



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

---

**FACULTAT DE MEDICINA**

**Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA  
NEURODEGENERACIÓN ESTRIATAL EN MODELOS  
MURINOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**Tesis presentada por Jesús Fernando Torres Peraza**

**para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona**

# INTRODUCCIÓN



Las enfermedades neurodegenerativas forman un amplio abanico de patologías con síntomas neurológicos y/o psiquiátricos que se caracterizan por poseer un curso progresivo y sin remisión. Estas enfermedades generan una discapacidad y un terrible padecimiento físico y psíquico entre quienes las padecen y entre sus familiares, por lo que tienen repercusiones socioeconómicas muy importantes. A la enfermedad propiamente dicha se le suma el amplio impacto psíquico producto de la disminución de la calidad de vida, de la alteración de las relaciones sociales y de la carga física y psíquica de sus cuidadores. Por otra parte, el deterioro neurológico suele acompañarse de diversos grados de discapacidad laboral, a la que se le añade el enorme gasto económico que conlleva la atención social y sanitaria de los pacientes. Las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy diversas y dependen de la degeneración específica de ciertas células o estructuras del sistema nervioso. El estudio de los mecanismos fisiopatológicos responsables de la mayor vulnerabilidad de las zonas o células afectadas en cada una de estas enfermedades conduciría al desarrollo de estrategias terapéuticas neuroprotectoras capaces de desacelerar o detener el proceso neurodegenerativo o incluso lograr la total remisión de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, en la actualidad estas entidades mórbidas carecen de cura efectiva, por lo que los tratamientos van dirigidos a paliar su sintomatología. En este orden de ideas, la generación de modelos animales de enfermedades neurodegenerativas ha permitido estudiar en detalle los diversos mecanismos celulares y moleculares que determinan la neuropatología selectiva de estos padecimientos. Así pues, empleando diversos modelos murinos, esta tesis se ha centrado en el estudio de algunos de los mecanismos implicados en la fisiopatología, así como también en algunas estrategias terapéuticas potenciales de una de estas enfermedades, la enfermedad de Huntington.

### **1.-La enfermedad de Huntington**

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo, autosómico dominante de penetrancia completa (Wexler y col., 1987) causada por una mutación específica en el gen de la proteína huntingtina (htt; HDCRG, 1993). Esta terrible afección, la cual es conocida comúnmente como “el desorden”, “el mal” o “el mal de San Vito”, fue descrita en detalle por el Dr. George Huntington (1850-1916) en el año 1872 como un trastorno hereditario al que le acuñó el nombre de corea (que significa danza) hereditaria. Años después, haciendo mérito a las observaciones del Dr. Huntington, pasó a llamarse “corea o enfermedad de Huntington”. Los síntomas se manifiestan normalmente en la edad adulta, entre la tercera y la cuarta década de la vida, y progresa inexorablemente hasta la muerte del paciente en un período de 15-20 años (Ambrose y col., 1994). Sin embargo se han detectado formas juveniles, en las que los síntomas se manifiestan desde la primera o segunda década de la vida. La frecuencia de la enfermedad de Huntington es de 5-7 por 100.000 habitantes (Walker, 2007), sin embargo, existen pequeñas áreas geográficas donde la incidencia es especialmente alta. Tal es el caso de pequeños pueblos ubicados a orillas del lago de Maracaibo (Venezuela), donde la enfermedad llega a alcanzar niveles prácticamente epidémicos (Young y col., 1986; Okun y Thommi, 2004; Walker, 2007). En estas poblaciones, las cuales habían sido afectadas durante muchos años por un extraño mal al que llamaron “baile epidémico”, el diagnóstico de la enfermedad de Huntington se planteó por primera vez en el año 1955 por el médico venezolano Américo Negrete (1924-2003, Okun y Thommi, 2004).

### **2.-Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Huntington**

El cuadro clínico de la enfermedad de Huntington se caracteriza por disfunción motora, declive cognitivo y trastornos psiquiátricos (Walter, 2007). Los síntomas

motores suelen presentarse en dos fases: Una primera fase hipercinética caracterizada por la corea, y una segunda fase hipocinética caracterizada por la rigidez y la distonía (Berardelli y col., 1999). La corea corresponde a movimientos involuntarios bruscos y no estereotipados que se presentan de forma continua durante horas, no pueden ser suprimidos voluntariamente y empeoran con el estrés. Los movimientos involuntarios suelen presentarse en las extremidades, pero también se presentan en el tronco y en el cuello, conjuntamente con trastornos oculomotores (Van Vugt y col., 2001). La corea está presente durante un corto período de tiempo en la mayoría de los casos y luego es sustituida por rigidez muscular. Los trastornos cognitivos y psiquiátricos son tan dramáticos como las alteraciones motoras y generalmente consisten en una demencia subcortical que incluye cambios afectivos, del humor y de la personalidad, así como problemas para integrar nuevos conocimientos (Naarding y col., 2001). Se presentan también trastornos del humor, los cuales van desde la ansiedad e irritabilidad, hasta periodos de depresión muy acentuados (Lovestone y col., 1996; Hanes y col., 1996). Por otra parte, los pacientes pueden sufrir procesos maníacos, alucinaciones (Haddad y Cummings, 1997; Rosenblatt y Leroi, 2000) y ataques epilépticos (Srivastava y col., 1999). La enfermedad suele cursar con pérdida progresiva del peso corporal y la causa de la muerte se debe a problemas coronarios, así como a procesos mórbidos vinculados a la postración, tales como infecciones respiratorias bajas.

### **3.-Anatomía patológica de la enfermedad de Huntington**

En el estudio anatomopatológico se aprecia macroscópicamente que la neuropatología es extremadamente selectiva, afectando principalmente estructuras subcorticales como los ganglios basales, de los cuales los más afectados son los núcleos caudado y putamen (figura 1). También se puede apreciar cierta atrofia de la corteza

cerebral lo que da como resultado que todo el cerebro presente una disminución del volumen. Debido a que las regiones cerebrales más afectadas son los ganglios basales en el presente trabajo nos centraremos en el estudio de estas estructuras.

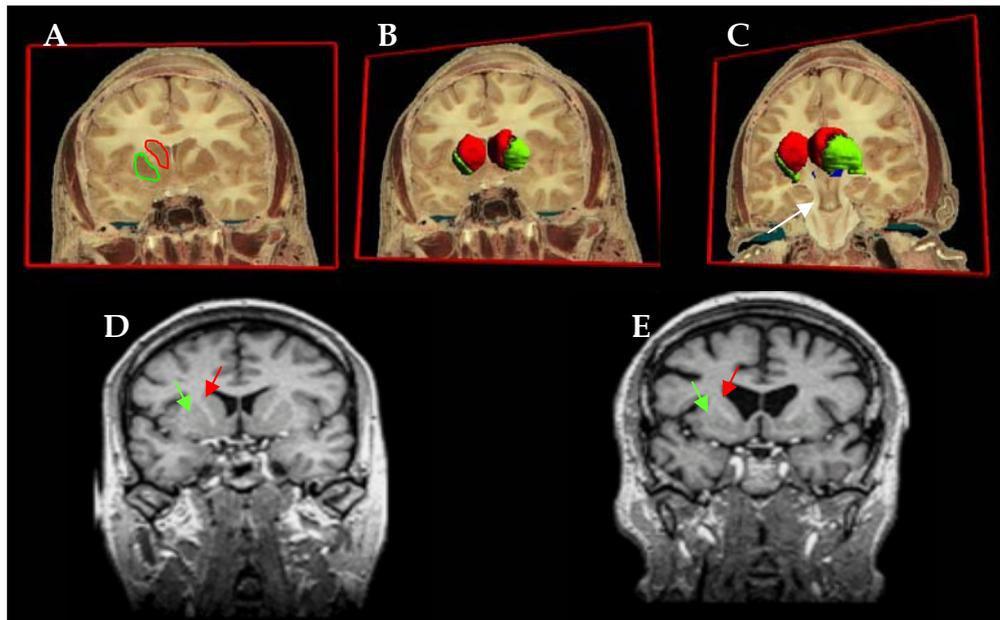


Figura 1. Los ganglios basales. A: Sección coronal del encéfalo en el que se muestran a los núcleos caudado (rojo) y putamen (verde). B-C. Reconstrucción tridimensional de los núcleos caudado y putamen en el plano coronal con una ligera rotación lateral. C. Sección coronal del encéfalo a nivel del tronco encefálico donde se muestran el núcleo subtalámico (azul) y la sustancia negra (flecha blanca). D, E. Resonancias magnéticas de una persona sana (izquierda) y un paciente con enfermedad de Huntington (derecha) donde se aprecia la atrofia de los núcleos caudado (flechas rojas) y putamen (flecha verde).. [A-C, Reconstrucciones hechas con el programa UB-Brain v.1.0, 2003, Edicions Universitat de Barcelona]

### 3.1.-Los ganglios basales

Los ganglios basales son un conjunto de estructuras subcorticales formadas por sustancia gris, las cuales están altamente interconectadas entre sí, e involucradas en el control de la actividad motora, somatosensorial, cognitiva y asociativa. Anatómicamente están constituidos por el núcleo estriado, el globo pálido externo y el globo pálido interno. El núcleo estriado se divide en estriado dorsal, formado por el núcleo caudado y putamen, y el estriado ventral o núcleo accumbens. Existen otras dos estructuras asociadas a los ganglios basales, como son la sustancia negra (que

consta de dos partes, compacta y reticulada) y el núcleo subtalámico, las cuales suelen incluirse dentro de los ganglios basales debido a la estrecha relación funcional que tienen estas estructuras con el núcleo estriado y el globo pálido. Los ganglios basales desempeñan una función importante en el movimiento voluntario normal. Sin embargo, al contrario de la mayoría de los demás componentes del sistema motor, no tienen conexión directa de entrada o salida con la médula espinal. Estos núcleos reciben la información principalmente de la corteza cerebral y, a través del tálamo, conectan de nuevo a la corteza frontal premotora y motora.

