271(34):20219-22.
- Jackson A, Cavanagh J, Scott J. A systematic review of manic and depressive prodromes. *J Affect Disord.* 2003 May;74(3):209-17.
- Jamil H, Utal AK and Vance DE. Evidence that cyclic AMP-induced inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is caused by a decrease in cellular diacylglycerol levels in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 1752–1760
- Janowsky DS, el-Yousef K, Davis JM, Sekerke HJ. Parasympathetic suppression of manic symptoms by physostigmine. *Arch Gen Psychiatry* 1973; 28: 542–547.
- Jenkins GM, Frohman MA. Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Oct;62(19-20):2305-16.
- Jolma IW, Falkeid G, Bamerni M, Ruoff P. (2006) Lithium leads to an increased FRQ protein stability and to a partial loss of temperature compensation in the *Neurospora* circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 21, 327–334
- Jope RS and Bijur GN (2002) Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival. *Mol. Psychiatry* 7 (Suppl. 1), S35–S45
- Jope RS and Johnson SL. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29, 95–102

- Joseph NE, Renshaw PF, Leigh JS Jr. Systemic lithium administration alters rat cerebral cortex phospholipids. *Biol Psychiatry*. 1987; 22:540–544.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, and Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 1998; 23, 1–10.
- Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie RA, Lee D, Yao JK, Doraiswamy PM. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2007; 12 (10), 934–945.
- Kaefer V, Goppelt-Strübe M, Resch K. Enhancement of eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages by the organic mercury compound thimerosal. *Prostaglandins*. 1988 Jun;35(6):885-902.
- Kagaya A, Okada A, Tawara Y, Inagaki M, Jitsuiki H, Kozuru T, Miyoshi I, Katagiri H., Uchitomi Y, Horiguchi J, Nakata Y, Yamawaki S. Lithium chloride inhibits thrombin-induced intracellular calcium mobilization in C6 rat glioma cells. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2000; 24, 85–95.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D and Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005; 1, 15–25
- Kaidanovich-Beilin O, Milman A, Weizman A, Pick CG, Eldar-Finkelman H. Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry*. 2004 Apr 15;55(8):781-4.
- Kaladchibachi SA, Doble B, Anthopoulos N, Woodgett JR, Manoukian AS. Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium. *J Circadian Rhythms*. 2007 Feb 12;5:3.
- Kam PCA and So A. COX-3: Uncertainties and controversies. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2009; 1(20): 50-53
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, and Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci*. 1998; 1, 683–692.
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, and Nedergaard M. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci*. 2008; 28, 4702–4711.
- Kang JX, Weylandt KH. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. *Subcell Biochem* 2008; 49:133–43.
- Karim, M., P. Jackson, and S. Jackowski. 2003. Gene structure, expression and identification of a new CTP:phosphocholine cytidyltransferase beta isoform. *Biochim. Biophys. Acta*. 1633: 1–12.
- Kato T, Hamakawa H, Shioiri T, Murashita J, Takahashi Y, Takahashi S, Inubushi T. Choline containing compounds detected by proton magnetic resonance spectroscopy in the basal ganglia in bipolar disorder. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 1996; 21, 248–254.
- Kato T, Murashita J, Kamiya A, Shioiri T, Kato N, Inubushi T. Decreased brain intracellular pH measured by 31P-MRS in bipolar disorder: a confirmation in drug-free patients and correlation with white matter hyperintensity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1998; 248:301–306
- Kato T, Shioiri T, Murashita J, Hamakawa H, Inubushi T, Takahashi S. Lateralized abnormality of high energy phosphate metabolism in the frontal lobes of patients with bipolar disorder detected by phase-encoded 31P-MRS. *Psychol Med* 1995; 25: 557–566.
- Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 May;12(4):447-58.
- Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*. 1956 Sep;222(1):193-214.
- Kent C. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:315-43.
- Kent C. Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Mar 21;1733(1):53-66.
- Ketter TA, Kimbrell TA, George MS, Dunn RT, Speer AM, Benson BE, Willis MW, Danielson A, Frye MA, Herscovitch P, Post RM. Effects of mood and subtype on cerebral glucose metabolism in treatment-resistant bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2001 Jan 15;49(2):97-109.

- Ketterer MW, Brymer J, Rhoads K, Kraft P, Lovallo WR. Is aspirin, as used for antithrombosis, an emotion-modulating agent? *J Psychosom Res* 1996; 40: 53–58.
- Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, Manji HK. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009; 12(4):561-78
- Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci*. 2005 Jan 1;118(Pt 1):89-99.
- Kim YK, Jung HG, Myint AM, Kim H, Park SH. Imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J Affect Disord* 2007; 104:91–5.
- Kimelberg HK, Macvicar BA, and Sontheimer H. Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia*. 2006; 54, 747–757.
- Kishimoto A, Takai Y, Mori T, Kikkawa U, Nishizuka Y. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 1980; 255, 2273–2276.
- Kiss Z, Crilly KS, Anderson WH. Phorbol ester stimulation of phosphatidylcholine synthesis requires expression of both protein kinase C-alpha and phospholipase D. *Biochim Biophys Acta*. 1998 May 20;1392(1):109-18.
- Klein PS and Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93, 8455–8459
- Kleindienst N, Greil W. Lithium in the long-term treatment of bipolar disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2003 Jun;253(3):120-5.
- Knijff EM, Breunis MN, Kupka RW, de Wit HJ, Ruwhof C, Akkerhuis GW, Nolen WA, Drexhage HA. An imbalance in the production of IL-1beta and IL-6 by monocytes of bipolar patients: restoration by lithium treatment. *Bipolar Disord* 2007; 9:743–53.
- Kobayashi T and Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68–69:557–573.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. 2009 Mar;32(3):160-9.
- Kofman O, Sherman WR, Katz V, Belmaker RH. Restoration of brain myo-inositol levels in rats increases latency to lithium–pilocarpine seizures. *Psychopharmacology*. 1993; 110, 229–234.
- Koide H, Ogita K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Isolation and characterization of the epsilon subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1149–1153.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med*. 2004 Jul;10(7):719-26.
- Kolesnick RN and Hemer MR. Physiologic 1,2-diacylglycerol levels induce protein kinase C-independent translocation of a regulatory enzyme. *J. Biol. Chem.* 1990; 265, 10900–10904
- Konietzko U, and Muller CM. Astrocytic dye coupling in rat hippocampus: topography, developmental onset, and modulation by protein kinase C. *Hippocampus*. 1994; 4, 297–306.
- Krzan M, Stenovec M, Kreft M, Pangrsic T, Grilc S, Haydon PG, Zorec R. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes. *J Neurosci*. 2003 Mar 1;23(5):1580-3.
- Kucia K, Malecki A, Gabryel B, Trzeciak HI. Effect of antidepressants on the phospholipase A2 activity in plasma membranes of the rat brain cortex. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 5–15.
- Kushner SF, Khan A, Lane R, Olson WH. Topiramate monotherapy in the management of acute mania: results of four double-blind placebo-controlled trials. *Bipolar Disord* 2006; 8: 15–27.
- Laeng P, Pitts RL, Lemire AL, Drabik CE, Weiner A, Tang H, Thyagarajan R, Mallon BS, Altar CA. The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells. *J Neurochem*. 2004 Oct;91(1):238-51.
- Lafer B, Renshaw PF, Sachs G, Christensen JD, Yurgelun-Todd D, Stoll A.L. Proton MRS of the basal ganglia in bipolar disorder. *Biological Psychiatry*. 1994; 35, 685.

- Lagace TA, Miller JR, Ridgway ND. Caspase processing and nuclear export of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha during farnesol-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:4851–62.
- Lagace TA, Ridgway ND. Induction of apoptosis by lipophilic activators of CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha (CCTalpha). *Biochem J*. 2005 Dec 15;392(Pt 3):449-56.
- Lan MJ, McLoughlin GA, Griffin JL, Tsang TM, Huang JT, Yuan P, Manji H, Holmes E, Bahn S.
- Lee CH, Dixon JF, Reichman M, Moumami C, Los G, Hokin LE. Li⁺ increases accumulation of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in cholinergically stimulated brain cortex slices in guinea pig, mouse and rat. The increases require inositol supplementation in mouse and rat but not in guinea pig. *Biochem J*. 1992 Mar 1;282 (Pt 2):377-85.
- Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, and Traynelis SF. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J. Physiol*. 2007: 581, 1057–1081.
- Lee HJ, Ertley RN, Rapoport SI, Bazinet RP, Rao JS. Chronic administration of lamotrigine downregulates COX-2 mRNA and protein in rat frontal cortex. *Neurochem Res* 2007; B
- Lee HJ, Ghelardoni S, Chang L, Bosetti F, Rapoport SI, Bazinet RP. Topiramate does not alter the kinetics of arachidonic or docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Neurochem Res* 2005; 30: 677–683.
- Lee HJ, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic lamotrigine does not alter the turnover of arachidonic acid within brain phospholipids of the unanesthetized rat: implications for the treatment of bipolar disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; 193: 467–474. A
- Lee HJ, Rao JS, Chang L, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic N-methyl-D-aspartate administration increases the turnover of arachidonic acid within brain phospholipids of the unanesthetized rat. *J Lipid Res* 2008; 49: 162–168.
- Lee HJ, Rao JS, Ertley RN, Chang L, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic fluoxetine increases cytosolic phospholipase A2 activity and arachidonic acid turnover in brain phospholipids of the unanesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 190: 103–115.
- Lee YS, Mulugu S, York JD, O’Shea EK. Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science*. 2007; 316: 845–846.
- Lev S. Lipid homeostasis and Golgi secretory functions. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34, 363–366.
- Levine J, Barak Y, Chengappa KN, Rapoport A, Rebey M, Barak V. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology* 1999;40:171–6.
- Li B, Gu L, Zhang H, Huang J, Chen Y, Hertz L, Peng L. Upregulation of cPLA2 gene expression in astrocytes by all three conventional anti-bipolar drugs is drug-specific and enzymespecific. *Psychopharmacol (Berl)*. 2007; 194:333–345
- Li X, Friedman AB, Zhu W, Wang L, Boswell S, May RS, Davis LL, Jope RS. Lithium regulates glycogen synthase kinase-3beta in human peripheral blood mononuclear cells: implication in the treatment of bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Jan 15;61(2):216-22.
- Li Z, Agellon LB, and Vance DE. Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 37798–37802.
- Lieb J, Karmali R, Horrobin D. Elevated levels of prostaglandin E2 and thromboxane B2 in depression. *Prostaglandins Leukot Med* 1983; 10: 361–367.
- Linnoila M, Whorton AR, Rubinow DR, Cowdry RW, Ninan PT, Waters RN. CSF prostaglandin levels in depressed and schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 1983; 40: 405–406.
- Litvak V, Dahan N, Ramachandran S, Sabanay H, Lev S. Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol*. 2005 Mar;7(3):225-34.
- Litvak V, Dahan N, Ramachandran S, Sabanay H, Lev S. Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol*. 2005 Mar;7(3):225-34.
- Lopez-Coronado JM, Belles JM, Lesage F, Serrano R, Rodriguez PL. A novel mammalian lithium-sensitive enzyme with a dual enzymatic activity, 30-phosphoadenosine 50-phosphate phosphatase and inositol-polyphosphate 1-phosphatase. 1999; *J Biol Chem* 274: 16034–16039.

- López-Larson MP, DelBello MP, Zimmerman ME, Schwiers ML, Strakowski SM. Regional prefrontal gray and white matter abnormalities in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2002 Jul 15;52(2):93-100.
- López-Muñoz F, Vieta E, Rubio G, García-García P, Alamo C. Bipolar disorder as an emerging pathology in the scientific literature: a bibliometric approach. *J Affect Disord*. 2006 Jun;92(2-3):161-70.
- Lorz C, Mehmet H. The role of death receptors in neural injury. *Front Biosci*. 2009 Jan 1;14:583-95.
- Lou X, Scheuss V and Schneggenburger R. Allosteric modulation of the presynaptic Ca²⁺ sensor for vesicle fusion. *Nature*. 2005; 435, 497–01.
- Lubrich B, Spleiss O, Gebicke-Haerter PJ, van Calker D. Differential expression, activity and regulation of the sodium/myo-inositol cotransporter in astrocyte cultures from different regions of the rat brain. *Neuropharmacology*. 2000 Feb 14;39(4):680-90.
- Lukinovic-Skudar V, Donlagic L, Banfic H, Visnjic D. Nuclear phospholipase C-beta1b activation during G2/M and late G1 phase in nocodazole-synchronized HL-60 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1733 (2005) 148–156.
- Lykidis A, Baburina I, and Jackowski S. Distribution of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT) isoforms: identification of a new CCTb splice variant. *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 26992–27001.
- Lykidis A, Wang J, Karim MA, and Jackowski S. Overexpression of a mammalian ethanolamine-specific kinase accelerates the CDP-ethanolamine pathway. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 2174–2179
- Lyo IK, Demopoulos CM, Hirashima F, Ahn KH, Renshaw PF. Oral choline decreases brain purine levels in lithium-treated subjects with rapid-cycling bipolar disorder: a double-blind trial using proton and lithium magnetic resonance spectroscopy. *Bipolar Disord* 2003; 5: 300–306.
- Machado-Vieira R, Manji HK, Zarate CA Jr. The role of lithium in the treatment of bipolar disorder: convergent evidence for neurotrophic effects as a unifying hypothesis. *Bipolar Disord*. 2009 Jun;11 Suppl 2:92-109.
- Maes M, Goossens F, Scharpé S, Calabrese J, Desnyder R, Meltzer HY. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Res*. 1995 Oct 16;58(3):217-25.
- Maida ME, Hurley SD, Daeschner JA, Moore AH, Kerry O'banion M. Cytosolic prostaglandin E(2) synthase (cPGES) expression is decreased in discrete cortical regions in psychiatric disease. *Brain Res* 2006; 1103: 164–172.
- Maida ME, Hurley SD, Daeschner JA, Moore AH, O'Banion M Cytosolic prostaglandin E2 synthase (cPGES) expression is decreased in discrete cortical regions in psychiatric disease. *Brain Res*. 2006; 1103:164–172
- Maienschein V, Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia*. 1999 May;26(3):233-44.
- Mallampalli RK, Ryan AJ, Salome RG, Jackowski S. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* 2000;275:9699–708.
- Manji HK and Duman RS. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. *Psychopharmacol. Bull*. 2001; 35, 5–49
- Manji HK and Lenox RH. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol. Psychiatry*. 1999; 46, 1328–1351
- Manji HK, Lenox RH. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 518–530.
- Marneros A. Expanding the group of bipolar disorders. *J Affect Disord*. 2001 Jan;62(1-2):39-44.
- Masgrau R, Servitja JM, Sarri E, Young KW, Nahorski SR, Picatoste F. Intracellular Ca²⁺ stores regulate muscarinic receptor stimulation of phospholipase C in cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 2000 Feb;74(2):818-26.
- Matlin KS, Simons K. Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation. *Cell*. 1983 Aug;34(1):233-43.
- Matthias K, Kirchoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2003 Mar 1;23(5):1750-8.

- Matute C, Melone M, Vallejo-Illarramendi A, Conti F. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia* 2005;49:451–5.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A & Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294,1354–1357.
- Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, Silva JA, Tekell JL, Martin CC, Lancaster JL, Fox PT. Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry*. 1999 May;156(5):675-82.
- McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, Shenton ME. MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1999 May 1;45(9):1099-119.
- McCarthy KD, and de Vellis J. Alpha-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 1978; 4, 15–26.
- McClung CA, Nestler EJ. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jan;33(1):3-17.
- McDonald WM, Tupler LA, Marsteller FA, Figiel GS, DiSouza S, Nemeroff CB, Krishnan KR. Hyperintense lesions on magnetic resonance images in bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 1999 Apr 15;45(8):965-71.
- McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system from concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997; 244:1–14.
- McGraw J, Hiebert GW, Steeves JD. Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res*. 2001 Jan 15;63(2):109-15.
- McIntyre RS, Soczynska JK, Beyer JL, Woldeyohannes HO, Law CW, Miranda A, Konarski JZ, Kennedy SH. Medical comorbidity in bipolar disorder: re-prioritizing unmet needs. *Curr Opin Psychiatry*. 2007 Jul;20(4):406-16.
- McMaster CR, Bell RM. CDP-choline:1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Sep 4;1348(1-2):100-10.
- Meador-Woodruff JH, Hogg AJ Jr, Smith RE. Striatal ionotropic glutamate receptor expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Brain Res Bull*. 2001 Jul 15;55(5):631-40.
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* 2004; 25, 471–480
- Meira-Lima IV, Pereira AC, Mota GF, Floriano M, Araujo F, Mansur AJ. Analysis of a polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha gene in schizophrenia and bipolar disorder: further support for an association with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2003; 8:718–20.
- Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*. 1998 Jun 1;332 (Pt 2):281-92.
- Mendlewicz J, Kriwin P, Oswald P, Souery D, Alboni S, Brunello N. Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. *Int Clin Psychopharmacol* 2006; 21:227–31.
- Mérida I, Avila-Flores A, Merino E. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochem J*. 2008 Jan 1;409(1):1-18.
- Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2009 Mar;14(3):269-79.
- Michel V, Yuan Z, Ramsubir S, Bakovic M. Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006 May;231(5):490-504.
- Micheva KD, Holz RW, and Smith SJ. Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-biphosphate by neuronal activity. *J. Cell Biol*. 2001; 154, 355–368.
- Millington WR, Wurtman RJ. Choline administration elevates brain phosphorylcholine concentrations. *J Neurochem* 1982; 38: 1748–1752.
- Mimeault M. New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer. *FEBS Lett*. 2002 Oct 23;530(1-3):9-16.