Los núcleos caudado y putamen (a los que nos referiremos como núcleo estriado) reciben las aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral y del tálamo, dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta y en menor medida serotoninérgicas del rafe. Una vez integrada la información en el núcleo estriado, éste envía dos tipos de conexiones GABAérgicas, unas directas hacia el globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada (vía directa), y otras indirectamente hacia estos núcleos pero con dos conexiones intermedias, en el globo pálido externo y de aquí al núcleo subtalámico, el cual conecta finalmente con el globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada (vía indirecta). De este modo la información de las vías directa e indirecta se integra finalmente en el globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada, los únicos núcleos eferentes de los ganglios basales, los cuales envían sus eferencias inhibitoras hacia el tálamo. Hasta este punto, la proyección del núcleo subtalámico es la única conexión glutamatérgica intrínseca de los ganglios basales; todas las demás son GABAérgicas inhibitoras. Por último el tálamo emite su eferencia excitadora hacia la corteza premotora, cerrando el circuito (Graybiel, 2000). El balance entre la activación de la vía directa (estriato-nigral) y la indirecta (estriato-palidal) determina el grado de inhibición que ejercerán los núcleos efectores sobre el tálamo, y

por ende, sobre la corteza cerebral premotora (figura 2). De este modo, en condiciones normales ambas vías se equilibran, pero en condiciones patológicas en las que las neuronas que integran estas vías degeneran, la descompensación del sistema genera graves problemas en el control del movimiento (Graybiel, 2000).

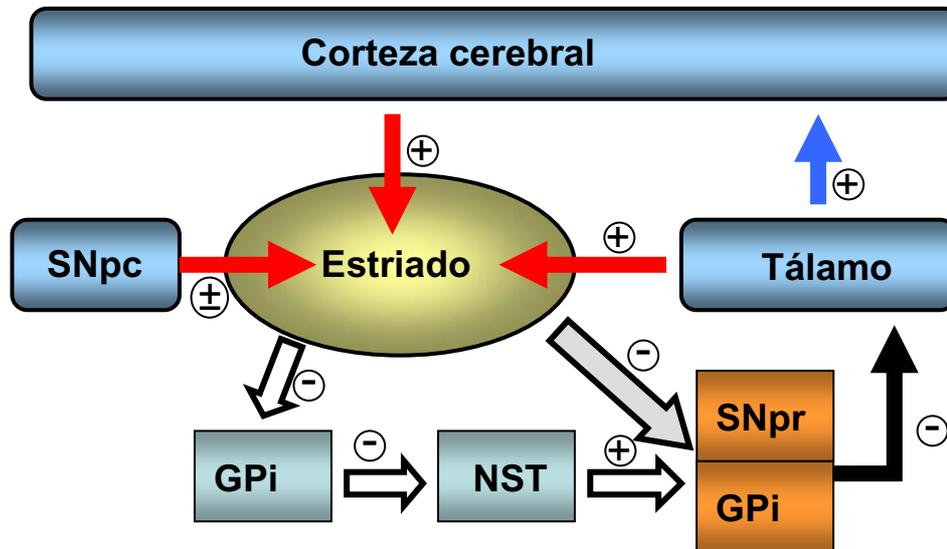
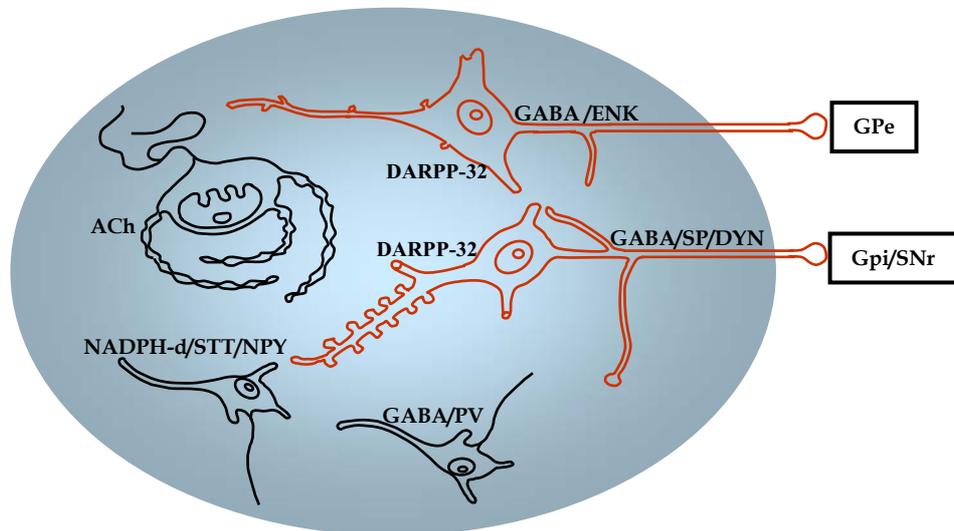


Figura 2. Circuito de los ganglios basales. Las flechas rojas representan las aferencias del núcleo estriado y las flechas blancas corresponden a la vía indirecta y la gris a la vía directa. Las flechas negra y azul representan la eferencia de los ganglios basales y del tálamo, respectivamente. Los signos + y - indican que la conexión es excitadora o inhibitoria, respectivamente. SNpc y SNpr: Sustancia negra parte compacta y parte reticulada, respectivamente; GPi y GPe: Globo pálido interno y externo, respectivamente; NST: Núcleo subtalámico.

### 3.2.-Histología del núcleo estriado

A nivel histológico, el núcleo estriado está compuesto por neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección, también llamadas neuronas espinosas de tamaño medio, representan la inmensa mayoría de las neuronas estriatales (90-95% del total), utilizan el GABA como neurotransmisor y son heterogéneas en cuanto a su diana de inervación así como en el neuropéptido que

expresan. Así, las neuronas estriatales, que proyectan al globo pálido externo expresan encefalina (ENK), mientras que las que inervan la parte reticulada de la sustancia negra y el globo pálido interno expresan sustancia P (SP) y dinorfina (DYN).



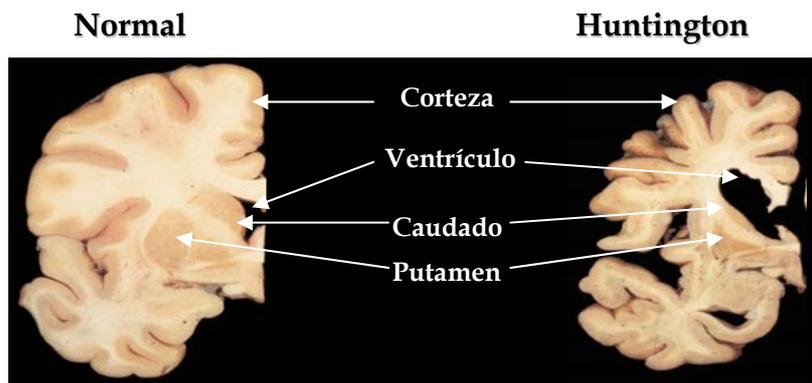
**Figura 3.** Esquema de las poblaciones neuronales del núcleo estriado. Las neuronas GABAérgicas de proyección (rojo) inervan el globo pálido externo (GPe) o el globo pálido interno (Gpi) y la parte reticulada de la sustancia negra (SNr). Las interneuronas (negro) forman circuitos locales intraestriatales y también se diferencian por el neurotransmisor y/o el neuropéptido expresado. ACh: Acetilcolina; DYN: Dinorfina; PV: Parvalbúmina; SP: sustancia P; STT: Somatostatina; NPY: Neuropéptido Y.

Las neuronas estriatales de proyección expresan además la proteína quelante de calcio calbindina, y la proteína inhibidora de fosfatasa llamada DARPP-32 (del inglés, *dopamine- and cyclicAMP- regulated phosphoprotein of 32 KDa*; Fienberg y Greengard, 2000). Las interneuronas, las cuales forman circuitos locales, representan sólo el 5-10% del total de las neuronas del núcleo estriado, pero ejercen un papel importante en el control de la excitabilidad de las neuronas estriatales de proyección (Kawaguchi y col., 1995). Las interneuronas se pueden clasificar en: (1) Colinérgicas, también llamadas interneuronas grandes, se caracterizan por su gran tamaño (20-50  $\mu\text{m}$  de diámetro) y

utilizar la acetilcolina como neurotransmisor (Bolam y col., 1984); (2) GABAérgicas que expresan la proteína quelante de calcio parvalbúmina (Gerfen y col., 1985); (3) GABAérgicas de tamaño mediano que contienen calretinina (Jacobowitz y Winsky, 1991; Resibois y Rogers, 1992) y (4) las interneuronas que coexpresan somatostatina, la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-diaforasa (NADPH-d) y el neuropéptido Y (NPY; Vincent y col., 1983; Dawson y col., 1991).

### **3.3.-Histopatología de la enfermedad de Huntington**

De los ganglios basales, los núcleos caudado y putamen son los que presentan la atrofia más pronunciada en la enfermedad de Huntington dando como resultado un aumento relativo del volumen de los ventrículos cerebrales (figura 4; Vonsattel y col., 1985). Los hallazgos histopatológicos más representativos en el núcleo estriado de pacientes con la enfermedad de Huntington son tres: (1) Pérdida neuronal selectiva, (2) gliosis y (3) agregados intracelulares (DiFiglia y col., 1997; Vonsattel y col., 1985).



**Figura 4. Neuropatología de la enfermedad de Huntington. Secciones coronales de los cerebros de una persona sana (izquierda) y de un paciente con enfermedad de Huntington (derecha). Nótese la atrofia de los núcleos caudado y putamen. También se puede apreciar el aumento de volumen de los ventrículos cerebrales y la atrofia de la corteza cerebral.**

Las primeras observaciones realizadas con impregnaciones de Golgi sugirieron que las neuronas estriatales de proyección eran las primeras y más afectadas por la enfermedad, mientras que las interneuronas grandes y medianas (las colinérgicas y las positivas para Parvalbúmina, respectivamente) degeneraban únicamente en fases muy tardías (Graveland y col., 1985). Posteriormente mediante técnicas de inmunohistoquímica se demostró que las neuronas positivas para la calbindina eran las más afectadas en las fases más avanzadas de la enfermedad, confirmando así la afectación selectiva de las neuronas estriatales de proyección (Ferrante y col., 1991). Por otra parte, el análisis bioquímico e inmunohistoquímico demostró que las interneuronas colinérgicas y las que expresan somatostatina/NPY/NADPH-d son menos afectadas (Ferrante y col., 1985, 1986, 1987; Kowall y col., 1993; Vonsattel y col., 1985). Sin embargo, en fases tardías de la enfermedad disminuye la densidad de las neuronas colinérgicas estriatales, mientras que aumenta la densidad de las interneuronas positivas para somatostatina/NPY/NADPH-d que se correlaciona con un aumento del contenido estriatal de somatostatina y NPY. Este último hallazgo se debe al mantenimiento del número total de estas interneuronas a pesar de la atrofia estriatal (Beal y col., 1986, 1988; Beal, 1990; Ferrante y col., 1987). Aunque todas las subpoblaciones de neuronas de proyección se ven afectadas en la enfermedad, las neuronas estriatopalidales son afectadas más rápida y severamente que las estriatonigrales (Reiner y col., 1988; Albin y col., 1992; Richfield y col., 1995; Mitchell y col., 1999; Glass y col., 2000). Por otra parte, las aferencias dopaminérgicas y serotoninérgicas estriatales también permanecen intactas durante la enfermedad (Spokes y col., 1980; Beal, 1990). Con respecto a la gliosis, en el núcleo estriado de pacientes se ha descrito un aumento de la densidad de astrocitos fibrilares que se ha correlacionado con la neurodegeneración estriatal (Vonsattel y col., 1985).