- Mitterauer B. Clock genes, feedback loops and their possible role in the etiology of bipolar disorders: an integrative model. *Med Hypotheses*. 2000 Aug;55(2):155-9.
- Molina-Holgado E, Ortiz S, Molina-Holgado F, Guaza C. Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br J Pharmacol*. 2000 Sep;131(1):152-9.
- Moore CM, Breeze JL, Gruber SA, Babb SM, Frederick BB, Villafuerte RA, Stoll AL, Hennen J, Yurgelun-Todd DA, Cohen BM, Renshaw PF. Choline, myoinositol and mood in bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study of the anterior cingulate cortex. *Bipolar Disord* 2000; 2: 207-16.
- Moore GJ, Galloway MP. MRS: neurochemistry and treatment effects in affective disorders. *Psychopharmacology Bulletin*. 2002; 36, 5-23.
- Morris SJ, Cook HW, Byers DM, Spence MW, Palmer FB. Phosphoinositide metabolism in cultured glioma and neuroblastoma cells: subcellular distribution of enzymes indicate incomplete turnover at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Mar;1022(3):339-47.
- Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth*. 1983; 65, pp. 55-63.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 12;102(15):5606-11
- Mueller HT, Meador-Woodruff JH. NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2004; 71: 361-370.
- Müller-Oerlinghausen B, Berghöfer A, Bauer M. Bipolar disorder. *Lancet*. 2002 Jan 19;359(9302):241-7.
- Muller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Muller B. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 680-684.
- Mulligan SJ, MacVicar BA. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*. 2004 Sep 9;431(7005):195-9.
- Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*. 2003 Feb;6(2):153-60.
- Murakami M, Kudo I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 943-954.
- Nagan, N., and R. A. Zoeller. 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res*. 40: 199-229.
- Nakashima S, Fujimiya H, Miyata H, Nozawa Y. Antigen-induced biphasic diacylglycerol formation in RBL-2H3 cells: the late sustained phase due to phosphatidylcholine hydrolysis is dependent on protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 May 31;177(1):336-42.
- Nanitsos EK, Nguyen KT, St'astny F, Balcar VJ. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na⁺/K⁺-dependent glutamate transport. *J Biomed Sci* 2005;12:975-84.
- Narrow WE, Rae DS, Robins LN, Regier DA. Revised prevalence estimates of mental disorders in the United States: using a clinical significance criterion to reconcile 2 surveys' estimates. *Arch Gen Psychiatry*. 2002 Feb;59(2):115-23.
- Nasrallah HA, Ketter TA, Kalali AH. Carbamazepine and valproate for the treatment of bipolar disorder: a review of the literature. *J Affect Disord*. 2006 Oct;95(1-3):69-78.
- Navarrete M, and Araque A. Endocannabinoids mediate neuronastrocyte communication. *Neuron*. 2008; 57, 883-893.
- Nery FG, Monkul ES, Hatch JP, Fonseca M, Zunta-Soares GB, Frey BN, Bowden CL, Soares JC. Celecoxib as an adjunct in the treatment of depressive or mixed episodes of bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol* 2008; 23: 87-94.
- Newman EA. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci*. 2001 Apr 1;21(7):2215-23.

- Newman TM, Tian M, Gomperts BD. Ultrastructural characterization of tannic acid-arrested degranulation of permeabilized guinea pig eosinophils stimulated with GTP- γ -S. *Eur J Cell Biol.* 1996 Jul;70(3):209-20.
- Ng WX, Lau IY, Graham S, Sim K. Neurobiological evidence for thalamic, hippocampal and related glutamatergic abnormalities in bipolar disorder: a review and synthesis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009 Mar;33(3):336-54.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci.* 2002 Mar;3(3):216-27.
- Niculescu III AB, Segal DS, Kuczenski R, Barrett T, Hauger RL, Kelsoe JR. Identifying a series of candidate genes for mania and psychosis: a convergent functional genomics approach. *Physiol Genomics* 2000; 4: 83–91.
- Nishino S, Ueno R, Ohishi K, Sakai T, Hayaishi O. Salivary prostaglandin concentrations: possible state indicators for major depression. *Am J Psychiatry* 1989; 146: 365–368.
- Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia.* 2001 Jan;33(1):72-86.
- Nomura Y. NF- κ B activation and IkappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci.* 2001 Mar 2;68(15):1695-701. Review
- Northwood IC, Tong A H, Crawford B, Drobnies A E and Cornell RB. Shuttling of CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase Between the Nucleus and Endoplasmic Reticulum Accompanies the Wave of Phosphatidylcholine Synthesis During the G(0) --> G(1) Transition. *J Biol Chem* 1999. 274: pp 26240-26248.
- Northwood IC, Tong AH, Crawford B, Drobnies AE, Cornell RB. Shuttling of CTP:Phosphocholine cytidylyltransferase between the nucleus and endoplasmic reticulum accompanies the wave of phosphatidylcholine synthesis during the G(0) --> G(1) transition. *J Biol Chem.* 1999 Sep 10;274(37):26240-8.
- Nudmamud-Thanoi S, Reynolds GP. The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. *Neurosci Lett* 2004; 372: 173–177.
- O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Disord* 2006; 90:263–7.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci.* 2009 Mar 11;29(10):3276-87.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S and Nedergaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 2006; 29, 547–553
- O'Brien WT, Harper AD, Jov \acute{e} F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, Klein PS. Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci.* 2004 Jul 28;24(30):6791-8.
- Odom AR, Stahlberg A, Wenthe SR, York JD. A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science.* 2000; 287: 2026–2029.
- O'Donnell T, Rotzinger S, Nakashima TT, Hanstock CC, Ulrich M, Silverstone PH. Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myo-inositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Brain Res.* 2000 Oct 13;880(1-2):84-91.
- Olson JK and Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 2004; 173:3916–24.
- Ong \ddot{u} r D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13290-5.
- Ong \ddot{u} r D, Jensen JE, Prescott AP, Stork C, Lundy M, Cohen BM, Renshaw PF. Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glial interactions in acute mania. *Biol Psychiatry.* 2008 Oct 15;64(8):718-26.
- Ono Y, Fujii T, Igarashi K, Kuno T, Tanaka C, Kikkawa U, Nishizuka Y. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; 86, 4868–4871.
- Orlowski J. Heterologous expression and functional properties of amiloride high affinity (NHE-1) and low affinity (NHE-3) isoforms of the rat Na/H exchanger. *J Biol Chem.* 1993; 268:16369– 16377