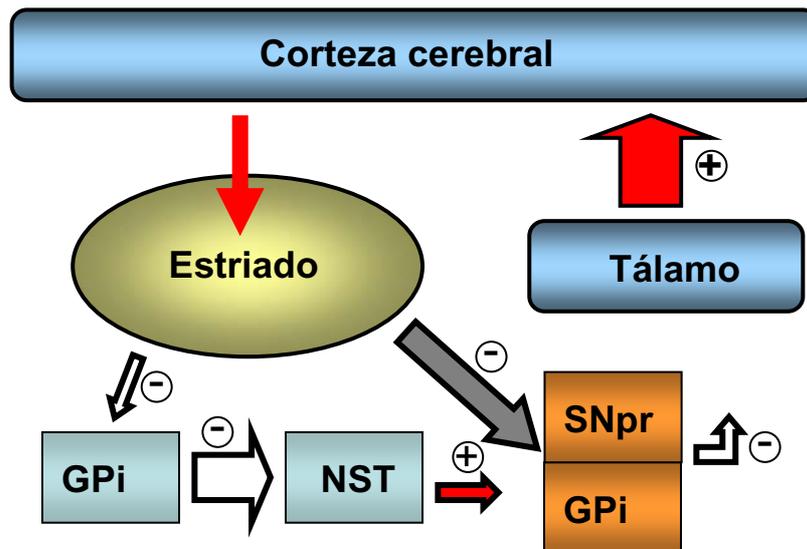
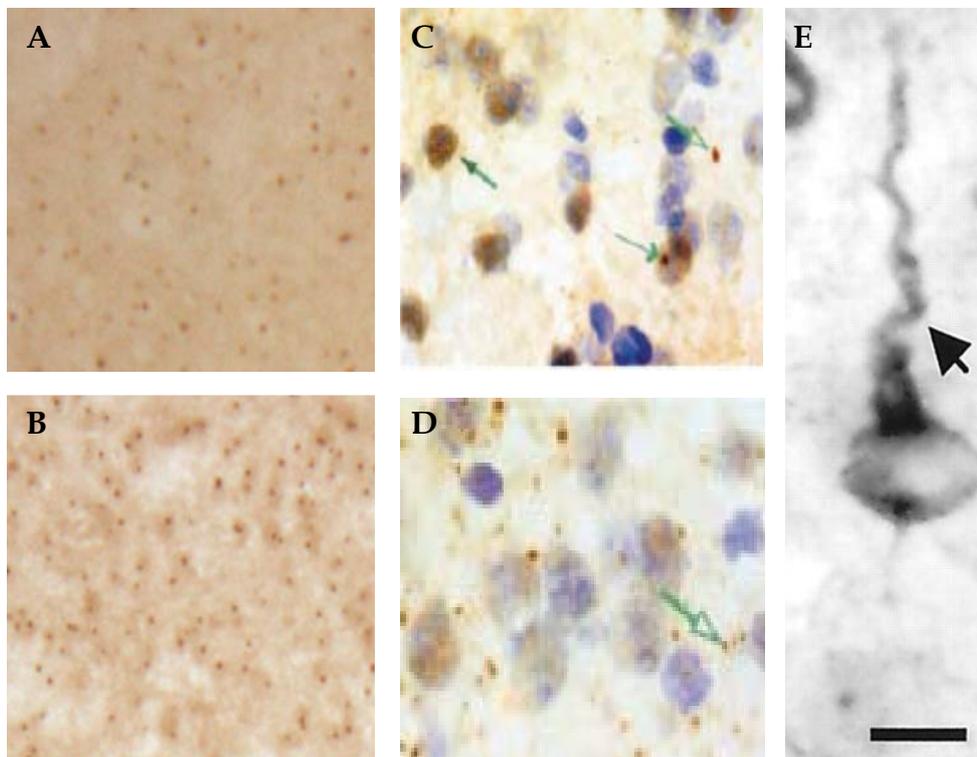


Figura 5. Modelo de las alteraciones del circuito de los ganglios basales en la fase hiperkinética de enfermedad de Huntington. La corteza cerebral motora es sobreestimulada por el tálamo debido a la disminución de la inhibición que sobre él ejercen la sustancia negra parte reticulada (SNpr) y del globo pálido interno (GPi). La menor actividad inhibitoria de la SNpr y del GPi se debe a la prevalencia funcional de la vía directa sobre la vía indirecta, resultado de la degeneración de las neuronas estriatopalidales. Los signos + y - indican que la conexión es excitadora o inhibitoria, respectivamente.

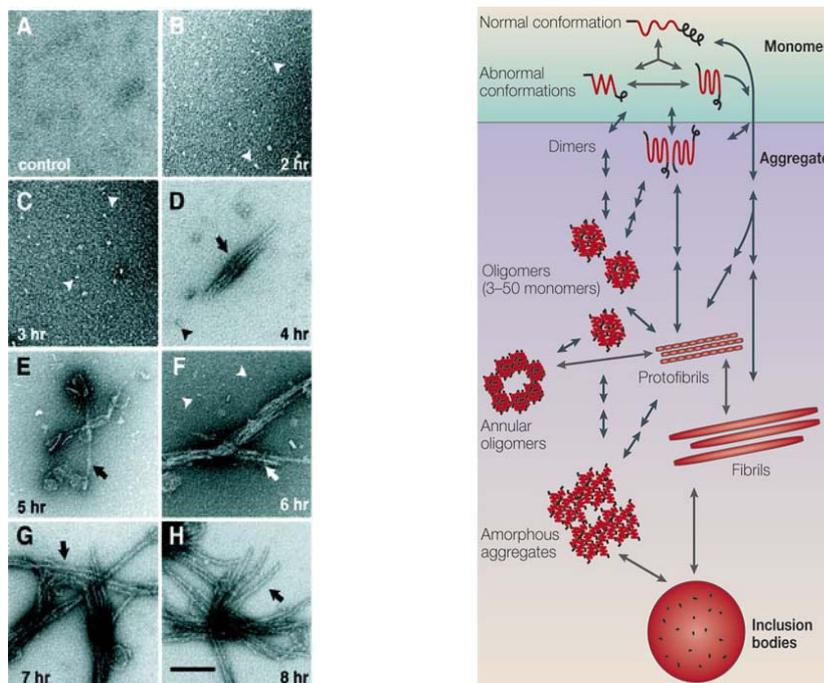
La disfunción selectiva de las neuronas estriatopalidales (vía indirecta estimuladora del globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada) conlleva a un desbalance a favor de la vía estriatonigral (vía directa inhibitoria del globo pálido interno y la sustancia negra parte reticulada), disminuyendo la inhibición que ejercen la sustancia negra parte reticulada y el globo pálido interno sobre el tálamo. Este desequilibrio, aumentaría la estimulación talámica de la corteza premotora, lo que facilitaría la realización de los movimientos. Este modelo explica la aparición de movimientos coreicos, propios de la fase hiperkinética de la enfermedad (figura 5).

Por último, uno de los hallazgos histopatológicos más llamativos en la enfermedad de Huntington es la detección de depósitos de la proteína mutada en

forma de cuerpos de inclusión o agregados intraneuronales, tanto en el núcleo estriado como en la corteza cerebral (Figura 6; DiFiglia y col., 1997; Davies y col., 1997). Estos agregados suelen ser mayoritariamente intranucleares, aunque pueden detectarse también en el citoplasma perinuclear o en el neurópilo, donde suelen asociarse a dendritas distróficas (DiFiglia y col., 1997; Becher y col., 1998; Gutekunst y col., 1999). Son fácilmente detectables con anticuerpos contra la htt mutada y una pequeña proporción de estos se tiñen con colorantes como el “rojo congo” y la tioflavina-S, los cuales tiñen péptidos amiloideos (Elghetany y Saleem, 1988; McGowan y col., 2000).



**Figura 6.** Agregados de intraneuronales de huntingtina mutada. A-B. Microfotografía del núcleo estriado en el que se muestran los agregados intranucleares de htt detectados con inmunohistoquímica contra la htt mutada (A) o la ubiquitina (B). C-D. Tinción de Nissl combinada con inmunohistoquímica contra la htt mutada del núcleo estriado (C) y de la corteza cerebral (D) en la que se muestran las diferentes localizaciones de los agregados, intranuclear (flecha rellenas en C) o citoplasmática (flecha huecas en C y D). E. Inmunohistoquímica contra la htt mutada que muestra a gran aumento un agregado dendrítico (flecha) y el trayecto aberrante de la dendrita que lo contiene.[C y D, tomadas de Yamamoto y col., 2001. E, tomada de Laforet y col., 2001].



**Fig. 7.** A la izquierda se muestran con microscopía electrónica los diferentes intermediarios de la polimerización de la htt mutada. A-H, corresponden a la polimerización espontánea *in vitro* del exón 1 de la htt mutada con 44Q. Los oligómeros de 4-5nm (flechas blancas) son visibles desde las 2 o 3 horas (B y C respectivamente). A partir de las 4 horas se evidencian protofibrillas (flechas negras en D y E) y oligómeros. Pasadas 7 horas sólo se detectan fibras maduras (flechas negras en G y H). Barra de escala: 200nm [Tomado de Ross y col., 2002]. A la derecha se muestra un esquema de la formación de cuerpos de inclusión y sus posibles intermediarios. [Tomado de Ross y Poirier, 2004].

El mecanismo responsable de la formación de los agregados no está claro, pero existe evidencia que sugiere que la mutación de la htt induciría algún tipo de cambio conformacional en su estructura secundaria que facilitaría la asociación entre sus moléculas (figura 7; Perutz y col., 2002; Poirier y col., 2002). Además, es posible que dicho cambio conformacional disminuya la susceptibilidad de la htt a ser degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma, ya que los agregados también son inmunoreactivos para la ubiquitina y componentes del proteosoma (Hernandez y col., 2004; Ross y Pickart, 2004; Venkatraman y col., 2004). Por otra parte, la proteólisis de la htt mutada se ha vinculado con el proceso de agregación. En este sentido, se ha descrito que ruptura de la htt mutada por diversas proteasas facilita la formación de agregados (Peters y col., 1999; Wellington y col., 2000; Kim y col., 1999, 2001; Lunkes y col., 2002; Gafni y col., 2004), ya que los segmentos cortos (N-terminales) productos de la proteólisis de la htt mutada

forman más agregados que la htt mutada completa (Davies y col., 1997; Hackan y col., 1998; Lunkes y Mandel, 1998; Hodgson y col., 1999).