- Ortiz-Domínguez A, Hernández ME, Berlanga C, Gutiérrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, Pavón L. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord.* 2007 Sep;9(6):596-602.
- Padmos RC, Hillegers MH, Knijff EM, Vonk R, Bouvy A, Staal FJ, de Ridder D, Kupka RW, Nolen WA, Drexhage HA. A discriminating messenger RNA signature for bipolar disorder formed by an aberrant expression of inflammatory genes in monocytes. *Arch Gen Psychiatry.* 2008 Apr;65(4):395-407.
- Pae CU, Lee KU, Han H, Serretti A, Jun TY. Tumor necrosis factor alpha gene-G308A polymorphism associated with bipolar I disorder in the Korean population. *Psychiatry Res* 2004; 125:65–8.
- Pagano RE, Longmuir KJ. Phosphorylation, transbilayer movement, and facilitated intracellular transport of diacylglycerol are involved in the uptake of a fluorescent analog of phosphatidic acid by cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 1985; 260:1909–16.
- Paoletti AM, Piccirilli S, Costa N, Rotiroli D, Bagegga G, Nistico G. Systemic administration of N omega-nitro-L-arginine methyl ester and indomethacin reduces the elevation of brain PGE2 content and prevents seizures and hippocampal damage evoked by LiCl and tacrine in rat. *Experimental Neurology.* 1998; 149, 349–355.
- Pappu AS, Hauser G. Propranolol-induced inhibition of rat brain cytoplasmic phosphatidate phosphohydrolase. *Neurochem Res.* 1983 Dec;8(12):1565-75.
- Pardo R, Andreolotti AG, Ramos B, Picatoste F, Claro E. Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms. *J Neurochem.* 2003 Oct;87(2):417-26.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, and Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. 1994; 369, 744–774.
- Parpura V, Scemes E, Spray DC. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int.* 2004 Jul-Aug;45(2-3):259-64.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci.* 2001 Aug;4(8):803-12.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, and Haydon PG. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 2005; 310, 113–116.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, and Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: A highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 1997; 17, 7817–7830.
- Pearlson GD, Wong DF, Tune LE, Ross CA, Chase GA, Links JM. In vivo D2 dopamine receptor density in psychotic and nonpsychotic patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52: 471–477.
- Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron.* 2007 Mar 1;53(5):703-17.
- Pellerin L. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol.* 2005 Aug;32(1):59-72.
- Perea G, Araque A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci.* 2005 Mar 2;25(9):2192-203.
- Petravicz J, Fiacco TA, and McCarthy KD. Loss of IP3 receptordependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity. *J. Neurosci.* 2008; 28, 4967–4973.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA and Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 2001; 276, 36734 – 36741.
- Pilcher HR. Drug research: the ups and downs of lithium. *Nature.* 2003; 11;425(6954):118-20.
- Pillai JJ, Friedman L, Stuve TA, Trinidad S, Jesberger JA, Lewin JS, Findling RL, Swales TP, Schulz SC. Increased presence of white matter hyperintensities in adolescent patients with bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2002 Feb 15;114(1):51-6.
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8 (10), 743–754.
- Porter JT, and McCarthy KD. Adenosine receptors modulate [Ca²⁺]_i in hippocampal astrocytes in situ. *J. Neurochem.* 1995; 65, 1515–1523.

- Post RM, Altshuler LL, Leverich GS, Frye MA, Nolen WA, Kupka RW. Mood switch in bipolar depression: comparison of adjunctive venlafaxine, bupropion and sertraline. *Br J Psychiatry* 2006; 189: 124–131.
- proliferation? *Advan. Enzyme Regul.* 2004 (44) 173–86
- Purdon DA, Rapoport SI. Energy requirements for two aspects of phospholipid metabolism in mammalian brain. *Biochem J.* 1998; 335:313–318.
- Qu Y, Chang L, Klaff J, Balbo A, Rapoport SI. Imaging brain phospholipase A2 activation in awake rats in response to the 5-HT_{2A/2C} agonist (p/_)2,5-dimethoxy-4-iodophenyl-2-aminopropane (DOI). *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 244–252.
- Quiroz JA, Gray NA, Kato T, Manji HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Oct;33(11):2551-65.
- Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006; 27:24–31.
- Rajkowska G. Cell pathology in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2002; 4:105–16.
- Ramírez de Molina A, Gutiérrez R, Ramos MA, Silva JM, Silva J, Bonilla F, Sánchez JJ, Lacal JC. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene.* 2002 Jun 20;21(27):4317-22.
- Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Lacal JC. From Ras signalling to ChoK inhibitors: a further advance in anticancer drug design. *Cancer Lett.* 2004 Apr 8;206(2):137-48.
- Ramos B, El Mouedden M, Claro E, Jackowski S. Inhibition of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by C(2)-ceramide and its relationship to apoptosis. *Mol Pharmacol.* Nov 2002a; 62(5):1068-75.
- Ramos B, Lahti JM, Claro E, Jackowski S. Prevalence of necrosis in C2-ceramide-induced cytotoxicity in NB16 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol.* 2003 Aug;64(2):502-11.
- Ramos B, Salido GM, Campo ML, Claro E. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis precedes apoptosis induced by C2-ceramide: protection by exogenous phosphatidylcholine. *Neuroreport.* 2000 Sep 28;11(14):3103-8.
- Ramos B. Implicaciones del metabolismo de fosfatidilcolina en apoptosis inducida por ceramida. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. 2002b.
- Rao JS, Bazinet RP, Rapoport SI, Lee HJ. Chronic administration of carbamazepine downregulates AP-2 DNA binding activity and AP-2a protein expression in rat frontal cortex. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 154–161.
- Rao JS, Bazinet RP, Rapoport SI, Lee HJ. Chronic treatment of rats with sodium valproate downregulates frontal cortex NF- κ B DNA binding activity and COX-2 mRNA. *Bipolar Disord* 2007; 9: 513–520.
- Rao JS, Ertley RN, Demar Jr JC, Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Dietary n₃ PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 151–157. C
- Rao JS, Ertley RN, Lee HJ, Rapoport SI, Bazinet RP. Chronic fluoxetine upregulates activity, protein and mRNA levels of cytosolic phospholipase A2 in rat frontal cortex. *Pharmacogenomics J* 2006; 6: 413–420.
- Rao JS, Ertley RN, Rapoport SI, Bazinet RP, Lee HJ. Chronic NMDA administration to rats up-regulates frontal cortex cytosolic phospholipase A(2) and its transcription factor, activator protein-2. *J Neurochem* 2007; 106: 1918–1927. B
- Rao JS, Lee HJ, Rapoport SI, Bazinet RP. Mode of action of mood stabilizers: is the arachidonic acid cascade a common target? *Mol Psychiatry.* 2008 Jun;13(6):585-96.
- Rao JS, Rapoport SI, Bosetti F. Decrease in the AP-2 DNA-binding activity and in the protein expression of AP-2 alpha and AP-2 beta in frontal cortex of rats treated with lithium for 6 weeks. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30: 2006–2013.
- Rapoport SI, Bosetti F. Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder? *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59: 592–596.
- Rapoport SI. Arachidonic acid and the brain. *J Nutr* 2008; 138:2515–20.
- Reue K, and Brindley DN. Thematic Review Series: Glycerolipids Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research.* 2008; Volume 49.

- Ridsdale R, Tseu I, Wang J, Post M. CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha is a cytosolic protein in pulmonary epithelial cells and tissues. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):49148-55
- Rintala J, Seemann R, Chandrasekaran K, Rosenberger TA, Chang L, Contreras MA, Contreras MA, Rapoport SI, Chang MC. 85 kDa cytosolic phospholipase A2 is a target for chronic lithium in rat brain. *Neuroreport* 1999; 10: 3887-3890.
- Roberts R, Sciorra VA, Morris AJ. Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):22059-67.
- Rocha E, Achaval M, Santos P, Rodnight R. Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. *Neuroreport*. 1998; 9, 3971-3974.
- Rocha E, Rodnight R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 1994; 63, 1582-1584.
- Roh MS, Kang UG, Shin SY, Lee YH, Jung HY, Juhn YS, Kim YS. Biphasic changes in the Ser-9 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta after electroconvulsive shock in the rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Feb;27(1):1-5.
- Ronnett GV, Kleman AM, Kim EK, Landree LE, Tu Y. Fatty acid metabolism, the central nervous system, and feeding. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Aug;14 Suppl 5:201S-207S.
- Rosenberg G. The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci*. 2007 Aug;64(16):2090-103.
- Ross BM, Hughes B, Kish SJ, Warsh JJ. Serum calcium-independent phospholipase A2 activity in bipolar affective disorder. *Bipolar Disord* 2006; 8: 265-270.
- Roth BJ, Yagodin SV, Holtzclaw L, and Russell JT. A mathematical model of agonist-induced propagation of calcium waves in astrocytes. *Cell Calcium*. 1995; 17, 53-64.
- Roth MG. Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic*. 2008 Aug;9(8):1233-9.
- Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 1970 May;5(5):494-6.
- Sabioni P, Baretta IP, Ninomiya EM, Gustafson L, Rodrigues ALS, Roberto Andreatini R. The antimanic-like effect of tamoxifen: Behavioural comparison with other PKC-inhibiting and antiestrogenic drugs. *Prog Neuro-Psychopharm Biol Psychiatry*; 2008 (32) 1927-1931
- Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:253-72.
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Jul;61(7):705-13.
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004 Feb 19;427(6976):740-4.
- Sarter M, Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jan;6(1):48-56.
- Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation*. 2007 Oct 15;4:26.
- Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation*. 2007 Oct 15;4:26.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res*. 1989 Jul 10;491(2):394-7.
- Scemes E, and Giaume C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*. 2006; 54, 716-725.
- Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1761(11):1246-59.
- Schiffer HH. Glutamate receptor genes: Susceptibility factors in schizophrenia and depressive disorders? *Mol. Neurobiol*. 2002; 25, 191-212.

- Schlame, M. Thematic Review Series: Glycerolipids Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *Journal of Lipid Research* Volume 49, 2008
- Schloesser RJ, Huang J, Klein PS, Manji HK. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jan;33(1):110-33.
- Schmitt A, Wilczek K, Blennow K, Maras A, Jatzko A, Petroianu G, Braus DF, Gattaz WF. Altered thalamic membrane phospholipids in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry*. 2004 Jul 1;56(1):41-5.
- Schou M. Lithium treatment at 52. *J Affect Disord*. 2001 Dec;67(1-3):21-32.
- Schummers J, Yu H, and Sur M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science*. 2008; 320, 1638–1643.
- Schwarz E, Prabakaran S, Whitfield P, Major H, Leweke FM, Koethe D, McKenna P, Bahn S. High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides. *J Proteome Res*. 2008 Oct;7(10):4266-77.
- Seifert G, Hüttmann K, Schramm J, Steinhäuser C. Enhanced relative expression of glutamate receptor 1 flip AMPA receptor subunits in hippocampal astrocytes of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neurosci*. 2004 Feb 25;24(8):1996-2003.
- Senaratne R, Milne AM, MacQueen GM, Hall GB. Increased choline-containing compounds in the orbitofrontal cortex and hippocampus in euthymic patients with bipolar disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Psychiatry Res*. 2009 Jun 30;172(3):205-9.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005; 6: 1191–1197.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, and Robitaille R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J. Neurosci*. 2006; 26, 5370–5382.
- Shaldubina A, Buccafusca R, Johanson RA, Agam G, Belmaker RH, Berry GT, Bersudsky Y. Behavioural phenotyping of sodium-myoinositol cotransporter heterozygous knockout mice with reduced brain inositol. *Genes Brain Behav*. 2007 Apr;6(3):253-9.
- Shaldubina A, Johanson RA, O'Brien WT, Buccafusca R, Agam G, Belmaker RH, Klein PS, Bersudsky Y, Berry GT. SMIT1 haploinsufficiency causes brain inositol deficiency without affecting lithium-sensitive behavior. *Mol Genet Metab*. 2006 Aug;88(4):384-8.
- Shaltiel G, Shamir A, Shapiro J, Ding D, Dalton E, Bialer M, Harwood AJ, Belmaker RH, Greenberg ML, Agam G. Valproate decreases inositol biosynthesis. *Biol Psychiatry*. 2004 Dec 1;56(11):868-74.
- Shapiro J, Belmaker RH, Biegon A, Seker A, Agam G. Scyllo-inositol in post-mortem brain of bipolar, unipolar and schizophrenic patients. *J Neural Transm*. 2000;107(5):603-7.
- Sharp AH, Nucifora FC Jr, Blondel O, Sheppard CA, Zhang C, Snyder SH, Russell JT, Ryugo DK, and Ross CA. Differential cellular expression of isoforms of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in neurons and glia in brain. *J. Comp. Neurol*. 1999; 406, 207–220.
- Sheppard CA, Simpson PB, Sharp AH, Nucifora FC, Ross CA, Lange GD, and Russell, JT. Comparison of type 2 inositol 1,4,5-triphosphate receptor distribution and subcellular Ca²⁺ release sites that support Ca²⁺ waves in cultured astrocytes. *J. Neurochem*. 1997; 68, 2317–2327.
- Shindou H, Shimizu T. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J Biol Chem*. 2009 Jan 2;284(1):1-5.
- Shu X, Shaner NC, Yarbrough CA, Tsien RY, Remington SJ. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry*. 2006 Aug 15;45(32):9639-47.
- Shuai JW and Jung P. Optimal ion channel clustering for intracellular calcium signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100, 506–510.
- Silverstone P, Asghar S, O'donnell T, Ulrich M and Hanstock C. Lithium and valproate protect against dextro-amphetamine induced brain choline concentration changes in bipolar disorder patients', *World Journal of Biological Psychiatry*. 2004; 5:1,38 – 44.
- Silverstone PH, McGrath BM, Kim H. Bipolar disorder and myo-inositol: a review of the magnetic resonance spectroscopy findings. *Bipolar Disord*. 2005; 7, 1– 10.

- Silverstone PH, Wu RH, O'Donnell T, Ulrich M, Asghar SJ, Hanstock CC. Chronic treatment with both lithium and sodium valproate may normalize phosphoinositol cycle activity in bipolar patients. *Hum Psychopharmacol*. 2002 Oct;17(7):321-7.
- Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129(4):877-96.
- Sinclair AJ, Begg D, Mathai M, Weisinger RS. Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16(Suppl 1): 391–397.
- Slack BE, Breu J and Wurtman RJ. Production of diacylglycerol by exogenous phospholipase C stimulates CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem*. 1991; 266, 24503–24508
- Slack BE, Breu J, Wurtman RJ. Production of diacylglycerol by exogenous phospholipase C stimulates CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 1991 Dec 25;266(36):24503-8.
- Slezak M & Pfrieger FW (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26, 531–535.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:145-82.
- Soares JC, Mallinger AG, Dippold CS, Forster Wells K, Frank E, Kupfer DJ. Effects of lithium on platelet membrane phosphoinositides in bipolar disorder patients: a pilot study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Mar;149(1):12-6.
- Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*. 2005 Oct;11(5):400-7.
- Song D, Du T, Li B, Cai L, Gu L, Li H, Chen Y, Hertz L, Peng L. Astrocytic alkalization by therapeutically relevant lithium concentrations: implications for myo-inositol depletion. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Oct;200(2):187-95.
- Soupe E, Kuypers FA. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 May;233(5):507-21.
- Spiegelberg BD, Xiong JP, Smith JJ, Gu RF, York JD. Cloning and characterization of a mammalian lithium-sensitive bisphosphate 30-nucleotidase inhibited by inositol 1,4-bisphosphate. *J Biol Chem*. 1999; 274: 13619–13628.
- Sriburi R, Bommiasamy H, Buldak GL, Robbins GR, Frank M, Jackowski S. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)- induced endoplasmic reticulum biogenesis. *J Biol Chem* 2007;282:7024–7034.
- Sriburi R, Jackowski S, Mori K, and Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*. 2004; 167 : 35 – 41 .
- Stanimirovic DB, Ball R, Mealing G, Morley P, Durkin JP. The role of intracellular calcium and protein kinase C in endothelin-stimulated proliferation of rat type I astrocytes. *Glia*. 1995 Oct;15(2):119-30.
- Stark KD, Beblo S, Murthy M, Buda-Abela M, Janisse J, Rockett H. Comparison of bloodstream fatty acid composition from African-American women at gestation, delivery, and postpartum. *J Lipid Res* 2005; 46: 516–525.
- Steenbergen, R., T. S. Nanowski, A. Beigneux, A. Kulinski, S. G. Young, and J. E. Vance. 2005. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J. Biol. Chem*. 280: 40032–40040.
- Stoll AL, Locke CA, Marangell LB, Severus WE. Omega-3 fatty acids and bipolar disorder: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 60: 329–337.
- Stoll AL, Renshaw PF, Sachs GS, Guimaraes AR, Miller C, Cohen BM, Lafer B, Gonzalez RG. The human brain resonance of choline-containing compounds is similar in patients receiving lithium treatment and controls: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biological Psychiatry*. 1992; 32, 944–949.
- Stoll AL, Sachs GS, Cohen BM, Lafer B, Christensen JD, Renshaw PF. Choline in the treatment of rapid-cycling bipolar disorder: clinical and neurochemical findings in lithium-treated patients. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 382–388.