La relevancia de los agregados intracelulares en la patología no ha sido aclarada completamente, ya que existe poca correlación entre la presencia de los agregados y otros indicadores de neurodegeneración. En muestras procedentes de enfermos de Huntington los agregados son más frecuentes en la corteza que en el núcleo estriado, siendo este último el núcleo más afectado por la patología (Gutekunst y col., 1999). Por este motivo se ha sugerido que la toxicidad de los agregados podría depender de factores como su localización dentro de la célula o el estado de polimerización de la htt mutada antes de formar el agregado propiamente dicho (Ross y Poirier, 2005).

#### **4.-Etiología de la enfermedad de Huntington**

La causa de la enfermedad de Huntington es una mutación específica que consiste en la elongación de un segmento de repeticiones CAG en un gen llamado IT15, el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 4 y codifica para la proteína htt (Gusella y col., 1983, HD CRG, 1993). El gen IT15 está compuesto por 67 exones con un total de 170.000 pares de bases. Posee de 7 a 35 repeticiones de CAG en los individuos normales, el cual codifica para un segmento de poliglutaminas (poliQ), pero cuando se extiende por encima de 40 repeticiones se produce la enfermedad de Huntington. Además de la enfermedad de Huntington, existen otras 8 enfermedades neurológicas, tales como algunos tipos de ataxia espinocerebelosa y la atrofia dentadorubal-páldolusiana, que siguen un patrón autosómico dominante y que también son causadas por la expansión de un segmento poliQ en proteínas diferentes (Evert y col., 2000; Nakamura y col., 2001; Margolis y Ross, 2001). Aunque no hay homología en las

secuencias de las diferentes proteínas mutadas, en todas estas enfermedades mientras más largo es el segmento poliQ, más severa será la patología y más temprana será el inicio de los síntomas específicos de cada una (Andrew y col., 1993; Margolis y Ross, 2001). Para conocer el mecanismo nocivo de la mutación de la htt, primero se han de conocer las características y funciones de la htt normal.

### 4.1.-La huntingtina: Estructura, expresión y posibles funciones

La htt es una proteína de 348 KDa, tiene aproximadamente 3.136 aminoácidos y posee un segmento poliQ que comienza en el residuo 17 seguido de un segmento de repeticiones del residuo prolina, muy cerca del extremo N-terminal (Cattaneo y col., 2005). Puede ser modificada postranscripcionalmente por ubiquitinación del segmento N-terminal o por fosforilación de los residuos serina ubicados en el dominio rico en este aminoácido. Además, puede sufrir la acción proteolítica dependiente de caspasas o calpaina (Peters y col., 1999; Wellington y col., 2000; Kim y col., 1999, 2001; Lunkes y col., 2002; Gafni y col., 2004), tal como muestra la figura 8.

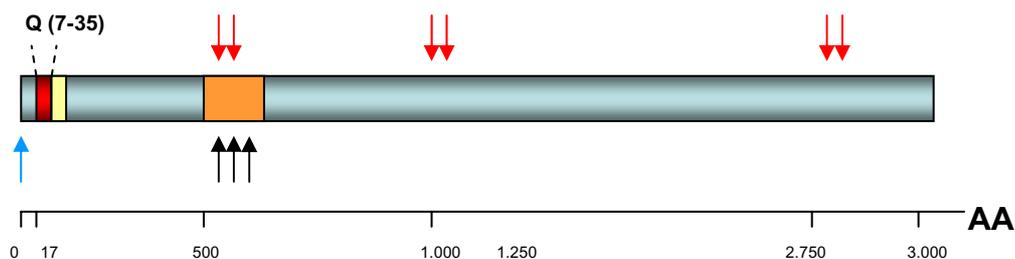


Figura 8. Esquema de la estructura de la huntingtina. La escala muestra el número de aminoácidos. El recuadro rojo representa el segmento poliQ con la extensión normal (7 a 35 repeticiones). Los recuadros amarillo y naranja representan los dominios de poliprolinas y el dominio rico en serinas, respectivamente. Las flechas rojas indican puntos susceptibles de ser clivados por caspasas y/o calpaina, mientras que las flechas negras representan residuos fosforilables. La flecha azul indica el sitio de ubiquitinación. [Modificado de Cattaneo, 2006].

La htt es una proteína de expresión ubicua, los niveles máximos de expresión están en los testículos y el SNC. Dentro del cerebro, se expresa mayoritariamente en la corteza cerebral, corteza cerebelosa, hipocampo y el núcleo estriado (DiFiglia y col., 1995; Gourfinkel-An y col., 1997; Li y col., 1993; Sharp y col., 1995). La expresión de la htt en las diferentes estructuras del cerebro no explica la degeneración selectiva de las neuronas estriatales en la enfermedad de Huntington (Fusco y col., 1999). Además, se expresa tanto en neuronas como en células de la neuroglía (Lievens y col., 2001; Shin y col., 2005). Dentro de la célula, la htt se localiza prácticamente en toda la célula. Es mayoritariamente citoplasmática pero también se puede ubicar en el núcleo (Hoogveen y col., 1993; Kegel y col., 2005), asociándose con varias organelas y estructuras, tales como mitocondrias, membrana citoplasmática y endosomas (DiFiglia y col., 1995; Trottier y col., 1995; Gutekunst y col., 1995). La htt también se asocia al citoesqueleto del soma, dendritas, axones y terminales nerviosos (DiFiglia y col., 1995; Gutekunst y col., 1995; Sapp y col., 1997; Sharp y col., 1995; Takamoto y col., 1997). Su amplia distribución y los múltiples dominios de interacción proteína-proteína de su estructura sugieren que está involucrada en múltiples y variadas funciones, posiblemente participando en la creación de grandes complejos multiproteicos. Una de las posibles funciones está relacionada con el transporte intracelular y la endocitosis ya que la htt está asociada a membranas intracelulares que contienen clatrina (Velier y col., 1998), a organelas como el aparato de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas, microtúbulos y mitocondrias (DiFiglia y col., 1995; Sharp y col., 1995; Trottier y col., 1995; Gutekunst y col., 1998). Además, se han caracterizado las proteínas que interactúan tanto con la htt normal como con la mutada. Entre ellas, la HAP-1 (del inglés, *htt associated protein-1*; Block-Galarza y col., 1997; Li y col., 1995), la HIP-1 (del inglés, *htt interactin protein-1*; Kalchman y col., 1997; Wanker y col., 1997) y la HIP-14 (Singaraja y col., 2002) están asociadas a vesículas y al aparato de Golgi y pueden interactuar con proteínas del

citoesqueleto, lo que sugiere un papel para la htt en la endocitosis, tráfico intracelular y reciclaje de membranas (Gusella y MacDonald, 1998). De hecho se ha sugerido que la htt participa en el tráfico post-Golgi dependiente de la clatrina (Del Toro y col., 2006). También se ha vinculado la htt con el control de la transcripción génica. Por una parte, la htt interacciona directamente con factores de transcripción, como por ejemplo el REST/NRSF (del inglés, *repressor element-1 transcription/neuron restrictive silencer factor*), impidiendo que éste se una a secuencias represoras específicas de ADN (Zuccato y col., 2003). Mientras que, la extensión del segmento poliQ se ha vinculado con alteraciones de la transcripción de genes que están bajo el control de secuencias de ADN reguladoras llamadas CRE (del inglés, *cAMP-response elements*), ampliamente relacionados con la supervivencia neuronal (Lonze y Ginty, 2002). De esta manera, se han descrito alteraciones en la expresión de genes dependientes de CRE en enfermos de Huntington (Wytenbach y col., 2001). En muchos casos la interacción de la htt con algunas proteínas es modulada por el segmento poliQ, como por ejemplo, la HAP-1 (Li y col., 1995), la HIAP-1 (Wanker y col., 1997), la cystationin- $\beta$ -synatasa (Boutell y col., 1998), la caspasa-3 (Goldberg y col., 1996), la GAPDH (del inglés, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; Burke y col., 1996) y la PACSIN-1 (del inglés, *protein kinase C and casein kinase substrate in neurons-1*; Modregger y col., 2002). Otra función importante de la htt es la modulación de la supervivencia celular durante el desarrollo y la edad adulta. Así, los ratones mutantes nulos homocigotos para la htt mueren en el día embrionario 7,5 (Duyao y col., 1995; Nasir y col., 1995; Zeitlin y col., 1995) y la supresión condicional de la expresión de la htt conlleva a neurodegeneración (Dragatsis y col., 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la htt ejerce una función antiapoptótica en células estriatales sometidas a privación de suero o a ácido 3-nitropropiónico (Rigamonti y col., 2001) y su sobreexpresión protege las neuronas estriatales contra la lesión inducida por aminoácidos excitadores (Leavitt y col., 2006). Se ha sugerido que la neurodegeneración

selectiva de la enfermedad de Huntington sea producto de la pérdida de todas o algunas de las funciones de la htt mencionadas anteriormente. Pero, también es posible que la expansión del segmento poliQ le atribuya propiedades tóxicas a la htt, es decir, una ganancia de función.