- Stone SJ, and Vance JE. Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 34534–34540.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC and Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 10482–10488.
- Strakowski SM, Adler CM, Holland SK, Mills N, DeBello MP. A preliminary FMRI study of sustained attention in euthymic, unmedicated bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Sep;29(9):1734-40.
- Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry.* 2005 Jan;10(1):105-16.
- Strakowski SM, DeBello MP, Zimmerman ME, Getz GE, Mills NP, Ret J, Shear P, Adler CM. Ventricular and periventricular structural volumes in first- versus multiple-episode bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2002 Nov;159(11):1841-7.
- Stubbs EB Jr, Agranoff BW. Lithium enhances muscarinic receptor-stimulated CDP-diacylglycerol formation in inositol-depleted SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 1993 Apr;60(4):1292-9.
- Sublette ME, Russ MJ, Smith GS. Evidence for a role of the arachidonic acid cascade in affective disorders: a review. *Bipolar Disord* 2004; 6: 95–105.
- Sugimoto H, Banchio C, Vance DE. Transcriptional regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 2008 May;47(3):204-20.
- Sul JY, Orosz G, Givens RS, Haydon PG. Astrocytic Connectivity in the Hippocampus. *Neuron Glia Biol.* 2004 Feb;1(1):3-11.
- Sullivan NR, Burke T, Siafaka-Kapadai A, Javors M, Hensler JG. Effect of valproic acid on serotonin-2A receptor signaling in C6 glioma cells. *J Neurochem.* 2004 Sep;90(5):1269-75.
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res.* 2004 Feb;45(2):205-13.
- Szabo ST, Machado-Vieira R, Yuan P, Wang Y, Wei Y, Falke C, Cirelli C, Tononi G, Manji HK, Jing Du J. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of Mania. *Neuropharmacology.* 2009; (56) 47–55
- Takadera T, Ohyashiki T. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors prevent caspase-dependent apoptosis induced by ethanol in cultured rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 2004 Sep;499(3):239-45.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1010-5.
- Tang Y, Glauser TA, Gilbert DL, Hershey AD, Privitera MD, Ficker DM, Szaflarski JP and Sharp FR. Valproic acid blood genomic expression patterns in children with epilepsy – a pilot study. *Acta Neurol. Scand.* 2004; 109, 159 – 168.
- Tarkowski E, Liljeroth AM, Minthon L, Tarkowski A, Wallin A, Blennow K. Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res Bull* 2003; 61:255–60.
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F & Huttner WB(2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2, 42–49.
- Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 2005 Sep;11(9):973-81.
- Tian Y, Pate C, Andreolotti A, Wang L, Tuomanen E, Boyd K, Claro E, Jackowski S. Cytokine secretion requires phosphatidylcholine synthesis. *J Cell Biol.* 2008 Jun 16;181(6):945-57.
- Timmer RT, Sands JM. Lithium intoxication. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Mar;10(3):666-74.
- Toker A. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:761–779
- Tondo L, Hennen J, Baldessarini RJ. Lower suicide risk with long-term lithium treatment in major affective illness: a meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2001 Sep;104(3):163-72.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; 117:244–79.

- Tricklebank MD, Singh L, Jackson A, Oles RJ. Evidence that a proconvulsant action of lithium is mediated by inhibition of myo-inositol phosphatase in mouse brain. *Brain Res.* 1991; 558, 145–148.
- Turley SD, Burns DK, Rosenfeld CR & Dietschy JM(1996) Brain does not utilize low density lipoproteincholesterolduring fetal and neonatal development inthe sheep. *J Lipid Res* 37, 1953–1961.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* 2001 Aug 15;20(16):4467-77.
- Uldry M, Steiner P, Zurich MG, Beguin P, Hirling H, Dolci W, Thorens B. Regulated exocytosis of an H(+)/myo-inositol symporter at synapses and growth cones. *EMBO J.* 2004; 23, 531– 540.
- Undie AS. Relationship between dopamine agonist stimulation of inositol phosphate formation and cytidine diphosphate-diacylglycerol accumulation in brain slices. *Brain Res.* 1999; 816: 286-294.
- V.A. Fadok, D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, A.B. Ezekewitz, P.M. Henson, A receptor for phosphatidylserine specific clearance of apoptotic cells, *Nature* 405 (2000) 85– 90.
- Vadnal R, Parthasarathy R. Myo-inositol monophosphatase: diverse effects of lithium, carbamazepine, and valproate. *Neuropsychopharmacology.* 1995; 12, 277–285.
- Vallejo-Illarramendi A, Torres-Ramos M, Melone M, Conti F, Matute C. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia* 2005;50:276–9.
- Van Calker D, Belmaker RH. The high affinity inositol transport system--implications for the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2000 Jun;2(2):102-7.
- Van Calker D, Muller M, and Hamprecht B Adrenergic alpha and beta-receptors expressed by the same cell type in primary culture of perinatal mouse brain. *J. Neurochem.* 1978; 30, 713–718.
- Van Meer G, Sprong H: Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* 2004, 16:373-378.
- Vance JE, Hayashi H & Karten B (2005) Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16, 193–212.
- Vance JE. Thematic Review Series: Glycerolipids: Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research*
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:535-602.
- Vezzani A, Ravizza T, Balosso S, Aronica E. Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia* 2008; 49(Suppl 2):24–32.
- Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Sep;65(18):2833-41.
- Virmani T, Ertunc M, Sara Y, Mozhayeva M and Kavalali ET. Phorbol esters target the activity-dependent recycling pool and spare spontaneous vesicle recycling. *J. Neurosci.* 2005; 25, 10922–9.
- Visnjic D, Banfic H. Nuclear phospholipid signaling: phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase. *Pflugers Arch.* 2007 Oct;455(1):19-30.
- Voelker DR. New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res.* 2003 Mar;44(3):441-9.
- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Aug;6(8):626-40.
- Walkey CJ, Kalmar GB, Cornell RB. Overexpression of rat liver CTP:phosphocholine cytidyltransferase accelerates phosphatidylcholine synthesis and degradation. *J Biol Chem.* 1994 Feb 25;269(8):5742-9.
- Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhäuser C. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia.* 2004 Oct;48(1):36-43.
- Walz W, Hertz L. Acute and chronic effects of lithium in therapeutically relevant concentrations on potassium uptake into astrocytes. *Psychopharmacol (Berl).* 1982; 78:309–313
- Wang DD and Bordey A. The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology.* 2008; 86, 342–367
- Wang H, Friedman E. Increased association of brain protein kinase C with the receptor for activated C kinase-1 (RACK1) in bipolar affective disorder. *Biol Psychiatry.* 2001 Sep 1;50(5):364-70.

- Wang HY, Johnson GP, Friedman E. Lithium treatment inhibits protein kinase C translocation in rat brain cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Oct;158(1):80-6.
- Wang L, Magdaleno S, Tabas I, and Jackowski S. Early embryonic lethality in mice with targeted deletion of the CTP:phosphocholine cytidylyltransferase alpha gene (Pcyt1a). *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: 3357–3363.
- Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, Han X, Kang J, Takano T, and Nedergaard M. Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 2006; 9, 816–823.
- Wasserman MJ, Corson TW, Sibony D, Cooke RG, Parikh SV, Pennefather PS, Li PP, Warsh JJ. Chronic lithium treatment attenuates intracellular calcium mobilization. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Apr;29(4):759-69.
- Watanabe T, Medina JF, Haeggström JZ, Rådmark O, Samuelsson B. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *Eur J Biochem.* 1993 Mar 1;212(2):605-12.
- Watson DG, Lenox RH. Chronic lithium-induced down-regulation of MARCKS in immortalized hippocampal cells: potentiation by muscarinic receptor activation. *J Neurochem.* 1996 Aug;67(2):767-77.
- Weerasinghe GR, Rapoport SI, Bosetti F. The effect of chronic lithium on arachidonic acid release and metabolism in rat brain does not involve secretory phospholipase A2 or lipoxygenase/ cytochrome P450 pathways. *Brain Res Bull* 2004; 63: 485–489.
- Weerth SH, Holtzclaw LA, and Russell JT. Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca²⁺ wave propagation in glial cells. *Cell Calcium.* 2007; 41, 155–167.
- Weichel O, Hilgert M, Chatterjee SS, Lehr M, Klein J. Bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba, inhibits NMDA-induced phospholipase A2 activation and phospholipid breakdown in rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 609–615.
- Weigert R, Silletta MG, Spanò S, Turacchio G, Cericola C, Colanzi A, Senatore S, Mancini R, Polishchuk EV, Salmona M, Facchiano F, Burger KN, Mironov A, Luini A, Corda D. CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature.* 1999 Nov 25;402(6760):429-33.
- Weisler RH, Calabrese JR, Bowden CL, Ascher JA, DeVeugh-Geiss J, Evoniuk G. Discovery and development of lamotrigine for bipolar disorder: a story of serendipity, clinical observations, risk taking, and persistence. *J Affect Disord.* 2008 May;108(1-2):1-9.
- Weiss GB (1995): Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci* 56:637–660.
- Weixel, K. M., Blumental-Perry, A., Watkins, S. C., Aridor, M. and Weisz, O. A. (2005) Distinct Golgi populations of phosphatidylinositol 4-phosphate regulated by phosphatidylinositol 4-kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 10501–10508.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007 Jun 7;447(7145):661-78.
- Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Shi Y, Hossain GS, Sood SK, Krisans SK and Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* 2001; 107, 1263-1273.
- Wierda KD, Toonen RF, de Wit H, Brussaard AB, Verhage M. Interdependence of PKC-dependent and PKC-independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron.* 2007 ; 19;54(2):275-90.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 14;103(46):17513-8.
- Williams R, Ryves WJ, Dalton EC, Eickholt B, Shaltiel G, Agam G, Harwood AJ. A molecular cell biology of lithium. *Biochem Soc Trans.* 2004 Nov;32(Pt 5):799-802.
- Williams RS, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature.* 2002 May;417(6886):292-5.
- Wolfson M, Bersudsky Y, Hertz E, Berkin V, Zinger E, Hertz L. A model of inositol compartmentation in astrocytes based upon efflux kinetics and slow inositol depletion after uptake inhibition. *Neurochem Res.* 2000 Jul;25(7):977-82.

- Wolfson M, Bersudsky Y, Zinger E, Simkin M, Belmaker RH, Hertz L. Chronic treatment of human astrocytoma cells with lithium, carbamazepine or valproic acid decreases inositol uptake at high inositol concentrations but increases it at low inositol concentrations. *Brain Res.* 2000b; 855, 158–161.
- Wolfson M, Hertz E, Belmaker RH, Hertz L. Chronic treatment with lithium and pretreatment with excess inositol reduce inositol pool size in astrocytes by different mechanisms. *Brain Res.* 1998 Mar 16;787(1):34-40.
- Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol.* 1995;33:179-207.
- Wymann, M. P., and Schreiber, R. Lipid signalling in disease. *Nature reviews Molecular Cell Biology.* 2008
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med.* 2003 Apr;9(4):453-7.
- Xie, M., J. L. Smith, Z. Ding, D. Zhang, and R. B. Cornell. 2004. Membrane binding modulates the quaternary structure of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 279:28817–28825.
- Xu HL, Mao L, Ye S, Paisansathan C, Vetri F, Pelligrino DA. Astrocytes are a key conduit for upstream signaling of vasodilation during cerebral cortical neuronal activation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H622-32.
- Yagodin S, Holtzclaw LA, and Russell JT. Subcellular calcium oscillators and calcium influx support agonist-induced calcium waves in cultured astrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 1995; 149–150, 137–144.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron.* 1993 Aug;11(2):371-86.
- Yamaji T, Kagaya A, Utchitomi Y, Yokota N, Yamawaki S. Chronic treatment with antidepressants, verapamil, or lithium inhibits the serotonin-induced intracellular calcium response in individual C6 rat glioma cells. *Life Sci.* 1997; 60, 817–823.
- Yang HC, Mosior M, Johnson CA, Chen Y, Dennis EA. Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2. *Anal Biochem.* 1999 May 1;269(2):278-88.
- Yang L, Tanaka J, Zhang B, Sakanaka M, Maeda N. Astrocytes modulate nitric oxide production by microglial cells through secretion of serine and glycine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 9;251(1):277-82.
- Yang W, Jackowski S. Lipid activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase is regulated by the phosphorylated carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):16503-6.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, and Duan S. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100, 15194–15199.
- Yao JK, Leonard S, Reddy RD. Membrane phospholipid abnormalities in postmortem brains from schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* 2000; 42 (1), 7–17.
- Yatham LN, Kennedy SH, Schaffer A, Parikh SV, Beaulieu S, O'Donovan C, MacQueen G, McIntyre RS, Sharma V, Ravindran A, Young LT, Young AH, Alda M, Milev R, Vieta E, Calabrese JR, Berk M, Ha K, Kapczinski F. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2009. *Bipolar Disord.* 2009; 11(3):225-55.
- Ye X, Fukushima N, Kingsbury MA, Chun J. Lysophosphatidic acid in neural signaling. *Neuroreport.* 2002 Dec 3;13(17):2169-75.
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, and Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci.* 2003; 23, 3588–3596.
- Yildiz A, Sachs GS, Dorer DJ, Renshaw PF. 31P Nuclear magnetic resonance spectroscopy findings in bipolar illness: a meta-analysis. *Psychiatry Res* 2001; 106 (3), 181–191.
- Yu Y, Sreenivas A, Ostrander DB, Carman GM. Phosphorylation of *Saccharomyces cerevisiae* choline kinase on Ser30 and Ser85 by protein kinase A regulates phosphatidylcholine synthesis by the CDP-choline pathway. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):34978-86.
- Yury CA, Fisher JE. Meta-analysis of the effectiveness of atypical antipsychotics for the treatment of behavioural problems in persons with dementia. *Psychother Psychosom* 2007; 76: 213–218.

- Zarate CA and Manji HK. Bipolar disorder: Candidate drug targets. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 2008; 75:226-247.
- Zarate CA Jr, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Singh J, Charney DS, Manji HK. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Nov;1003:273-91.
- Zarate CA Jr, Quiroz JA, Singh JB, Denicoff KD, De Jesus G, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. An open-label trial of the glutamate-modulating agent riluzole in combination with lithium for the treatment of bipolar depression. *Biol Psychiatry*. 2005 Feb 15;57(4):430-2.
- Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Quiroz J, Jolkovsky L, Luckenbaugh DA, Manji HK. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord*. 2007 Sep;9(6):561-70.
- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*. 2003; 278: 33067–33077.
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron*. 2003 Dec 4;40(5):971-82.
- Zhaoyu Li and Dennis E. Vance. Thematic Review Series: Glycerolipids. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research* Volume 49, 2008
- Zhou R, Gray NA, Yuan P, Li X, Chen J, Chen G, Damschroder-Williams P, Du J, Zhang L, Manji HK. The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers. *J Neurosci*. 2005 May 4;25(18):4493-502.
- Zielasek J, Tausch M, Toyka KV, Hartung HP. Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cell Immunol*. 1992 Apr 15;141(1):111-20.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci*. 2003a Jan;6(1):43-50.
- Zonta M, Sebelin A, Gobbo S, Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G. Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J Physiol*. 2003b Dec 1;553(Pt 2):407-14.
- Zucker RS and Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol*. 2002; 64, 355–05.

“L’home més feliç del món és
aquell que sap reconèixer els
mèrits dels altres i pot alegrar-
se del bé aliè com si li fos
propi”

Johann Wolfgang Goethe



Agraïments

És molt tard, d'aquí a poc veuré per la finestra del despatx com surt la llum del dia en què acabaré d'escriure la tesi. Estaria bé que dediqués aquestes últimes línies a pensar en tota aquella gent que m'ha ajudat a arribar fins aquí amb prou humor com per alegrar-me de veure sortir el sol mentre preparo el pdf final.

Fernando, Enrique, si vaig decidir realitzar la tesi al vostre grup és perquè éreu dels millors professors que havia tingut, i he de dir que si mai em guanyo les garrofes ensenyant, m'agradaria fer-ho tant bé com vosaltres. Fer la tesi amb els Pica's pot ser molt fàcil o molt difícil, depèn de com es miri, i si bé he de reconèixer que m'he penedit moltes vegades de no haver escollit un grup més potent, amb més diners, amb projectes més ambiciosos, amb tècnics, amb post-docs, en un centre punter, etc., al final acaba pesant més el costat bo, i m'alegro d'haver tingut uns directors de tesi que em donen llibertat per encertar-la i per equivocar-me, que entenen que la ciència és bella però no és la única cosa bella, que em fan sentir que treballa amb ells, i no per a ells, i per sobre de tot, que són bones persones, el millor elogi que es pot fer d'un científic, d'un professor o d'un assessor tècnic comercial. En aquest paràgraf també la Roser hi mereix una menció especial. Sovint he pensat que m'hauria anat molt bé tenir-te pel laboratori quan vaig començar, i sens dubte he pogut aprendre moltes coses de tu, però és obvi que el teu ajut ha anat molt més enllà, no sé com hauria acabat la tesi si no m'haguessis comprat tot el que t'he demanat, encara que no t'hagi demanat tot el que hauria volgut comprar. Aprofito l'ocasió per fer una mica la pilota als altres membres del tribunal de la tesi, la Bet, que em va ajudar amb els marcatges metabòlics, i en Ramón Trullàs, que fa 6 anys va rebre una visita d'estudiants de l'Autònoma, àvids de consell sobre la possibilitat de fer el doctorat, i ens va respondre amb tota honestedat, cruesa i realisme: la ciència pot ser molt dura, però si t'agrada no faries una altra cosa. Espero que hàgiu gaudit llegint aquesta tesi, o com a mínim, que no se us hagi fet tant pesat com a mi escriure-la.