#### **4.2.-Teorías de la ganancia de función y de la pérdida de función de la htt mutada.**

Las mutaciones pueden causar enfermedad por pérdida de función o por ganancia de función tóxica de la proteína mutada. Determinadas mutaciones causan la pérdida total o parcial de las funciones de una proteína. En el caso de que funcionalidad de la proteína esté completamente comprometida el fenotipo resultante sería similar al ocasionado por la disminución de la expresión de un alelo de la proteína, similar al fenotipo de un heterocigoto nulo del gen (Cattaneo, 2003). Se ha postulado otro mecanismo implicado en la pérdida funcional de una proteína, la dominancia negativa. Este mecanismo, el cual tiene lugar cuando el alelo mutante interfiere con la función del alelo normal, causa más del 50% de la pérdida de función. Esto puede ocurrir cuando la proteína producto del alelo mutado forma complejos activos con la proteína normal y posiblemente con terceras proteínas. En el caso de que la proteína normal secuestrada quede completamente inactivada dentro del complejo con la proteína mutada, la dominancia negativa causaría una pérdida de la función cualitativamente similar, pero cuantitativamente mayor a la producida por la mutación nula de un alelo, peor que el fenotipo de un heterocigoto nulo del gen (Cattaneo, 2003). Existen evidencias de que algunas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Huntington se deben a la pérdida de función de la htt normal (Cattaneo y col., 2001). El desarrollo de ratones knock-out condicionales de la htt normal ha permitido estudiar el papel de la proteína en el animal adulto (Dragatsis y col., 2000). Al silenciar el gen de la

htt, los ratones presentaron un signo neurológico conocido como “clasping” (disonía sostenida de las extremidades al suspender al animal por la cola) que se ha observado también en ratones transgénicos para la enfermedad de Huntington (Mangiarini y col., 1996; Hodgson y col., 1999; Reddy y col., 1998; Yamamoto y col., 2000). El “clasping” observado en los ratones knock-out condicionales de la htt se correlaciona con la degeneración del núcleo estriado y de la corteza cerebral descritas en este modelo (Dragatsis y col., 2000). Por otra parte, la sobre expresión de la htt normal protege contra los efectos tóxicos de la htt mutada (Leavitt y col., 2006). Por último, se ha descrito que la sobreexpresión de la htt mutada evita la actividad de la htt normal sobre la transcripción génica dependiente del factor de transcripción llamado NRSF (Zuccato y col., 2003), lo cual indica que la htt mutada interfiere con la función de la htt normal, es decir que este efecto específico de la htt mutada se debería a un mecanismo de dominancia negativa. No obstante, se ha demostrado que la enfermedad de Huntington no se debe completamente a la pérdida de la función de la htt. En humanos, la pérdida de uno de los dos alelos normales de la htt se ha observado en pacientes con el síndrome de Wolf-Hirschhorn (Ambrose y col., 1994), el cual se debe a la pérdida de una copia del cromosoma 4. De igual manera, los ratones heterocigotos para la htt alcanzan la edad adulta y no presentan el fenotipo de la enfermedad de Huntington (Duyao y col., 1995; Nasir y col., 1995; Zeitlin y col., 1995). En estos casos la pérdida de uno de los alelos de la htt normal no produce un fenotipo de enfermedad de Huntington, a diferencia de los pacientes heterocigotos para la htt mutada, los cuales presentan el fenotipo completo de la enfermedad (Wexler y col., 1987; Durr y col., 1999). Además, el número de tripletes CAG es inversamente proporcional a la edad de inicio de los síntomas (Walter, 2007), sugiriendo la hipótesis de que la expansión del segmento poliQ de la htt le confiere a la proteína una función tóxica. Esta hipótesis fue confirmada rotundamente por el hecho de que la expresión del exón 1 de la htt con el

segmento de repeticiones CAG expandido es suficiente para desarrollar signos neurológicos anormales y neuropatológicos similares a los observados en la enfermedad de Huntington (Mangiarini y col., 1996). Además, esta teoría se ve reforzada por la existencia de otras enfermedades con fenotipo neurológico cuya etiología es la elongación de un segmento de repeticiones CAG dentro de un gen determinado, si bien no existe ninguna homología entre las proteínas codificadas por cada uno de los genes mutantes. De hecho, se ha descubierto que en distintas enfermedades del triplete CAG ocurren alteraciones transcripcionales (Luthi-Carter y col., 2002a, 2002b), lo que refuerza la toxicidad inherente a la expresión de proteínas con segmentos poliQ alargados. Además demuestra que el efecto tóxico del segmento poliQ está regulado por el contexto proteico en el que es expresado, determinando la degeneración selectiva de ciertas poblaciones neuronales y dando como resultado enfermedades diferentes. En este sentido, el desarrollo de múltiples modelos animales, especialmente los ratones transgénicos, ha permitido el estudio de los mecanismos activados por la htt mutada para producir la neuropatología específica de la enfermedad de Huntington.

#### **4.3.-Modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington**

Los modelos animales de la enfermedad de Huntington han sido creados para entender los cambios neuropatológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren en la enfermedad de Huntington. Los grandes avances en genética molecular y el descubrimiento del gen causante de la enfermedad de Huntington han permitido generar diversos modelos de animales modificados genéticamente, los cuales reproducen el patrón selectivo de las alteraciones neuroquímicas, electrofisiológicas e histopatológicas de la enfermedad de Huntington, ya que comparten el mismo origen de la patología humana: La expresión de la htt con una expansión del segmento de

tripletes CAG. Sin embargo, los modelos poseen diferencias en cuanto al promotor empleado, número de repeticiones del triplete CAG, porción de la proteína expresada (completa o segmento N-terminal) y/o grado de expresión del transgén, dando como resultado modelos que recapitulan diferentes grados de la patología humana. Estos modelos los podemos dividir en tres grupos: (1) Ratones que expresan el extremo N-terminal de la htt humana incluyendo el segmento poliQ; (2) ratones que expresan el gen completo de la enfermedad de Huntington, y (3) ratones a los que se les ha insertado un segmento expandido de repeticiones CAG en el gen endógeno de la htt (Knock-in; Figura 9).

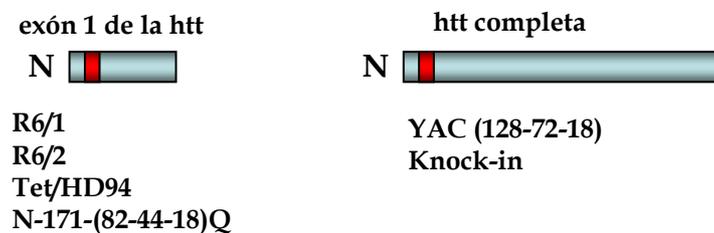


Figura 9. Construcciones empleadas en los ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington. A la izquierda se muestran los modelos basados en la expresión del fragmento N-terminal de la htt (azul) que contiene el dominio poliQ (rojo). A la derecha están los modelos basados en la expresión de la htt mutada completa.

### 4.3.1.-Ratones transgénicos que expresan el segmento N-terminal de la htt mutada

Los primeros ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington, los ratones de las líneas R6, expresan sólo el exón 1 de la htt mutada (Mangiarini y col., 1996). Además de los ratones R6, se han generado otros modelos basados en la expresión del exón 1 de la htt mutada, tales como los ratones Tet/HD94 y los N171.

#### Ratones R6: R6/1 y R6/2

Los modelos R6 fueron los primeros ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington. Los ratones R6/1 y R6/2 fueron generados por microinyección del gen

que codifica el exón-1 de la htt humana con 115 o 150 repeticiones del triplete CAG, respectivamente (Mangiarini y col., 1996). Los R6/1 y R6/2 poseen una o tres copias del transgén, respectivamente, bajo el control del promotor del gen IT15 (Mangiarini y col., 1996). Tienen niveles de expresión de 31% en los R6/1 y 75% en los R6/2 con respecto a los niveles de la htt endógena (Mangiarini y col., 1996). Son los ratones transgénicos para la enfermedad de Huntington más estudiados y mejor caracterizados hoy en día. Los animales comienzan a mostrar alteraciones motoras progresivas, como movimientos coreicos, temblores y estereotipias involuntarias, y de acuerdo con la patología humana, en los R6/2 (con segmento poliQ más largo) los síntomas se manifiestan a edades más tempranas y con mayor severidad que en los R6/1. De esta manera, los R6/2 muestran sintomatología motora a partir de las 8 semanas de edad, mientras que los R6/1 lo hacen a partir de las 15 semanas de edad (Mangiarini y col., 1996). Por su parte, los R6/1 presentan una progresión mucho más lenta y pueden llegar a vivir hasta un año. También se ha descrito un déficit cognitivo en estos modelos que es evidente incluso antes de los síntomas motores. Desde las 3,5 semanas de edad los R6/2 exhiben alteraciones progresivas cognitivas y del aprendizaje en pruebas dependientes de la corteza cerebral, el núcleo estriado y el hipocampo (Lione y col., 1999; Murphy y col., 2000).

El análisis neuropatológico muestra que en general el cerebro y el núcleo estriado están atrofiados en los R6/2 (Mangiarini y col., 1996). A diferencia de los R6/1, en los R6/2 se ha detectado cierto grado de muerte neuronal en el núcleo estriado (Mangiarini y col., 1996), por lo que la disminución del volumen estriatal se relaciona con la atrofia neuronal y con fuerte reducción del neurópilo (Klapstein y col. 2001). Uno de los hallazgos histopatológicos más destacados en estos modelos es la presencia de agregados intraneuronales de ubicación intranuclear, perinuclear o del neurópilo.

Están formados principalmente por depósitos de htt mutada, pero se han detectado otras proteínas como la ubiquitina (Hernandez y col., 2004; Ross y Pickart, 2004; Venkatraman y col., 2004). En los R6/2 aparecen progresivamente desde el primer día de vida postnatal y alcanzan el número máximo a los tres meses de vida (Meade y col., 2002).

### **Ratones condicionales Tet/HD94**

El modelo transgénico condicional, expresa el exón 1 de la htt mutada bajo el control de un activador transcripcional llamado tTA (Yamamoto y col., 2000), el cual a su vez al estar controlado por el promotor de la  $\alpha$ CaMKII, restringe la expresión de la htt mutada al cerebro anterior (Mayford y col., 1996). El activador transcripcional tTA puede ser inhibido por tetraciclinas, de manera que el tratamiento con tetraciclinas u homólogos como la doxiciclina detiene la expresión del transgén. Los ratones Tet/HD94 adultos tienen niveles altos de expresión en la corteza cerebral, núcleo estriado, septum e hipocampo. Presentan agregados tanto en la corteza como en el núcleo estriado, pero la proporción de agregados citoplasmáticos es mucho mayor en la corteza que en el estriado (Yamamoto y col., 2000). Desde las 18 semanas de edad los ratones condicionales presentan una clara atrofia cerebral, sobretodo del núcleo estriado (Yamamoto y col., 2000; Martin-Aparicio y col., 2001). Sin embargo no se ha detectado pérdida de neuronas estriatales incluso en ratones de 10 meses de edad (Martin-Aparicio y col., 2001). Los ratones Tet/HD94 también presentan cuerpos de inclusión intracelulares detectables con anticuerpos contra la htt mutada (Yamamoto y col., 2000). Se han detectado agregados inmunopositivos para htt desde las 8 semanas de edad en la corteza cerebral y en el núcleo estriado (Yamamoto y col., 2000). En el núcleo estriado los agregados de htt se ubican preferiblemente dentro del núcleo

neuronal, mientras que los de la corteza cerebral se ubican tanto en el núcleo como en el neurópilo (Yamamoto y col., 2000). Estos ratones muestran una alteración motora progresiva desde las 4 semanas de edad evidenciada por la presencia del “clasping”, aunque el significado fisiopatológico de esta alteración no está claro. Además, a las 20 semanas de edad los Tet/HD94 comienzan a presentar temblores moderados y a las 36 semanas son hipoactivos (Yamamoto y col., 2000). En general el fenotipo motor es mucho menos severo que el de los R6, y pueden vivir hasta los 2 años de edad (Yamamoto y col. 2000).

#### **Ratones N171: N171-82Q; N171-44Q y N171-18Q**

Los ratones N171 expresan los primeros 171 aminoácidos del extremo N-terminal de la htt con 82 (N171-82Q);, 44 (N171-44Q) o 18 (N171-18Q) glutaminas (Schilling y col., 1999) bajo el control del promotor priónico (Schilling y col., 1999). Los ratones N171-82Q desarrollan alteraciones del comportamiento, la coordinación motora, temblores, claspings e hipoactividad. La vida media de estos ratones está entre los 3 y 4 meses de edad (Schilling y col., 1999; Andreassen y col., 2001). Se ha descrito que presentan agregados intranucleares y del neurópilo en la corteza cerebral, núcleo estriado, hipocampo y cerebelo desde las 4 semanas de edad (Schilling y col., 1999).

#### **4.3.2.-Ratones transgénicos que expresan la huntingtina mutada completa**

Algunos modelos transgénicos expresan el gen completo de la htt mutada, bien por transfección de un gen entero de la htt mutada o por inserción de un segmento expandido de tripletes CAG dentro del gen la htt endógena. Dentro de este grupo se encuentran los ratones “YAC” y los ratones “Knock-in”, respectivamente.

### **Ratones “YAC”**

Los modelos “YAC” (del inglés, *yeast artificial chromosome*) hacen referencia al cromosoma artificial de levadura que se emplea como vector de clonación de grandes fragmentos de ADN. Estos animales expresan la htt humana completa bajo la influencia de su promotor. Se han creado varias líneas con diferente número de repeticiones CAG, los YAC18 como controles con 18 repeticiones CAG, y los que presentan el fenotipo huntingtoniano, los YAC72 (Hodgson y col., 1999) y los YAC128 (Slow y col., 2003), con 72 y 128 repeticiones del triplete CAG respectivamente. Estos transgenes están bajo el control del promotor del gen IT15 y se expresan con el mismo patrón temporo-espacial de la htt endógena del animal (Hodgson y col., 1999). Como era de esperar, aquellos ratones con mayor número de repeticiones CAG muestran antes y con mayor severidad las alteraciones motoras. Así, la edad de inicio de los síntomas motores (comportamiento hiperkinético) se comienza a manifestar a los 7 y 2-3 meses en los YAC72 y los YAC128, respectivamente (Hodgson y col., 1999; Van Raamsdonk, 2005). Además, ambos ratones presentan disminución del volumen estriatal y signos de degeneración de las neuronas estriatales de proyección, pero sólo el YAC128 sufre pérdida de neuronas estriatales y corticales. Dentro de este grupo de ratones YAC está el YACss (del inglés, *short stop*) el cual es una variación del YAC128 pero con la htt mutada truncada (Slow y col. 2005). Este ratón expresa los exones 1-2 de la htt con aproximadamente 120 repeticiones CAG pero sorprendentemente no muestra signos conductuales ni histológicos de neurodegeneración (Slow y col., 2005).

## **Ratones “Knock-in”**

Los ratones Knock-in han sido generados por recombinación homóloga de los tripletes CAG expandidos en el gen endógeno de la htt del ratón. Por este motivo, los ratones Knock-in tienen la mutación en el sitio correcto del genoma, a diferencia de los otros modelos transgénicos en los cuales el transgén ha sido insertado al azar dentro del genoma. De esta manera son el modelo que mejor imita la mutación causante de la enfermedad en los humanos. También se han generado diferentes líneas con diferentes números de repeticiones del triplete CAG (Menalled, 2005). Una de estas líneas es la HdhQ111, con 111 repeticiones CAG. Estos ratones muestran un fenotipo motor muy discreto, que consiste en una fase de hiperactividad que va desde los 2 a los 4 meses de edad, seguido de una fase hipoactiva (Lin y col., 2001), con poca afección motora incluso en los animales más viejos (24 meses de edad). El análisis histológico ha revelado que los knock-in con 94 repeticiones CAG presentan agregados intranucleares sólo en el núcleo estriado, mientras que están más ampliamente distribuidos en los knock-in que tienen 140 y 150 repeticiones (Wheeler y col., 2000). Vale la pena resaltar que ninguna de las líneas de ratones knock-in sufren pérdida neuronal.

En general, los modelos transgénicos recapitulan diferentes estadios de la patología, por lo que difieren en cuanto a la edad de inicio y severidad de los síntomas, número y distribución de los agregados intraneuronales y al grado de degeneración y muerte neuronal. Sin embargo, se puede afirmar que pocas enfermedades neurodegenerativas cuentan con modelos transgénicos tan buenos como la enfermedad de Huntington. De esta manera, los ratones transgénicos han constituido un excelente escenario para la investigación de los mecanismos fisiopatológicos asociados al desarrollo y la selectividad de la patología de la enfermedad de Huntington.

**5.-Fisiopatología de la enfermedad de Huntington.**

El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Huntington se ha basado en evidencias obtenidas de la investigación de las características fisiológicas propias de las células más afectadas, las neuronas estriatales de proyección. Además, son fruto del análisis de los propios pacientes de la enfermedad en las fases presintomática y sintomática, así como el estudio de modelos celulares y animales de la enfermedad de Huntington. De esta manera se han identificado numerosos mecanismos potencialmente implicados en la fisiopatología, tales como: La excitotoxicidad, la falta del soporte neurotrófico, la alteración del metabolismo energético y las alteraciones transcripcionales, entre otras (figura 10).

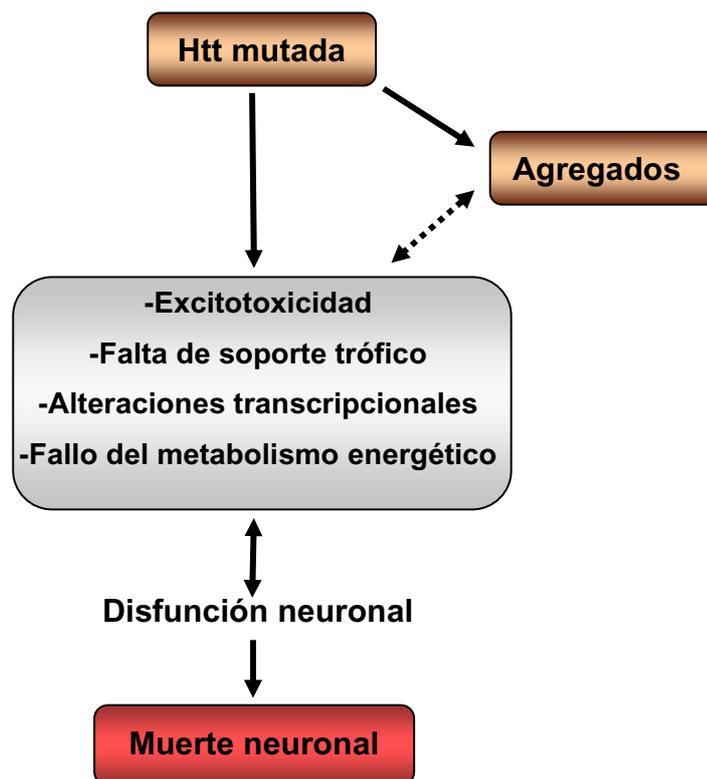


Figura 10. Mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Huntington. La htt mutada activa diversos mecanismos que en conjunto determinan la neurodegeneración estriatal selectiva de la enfermedad de Huntington. A su vez, la htt mutada forma agregados intraneuronales, aunque la participación de estos en la activación de los mecanismos patológicos no ha sido aclarada.

Estos mecanismos, lejos de ser mutuamente excluyentes, se postula que pueden interactuar conjuntamente, permitiendo explicar la selectiva degeneración de las neuronas estriatales de proyección que se observa en la enfermedad de Huntington. En el presente trabajo nos centraremos en estudiar la excitotoxicidad y la falta del soporte trófico.

### **5.1.-Implicación de la excitotoxicidad en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington**

El glutamato, principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, es crucial no sólo para la transmisión sináptica, sino también para modificaciones neuronales a largo plazo como la arborización dendrítica, plasticidad sináptica y el control de la expresión génica. Una vez liberado al espacio sináptico, el glutamato activaría diversos mecanismos fisiológicos mediante la activación de varios tipos de receptores. Sin embargo, un desequilibrio en la transmisión glutamatérgica puede activar mecanismos intracelulares de muerte neuronal, más que de supervivencia o plasticidad (Lynch y Guttman 2001; y 2002). Este proceso se conoce como excitotoxicidad, y consiste en la sobreactivación de los receptores de glutamato lo que produce a su vez un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  que conlleva finalmente a la muerte neuronal (Sattler y Tymianski, 2000). Ahora pasaremos a describir los receptores a través de los cuales el glutamato ejerce tanto sus funciones fisiológicas como neurotóxicas.

### **5.1.1.-Receptores de glutamato: tipos de receptores y expresión en el núcleo estriado**

**Receptores Ionotrópicos:** Los receptores ionotrópicos son canales iónicos transmembrana activados por glutamato que modifican rápidamente las propiedades eléctricas de las membranas mediando los efectos rápidos del glutamato. Estos presentan diferencias estructurales que les confieren perfiles farmacológicos específicos que han permitido su clasificación en dos grupos: Los receptores tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) y los no-NMDA. Ambos tipos de receptores están compuestos por varias subunidades o proteínas transmembrana que, en conjunto, forman un canal iónico activado por glutamato.

**Receptores ionotrópicos tipo NMDA:** Los receptores NMDA son heterotetrámeros compuestos por al menos una subunidad básica NR1 que une glicina y dos o más subunidades NR2A-D que unen glutamato (Cull-Candy 2001; Mayer y Armstrong, 2004). Las subunidades NR1 pueden unirse además a subunidades NR3A-B las cuales poseen también un sitio de unión a glicina (Chatterton y col., 2002). Las propiedades funcionales del receptor están determinadas por la combinación de las subunidades que lo componen. Así, los receptores NMDA que contienen subunidades NR2A-B presentan mayor conductancia a  $\text{Ca}^{2+}$  y rápida desactivación, mientras que aquellos que contienen subunidades NR2C-D y NR3A-B presentan una baja permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y desactivación más lenta (Perez-Otano y col., 2001; Cull-Candy 2001; Waxman y Lynch, 2005). Igualmente, las diferencias en los extremos C-terminales (porciones intracelulares) de las subunidades determina una especificidad diferencial de los receptores para interaccionar con determinadas proteínas que controlan su tráfico, anclaje a la membrana y las vías de señalización intracelular a las que se acoplaría. Por ejemplo, las subunidades NR2A-D, y en menor medida las NR1 (Kornau y col., 1995), se asocian a

proteínas de las densidades postsinápticas llamadas MAGUKS (del inglés, *membrane associated guanylate kinases*), las cuales serán descritas más adelante en una sección especial. La interacción diferencial de las subunidades NR1 y NR2 con algunas MAGUKS se debe a que éstas se unen a las secuencias S/TXV presentes sólo en los extremos carboxilo terminales de las subunidades NR2 y en algunas formas de subunidades NR1 (Kornau y col., 1995). Por otra parte, la composición del receptor NMDA determina además su localización sináptica. Por ejemplo, los receptores compuestos por subunidades NR1/NR2A-B se localizan en el núcleo de las densidades postsinápticas, mientras que los receptores compuestos por subunidades NR1/NR3A se localizan en las zonas periféricas de las densidades postsinápticas (Perez-Otano y col., 2006). Los agonistas selectivos de los receptores tipo NMDA son el NMDA y el ácido quinolínico (QUIN).