També guardaré bons records de la gent del laboratori. Alberto, em vas ensenyar algunes tècniques de laboratori, però sobretot de tu vaig aprendre a respectar la opinió de persones que veuen el món de manera molt diferent a la meua. I en William, l'exemple que si un s'espavila, acaba tirant endavant. Albert, vam començar junts però has fotut un esprint que no hi ha qui t'atrapi, felicitats, perquè no era fàcil, i gràcies, per demostrar-me que és possible. I tu Miki, espero que el calci t'acompanyi i vagis on vagis et surtin bé les coses i t'invitin a moltes pintes. I l'altre gironí, en Xevi, que vas coincidir poc temps amb mi, però hauries estat un miniPica genial.

Agraïments

Ostres ara ve lo difícil, no sé si estic prou despert com per no deixar-me cap dels companys de fatigues que m'heu acompanyat durant aquests anys... Penso amb nostàlgia en tots els sopars d'aniversari, escapades, *Alfes*, patxangues, converses trascendentals i banals, vídeos..., i m'adono que haver conegut gent com vosaltres és suficient per compensar totes les penes que comporta fer el doctorat. Quan vaig entrar al departament em vaig adonar que havia tingut molta sort d'anar a parar a un lloc on hi havia tant bon ambient, on érem poquets però ben avinguts, i sempre hi havia temps per fer una partideta de ping-pong amb algun dels mestres, com en David Moreno, en Xavi o l'Àlex, a qui vaig guanyar un dia, jeje. Al cafè sempre es podia aprendre alguna cosa de caspases, però eren més interessants les teories surrealistes de l'Eli, l'idealisme de la Mar, les lluites de l'Alfredo contra la injustícia, les rialles de la Imane i somriures de la Rut, l'humor negre de la Noe, la Cris responent *lee* a la pregunta *Leo?*, i la Sandra amb la seva comissió de festes sempre a punt. Quines festes eh, Sandra? I allà ens vam criar els nous doctorands, com en Nahuai, amb qui he tingut el plaer de compartir partides de tennis, cubates (que a mitges surten més barats, encara que en demanis el doble) i moltes conyes, i la Bruna, amb qui he tingut el plaer de compartir cognom i que és tot un exemple pels que volem compaginar la vida amb l'estudi de la vida. I van venir les pompis a revolucionar-ho tot, primer la Montse, la única que, per poc, m'ha respectat el torn de tesi, molta sort!!!!!!! I l'Anna, moltes gràcies per tots els teus somriures i bromes, i per aguantar les meves bromes també. I la Vidi, oh la la, la Vidi, ara no et toca, però ja que estàs aquí, t'avanço un petó, muaks. I mica, en mica, com si l'INc fos l'FBS de la unitat, hem anat proliferant, de manera que he pogut conèixer molta més gent interessant, com en Roger i en Santi, amb els que sempre es pot fer una conya masculista, la Laura i la Mireia, les més positives del sector est (o és sud? o nord? o western?), on també hi ha la petita però forta Naty. Amb la Irene hem pujat molt el nivell de cultura-espectacles, i amb la marxa de la Tània hem perdut a nivell gastronòmic, sort que sempre està a punt per venir a compartir uns berberechos a cal senyor Oliva. I els nous grups, amb l'Arantza, la més positiva del sector oest, i en Gerard, nou dins els nous, i a baix, on es troben a faltar les xerrades de la Gema, sort que queda la Pauli i en Mateu, sempre a punt per donar una mica de ritme a l'ambient. I els seus veïns, com m'alegro que la Vidi us pugui tenir com a companys, Judit que ets tremenda, Jorge, que eres más bueno que el pan, Sergi, que en poc temps t'has guanyat l'estima de tots, Elsa, l'alegria del sector catacumbes, i Marta, vigila que a la que no te n'adonis ja estaràs dins del tot! La vida del precari és una muntanya russa, plena d'alts i baixos, que és millor passar en bona companyia i bon humor, i per sort aquí hi he trobat les dues coses. I deixant la part lúdica, també he d'agrair-vos la vostra generositat. Aquest últim any me l'he passat pidolant de

laboratori en laboratori, i sempre m'he trobat amb la vostra solidaritat, suport i somriures de complicitat.

En aquest sentit també m'agradaria molt agrair a les institucions per les que he treballat: la UAB, el Departament de Bioquímica i l'Institut de Neurociències, per no permetre que els seus doctorands es trobin, en la fase final de la tesi, sense sou ni diners per comprar material. M'agradaria molt poder fer aquest agraïment, però no és possible, o sigui que em conformo fent aquesta petita protesta per demanar que s'entengui que en ciència poden succeir molts problemes, i que no és just que es facin pagar al doctorand que ha tingut la mala sort de trobar-s'hi. Per mi ja és tard, però espero que algun dia aquestes institucions assumeixin la seva responsabilitat i que quan una persona iniciï la seva tesi, tingui garantides les condicions mínimes per acabar-la.

I tornant a coses més alegres, ja que fa temps que vaig decidir no amargar-me excessivament per la situació que he passat, també he de tenir un record afable per la gent de secretaria, amb en Melchor amb les seves vacil·lades, en Santi, la Isabel, en Carlos, sempre amb les piles carregades, i l'Óscar, un altre que es troba a faltar. I per la Susanna, que lluita per harmonitzar el caos de la unitat. I què carai, fem un agraïment també als caps de grup, que sou els que podeu millorar les coses.

Vorrei ringraziare pure a Daniela per accogliermi nel suo lab, e a tutta la gente del Mario Negri, per essere così carini, ma come oggi non riesco a scrivere due parole in catalano, non credo che possa farlo meglio in italiano, quindi semplicemente vi dico che sono molto contento d'averne stato quelli mesi da voi, e aspetto che siete tutti più felice che un Golgi a 37 °C. E prima di lasciare l'italiano ho anche un forte abbraccio per il geniale Dottore Lorenzo... Ma, quando vieni a Barcellona? *Boh!* I ja que estic amb en Lore, també he de fer menció als meus altres antics companys de pis, Rustu, trobo a faltar la teva carn arrebossada (bé, em refereixo al pollastre, no a la teva carn), i Claudio, boas noites feijao, aaaaaaaaah si.

I què dir dels bioquímics, Martí Subetealpino Oalmonte, Nereida de Parranda, Albert Marmota de Paris et al., Jordi Rubisco Yeguagris, Ester Sensak i Ambalegria, Gema Cool Medina, Gerard Cianofito Dr Bròquil, Xevi Ratafiu Cagumdeu, Xavi Montunampresa i Donofeinalsamics, Cris Roundtheworld i Tornaavic, Isaac Mepegaounviaje Interdigitat, Asierevisiae Saccarotxea, em sento molt afortunat de tenir-vos com a amics, i espero poder-vos anar visitant allà on estiguen. O sigui que, si marxeu, aneu a llocs que valguin la pena.

Agraïments

I també els amics bisbalencs, en Lluís, la Montse, en Jordi, l'Enric (i en Martí), en David, en Xevi, la Neus, l'altre Xevi, en Joan Antoni, que no ens veiem tant com abans, però sempre hi sou quan fa falta.

A la meva família tinc tantes coses a agrair que millor que ho resumeixi amb un us estimo molt a tots. I també a la meva nova família aranesa.

I finalment a tu Vidi, que vas entrar en la meva vida més o menys quan feia els experiments de la figura R-4, i has acabat fent que mai dubti que començar la tesi en aquest departament ha estat la millor decisió que he pres mai.

Bé, el sol ja fa estona que s'alça per sobre les facultats de l'Autònoma, i em sembla que ja és moment que acabi la tesi i em prepari per un nou dia.

*¿Por qué la tierra es mi casa?
¿Por qué la noche es oscura?
¿Por qué la luna es blanca
que engorda como adelgaza?
¿Por qué una estrella se enlaza
con otra, como un dibujo?
Y ¿por qué el escaramujo
es de la rosa y el mar?
Yo vivo de preguntar:
saber no puede ser lujo.*

*El agua hirviendo en puchero
suelta un ánima que sube
a disolverse en la nube
que luego será aguacero.
Niño soy tan preguntero,
tan comilón del acervo,
que marchito si le pierdo
una contesta a mi pecho.
Si saber no es un derecho,
seguro será un izquierdo.*

*Yo vine para preguntar
flor y reflujos.
Soy de la rosa y de la mar,
como el escaramujo.*

Silvio Rodríguez