**Receptores ionotrópicos tipo no-NMDA:** Estos receptores se subdividen en receptores AMPA (Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato) y kainato. Los receptores tipo AMPA, con el AMPA como agonista selectivo, poseen cuatro subunidades diferentes (GluR1-4). De estas, las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 son capaces de formar homotetrámeros funcionales, mientras que la subunidad GluR2 necesita la presencia de las subunidades GluR1 o GluR3 para formar receptores funcionales (Palmer y col., 2005). Por otra parte, los receptores tipo Kainato, con el ácido kaínico como agonista selectivo, están conformados por las subunidades GluR5-7 y KA1-2. Las subunidades KA1 y KA2 han de acoplarse a subunidades GluR5-7 para formar canales funcionales. Los receptores AMPA y Kainato también se asocian a proteínas intracelulares específicas que modulan su tráfico y expresión en las membranas postsinápticas, las GRIP (del inglés, *glutamate receptor interacting proteins*) y las AIP (del inglés, *AMPA receptor interacting proteins*; Palmer y col., 2005). En menor medida, algunas

## Introducción

subunidades AMPA/Kainato pueden asociarse directamente a las MAGUKS (García y col., 1998; Cai y col., 2002), aunque también pueden interactuar de forma indirecta a través de la proteína stargazina, formando un complejo trimérico AMPA:Stargazina:MAGUK (Chen y col., 2000). Las principales características de los receptores ionotrópicos para glutamato se resumen en la tabla 1.

TIPO DE RECEPTOR			
	NMDA	No-NMDA	
		AMPA	Kainato
<b>SUBUNIDADES</b>	NR1, NR2A-D y NR3A-B	GluR1-4	GluR5-7 y KA1-2.
<b>AGONISTA</b>	NMDA Y QUIN	AMPA	Kainato
<b>CONFORMACIÓN FUNCIONAL</b>	Heterómeros que contengan NR1	Homo/heterómeros	Heterómeros de GluR5-7 o Heterómeros de KA1-2/GluR5-7.
<b>PERMEABILIDAD A CALCIO</b>	NR1/NR2A-B: Alta NR1/NR2C-D: Baja. NR1/NR3: Muy baja	Todos, excepto los que contienen GluR2	Todos
<b>LOCALIZACIÓN</b>	Postsinápticos	Postsinápticos	Pre y postsinápticos

Tabla 1. Características de los receptores ionotrópicos de glutamato.

**Receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR):** Son receptores acoplados a proteína G que traduce la señalización glutamatérgica mediante la producción de segundos mensajeros intracelulares y se dividen en tres grupos. La estimulación de los receptores del grupo I (mGlu1 y mGlu5) promueven la activación de la proteína quinasa C mediante la hidrólisis de fosfoinositol y el metabolismo de los almacenes intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Los receptores del grupo II (mGlu2 y mGlu3) y los del grupo III (mGlu4 y mGlu6-8) están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa,

bajando los niveles de AMP cíclico. La activación de los receptores del grupo II y III induce la inhibición de la liberación de glutamato por las terminales corticoestriatales (Testa y col., 1998). La activación de los receptores del grupo I potencia el incremento de la entrada de  $Ca^{2+}$  inducido por la activación de los receptores NMDA selectivamente en las neuronas estriatales de proyección, pero no en las interneuronas estriatales (Calabresi y col., 1999). De esta manera, los tratamientos farmacológicos con agonistas del grupo II y III o con antagonistas del grupo I tienen efectos neuroprotectores (Bruno y col., 1998).

### **5.1.2.-La excitotoxicidad en la enfermedad de Huntington**

El núcleo estriado recibe una gran cantidad de aferencias glutamatérgicas desde la corteza cerebral y el tálamo (Cepeda y col., 2006), por lo que las neuronas estriatales están sometidas al riesgo de sufrir daños excitotóxicos inducidos por el glutamato. El análisis *postmortem* de cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington ha reforzado la participación de la excitotoxicidad en la degeneración selectiva de las neuronas estriatales en estos pacientes. En los núcleos estriados de enfermos de Huntington se ha descrito una disminución de los receptores NMDA (Dure y col., 1991), sugiriendo que son precisamente las neuronas estriatales que expresan estos receptores las más susceptibles a degenerar (Young y col., 1988; Albin y Gilman, 1990). Sin embargo, los receptores NMDA son expresados tanto por interneuronas y neuronas de proyección estriatales (Standaert y col., 1994; Landwehrmeyer y col., 1995), así como por neuronas del hipocampo y del cerebelo (Standaert y col., 1996), zonas que no están afectadas en la enfermedad de Huntington, por lo que la expresión de receptores NMDA *per se* no explica como son afectadas selectivamente las neuronas estriatales de proyección, o como unas regiones cerebrales son afectadas mientras que otras no. Por

este hecho se ha sugerido que la composición diferencial de los receptores NMDA en estas zonas del cerebro podría explicar la degeneración selectiva en la enfermedad de Huntington. Esta teoría es reforzada por el hecho de que la htt mutada potencia la muerte excitotóxica mediada por receptores NMDA que contengan la subunidad NR2B (Chen y col., 1999; Zeron y col., 2002, Li y col., 2003b, 2004), los cuales son expresados por todas las neuronas estriatales de proyección (Standaert y col., 1999), las más afectadas en la enfermedad, mientras que otras zonas del cerebro que no son afectadas por la enfermedad de Huntington, como el cerebelo o el tronco cerebral, expresan relativamente menos NR2B que las neuronas estriatales (Hollmann y Heinemann, 1994; Monyer y col., 1994; Portera-Cailliau y col., 1996; Goebel y Poesch, 1999; Thompson y col., 2000).

Los agonistas de los receptores de glutamato tipo NMDA y kainato han sido utilizados como modelos de diversas patologías con sustrato excitotóxico, tal como la enfermedad de Huntington. Cuando se inyecta dentro del núcleo estriado un agonista de los receptores para glutamato se produce una lesión que consiste en la muerte de las neuronas alrededor del sitio de inyección. De entre los diferentes agonistas para los receptores de glutamato, es la inyección QUIN la que recapitula más fielmente los hallazgos histopatológicos de la enfermedad de Huntington (Schwarcz y kohler, 1983; Beal y col., 1986, Ferrante y col., 1993). Al igual que en la enfermedad de Huntington, la lesión inducida por QUIN conlleva principalmente a la muerte de las neuronas estriatales de proyección, mientras que las interneuronas colinérgicas son menos afectadas (Beal y col., 1986; Davies y col., 1988). En lo que respecta a las interneuronas que expresan somatostatina/NPY/NADPH-d existió una polémica. Los primeros análisis reportaron que estas interneuronas no eran afectadas por la inyección de QUIN (Beal y col., 1986), mientras que un estudio posterior, en el cual se emplearon dosis más bajas

del agonista, no se encontró una menor susceptibilidad al QUIN en estas interneuronas (Davies y col., 1988). Esta polémica fue resuelta posteriormente cuando se analizaron lesiones inducidas por QUIN a largo plazo. Así, se demostró que efectivamente las interneuronas colinérgicas se afectan por la inyección del agonista, pero en menor medida que las neuronas de proyección, y que las interneuronas somatostatina/NPY/NADPH-d positivas se lesionaban aun menos que las colinérgicas (Beal y col., 1991). Además, el estudio histológico del núcleo estriado seis meses después de la lesión demostró un aumento en la densidad de las interneuronas somatostatina/NPY/NADPH-d positivas y un aumento en la concentración estriatal de somatostatina y NPY, debido al mantenimiento de esta población neuronal a largo plazo asociado a la disminución del volumen estriatal (Beal y col., 1991). Por el contrario, la inyección intraestriatal de ácido kaínico no produce un daño selectivo de las neuronas estriatales puesto que induce una disminución en la concentración estriatal de somatostatina (Beal y col., 1985, 1991), la cual se debe a la disminución de la densidad de células somatostatina positivas (Beal y col., 1991).

La susceptibilidad diferencial a la excitotoxicidad inducida por QUIN observada entre las neuronas de proyección y las interneuronas se debe a las diferencias en la composición de los receptores NMDA y a las características electrofisiológicas propias de cada una. Las diferencias en la composición del receptor NMDA pueden afectar la afinidad por el agonista, la sensibilidad al bloqueo por  $Mg^{2+}$  y la cinética de la respuesta. Las interneuronas colinérgicas expresan menos niveles de las subunidades NR1 y NR2B que las neuronas de proyección (Landwehrmeyer y col., 1995). Además, las interneuronas colinérgicas no expresan o expresan muy poca cantidad de subunidad NR2A (Standaert y col., 1996; Richardson y col., 2000), mientras que todas las neuronas de proyección expresan NR1, NR2A y NR2B (Standaert y col., 1999).

Por otra parte, la subunidad NR2D es expresada selectivamente por las interneuronas colinérgicas (Standaert y col., 1996, 1999). La expresión de NR2D y la baja expresión de NR1, NR2A y NR2B puede conferirle al receptor menor afinidad por el agonista (Buller y col., 1994) y menor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Waxman y Lynch 2005; Cull-Candy 2001). Por otra parte, las propiedades electrofisiológicas de estas subpoblaciones neuronales se correlaciona con las diferencias en susceptibilidad al QUIN. Así, las interneuronas responden menos a los agonistas glutamatérgicos (Calabresi y col., 1998). Además, las corrientes de entrada dependientes de los receptores NMDA son menores en las interneuronas colinérgicas que en las neuronas de proyección y se necesita una despolarización más intensa para liberar los receptores NMDA del bloqueo por  $\text{Mg}^{2+}$  en las interneuronas colinérgicas (Cepeda y col., 2001). De esta manera, la menor respuesta acoplada a una diferente composición de los receptores NMDA ayuda a explicar la menor susceptibilidad de estas interneuronas a la lesión inducida por QUIN. Así pues, los patrones de expresión de los receptores de glutamato, las características electrofisiológicas y susceptibilidad excitotóxica diferencial de las neuronas estriatales han sugerido que la sobreestimulación de los receptores de glutamato tipo NMDA podría ser uno de los mecanismos fisiopatológicos que determinan la degeneración selectiva de las neuronas estriatales de proyección en la enfermedad de Huntington.

### **5.1.3-La excitotoxicidad en modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington**

Los datos electrofisiológicos obtenidos en ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington reafirman el papel de la excitotoxicidad mediada por receptores NMDA como mecanismo implicado en la degeneración de las neuronas estriatales. Así, las neuronas estriatales de ratones R6/1 y R6/2 presentan alteraciones

electrofisiológicas que las hacen más fácilmente excitables (Klapstein y col., 2001). Además, en los ratones R6/2 y YAC72 las corrientes dependientes de los receptores NMDA están aumentadas desde fases presintomáticas, aunque el aumento de las corrientes NMDA fue menor en los ratones YAC72 (Cepeda y col., 2001), lo que correlaciona con la lenta progresión de los síntomas y el menor grado de neurodegeneración de este modelo con respecto al R6/2. Además, las corrientes dependientes de receptores AMPA en estos dos modelos no presentan alteraciones (Cepeda y col., 2001), sumando especificidad a los receptores NMDA como partícipes de la fisiopatología de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la htt mutada aumenta de forma selectiva la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA no ha sido del todo aclarada. Se cree que un mecanismo es el incremento de la fosforilación de las diferentes subunidades del receptor NMDA. Se ha demostrado que la htt mutada interacciona con PSD-95 facilitando la fosforilación de los receptores NMDA (Song y col., 2003), lo que correlaciona con los niveles elevados de fosforilación de la subunidad NR1 descritos en neuronas estriatales de proyección de ratones R6/1 (Ariano y col., 2005). Es de resaltar que de entre las dos subpoblaciones de neuronas de proyección del núcleo estriado, los niveles más elevados de fosfo-NR1 fueron encontrados en las neuronas estriatopalidales (Ariano y col., 2005). Se ha postulado que otro mecanismo podría ser la alteración de la homeostasis del glutamato debido a un fallo en su recaptación. Así pues, la recaptación de glutamato por parte de las células gliales de ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington está disminuida debido a la expresión reducida del transportador glial de glutamato 1 (GLT-1) (Shin y col., 2005; Behrens y col., 2002, Lievens y col., 2001), aunque no se han demostrado que los niveles basales extracelulares de glutamato en el núcleo estriado de estos ratones estén aumentados (Behrens y col., 2002). Sin embargo, en la corteza cerebral y el núcleo caudado-putamen de pacientes con fases iniciales de la

enfermedad de Huntington se han detectado que los niveles endógenos de QUIN están incrementados, mientras que en el cerebelo, los niveles endógenos de QUIN son normales en este mismo grupo de pacientes (Guidetti y col., 2004). La participación de la excitotoxicidad inducida por agonistas de los receptores de glutamato ha sido estudiada en ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos modelos son muy controvertidos. Por una parte, las neuronas estriatales de los ratones YAC72 y YAC128 son más sensibles a la inyección de QUIN (Zeron y col., 2002, 2004; Leavitt y col., 2006, Tang y col., 2005). Por el contrario, los ratones R6/1, R6/2 y los N171-82Q son menos sensibles al QUIN que sus respectivos controles (Hansson y col., 1999, 2001; Jarabek y col., 2004). Se ha observado que este patrón de resistencia comienza desde la fase presintomática y aumenta gradualmente en los ratones R6/1 y R6/2, lo que correlaciona con su mejor capacidad para manejar niveles citoplasmáticos de  $Ca^{2+}$  elevados (Hansson y col., 1999). Por este motivo se ha sugerido que la resistencia observada en los modelos que expresan el segmento N-terminal de la htt mutada pudiera deberse a mecanismos protectores que compensan la mayor actividad de los receptores NMDA inducida por la htt mutada que se ha observado en los R6 con respecto a los YAC (Hansson y col., 1999; Jarabek y col., 2004). Dichos mecanismos protectores podrían involucrar cambios en los propios receptores NMDA (Jarabek y col., 2004), a la activación de vías de supervivencia neuronal tal como la dependiente de AKT (Gines y col., 2003a) y/o a mecanismos mitocondriales de homeostasis del  $Ca^{2+}$  (Brustovetsky y co., 2005).

Para comprender mejor los mecanismos involucrados en la excitotoxicidad inducida por la htt mutada y las diferencias en la susceptibilidad excitotóxica entre los diferentes modelos transgénicos se ha de estudiar en profundidad los elementos que participan en la señalización neurotóxica de los receptores NMDA, tales como las

MAGUKS (del inglés, *Membrane Associated Guanylate Kinases*) y la  $\alpha$  Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina proteína kinasa II ( $\alpha$ CaMKII).

#### **5.1.4.-Proteínas de andamiaje y de señalización intracelular de los receptores NMDA: Las MAGUKS y la $\alpha$ CaMKII**

Muchas propiedades de los receptores NMDA son moduladas por proteínas pertenecientes a la familia de las MAGUKS, también conocidas como SAP (del inglés, *synapse-associated proteins*) ya que interactúan directamente con los receptores NMDA y son componentes importantes de las densidades postsinápticas. Esta familia de proteínas está formada por cuatro miembros: PSD-95/ SAP-90 (Cho y col., 1992; Kistner y col., 1993), SAP-102 (Muller y col., 1996), PSD-93/Chapsyn-110 (Brenman y col., 1996b; Kim y col., 1996) y SAP-97 (Muller y col., 1995). Estas comparten en su estructura tres dominios PDZ, un dominio homólogo de SRC3 (SH3) y un dominio guanilato kinasa (GUK) que carece de actividad catalítica (figura 11). A través de los dominios PDZ pueden unirse los extremos C-terminales de las subunidades NR1 y NR2A-D de los receptores NMDA (Kornau y col. 1995), a algunas subunidades de los receptores AMPA y kainato (García y col., 1998; Cai y col., 2002; Dakoji y col., 2003) así como a canales de potasio. La participación de las MAGUKS en el transporte de estas proteínas fue sugerida por el hecho de interactuar con múltiples proteínas relacionadas con los microtúbulos, tales como la MAP1A (Brenman y col., 1998), GAKIN (Hanada y col., 2000), a mPINS (Sans y col., 2005) y miembros del complejo EXOCYST (Sans y col., 2003). De hecho, se sabe que interactúan con los receptores NMDA desde su síntesis en el retículo endoplasmático, y participan tanto en su transporte como en su direccionamiento y estabilización en las membranas postsinápticas (Tomita y col., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que al unirse a los receptores NMDA, las MAGUKS

## Introducción

son capaces de modular su señalización, actuandoa manera de puentes que acercan diversas proteínas transductoras y/o efectoras a los receptores NMDA, haciéndolas especialmente sensibles al flujo iónico que entra a través de ellos (Sattler y col., 1999, Arundine y Tymianski 2003). Las MAGUKS también participan en la plasticidad sináptica mediada por los receptores NMDA y AMPA al modular su actividad sináptica. Se ha descrito que la PSD-95 modula la actividad intrínseca (promedio de apertura del canal) del receptor NMDA (Lin y col., 2004), ya que la sobreexpersión de la PSD-95 disminuye la desensibilización de los receptores NMDA (Li y col., 2003a; Losi y col., 2003) e incrementa la expresión sináptica de receptores AMPA (El-Husseini y col., 2000b). Estos datos se correlacionan con las alteraciones significativas en la LTP (del inglés, *long-term potentiation*; y la LTD (del inglés, *long-term depresión*) descritas en los ratones que carecen de PSD-95 (Migaud y col., 1998).

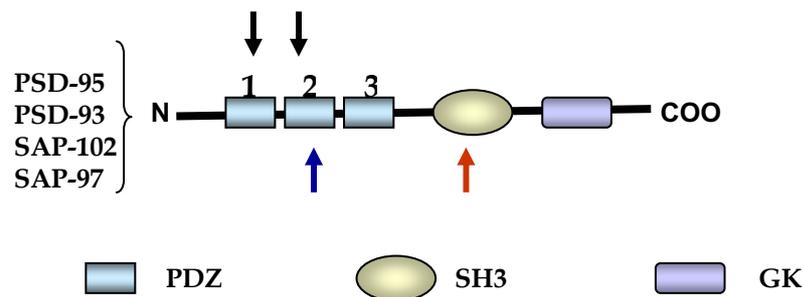


Figura 11. Estructura general de las MAGUKS. Desde el extremo N-terminal se distinguen 3 dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio GK. Las flechas negras indican sitios de unión a los receptores NMDA, la azul el sitio de interacción a la nNOS y la roja el sitio de unión a la htt.

Las MAGUKS presentan ciertas diferencias en cuanto a su expresión que permiten entender su relevancia fisiológica. Así, la PSD-95 y la PSD-93 son las más abundantes en las densidades postsinápticas del cerebro adulto (El-Husseini y col.,

2000a), mientras que la SAP-102 y la SAP-97 son encontradas en dendritas y axones, y se pueden expresar tanto en la sinapsis como en el citoplasma (Valtschanoff y col., 2000; Sans y col., 2001; Rumbaugh y col., 2003). Además, tanto las MAGUKS como las subunidades NR2 de los receptores NMDA presentan diferentes patrones de expresión temporo-espaciales (Sans y col., 2000) por lo que se ha sugerido que las MAGUKS pudieran modular diferencialmente las funciones de los receptores NMDA en diferentes etapas del desarrollo (Sans y col., 2000; Lim y col 2002; Van Zundert y Constantine-Paton, 2004; Elias y col., 2006). De hecho, durante el desarrollo postnatal temprano ocurre la expresión máxima de la SAP-102 y NR2B, mientras que la expresión de la PSD-95, la PSD-93 y la subunidad NR2A aumenta en el cerebro adulto (Sans y col., 2000; Van Zundert y Constantine-Paton, 2004). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en ratones adultos que carecen conjuntamente de la PSD-93 y la PSD-95 disminuye la expresión sináptica de los receptores NMDA, pero no disminuye en los ratones que carecen de la SAP-102 (Elias y col., 2006). También se han descrito diferencias en la capacidad que poseen ciertas MAGUKS de promover la agrupación (“*clustering*”) de los receptores NMDA. Así, la PSD-95, mediante la formación de homodímeros, favorece la agrupación de los receptores NMDA (Kornau y col., 1995), mientras que la PSD-93 no interviene en la agrupación éstos, debido a que carece de la capacidad para formar homodímeros (Kornau y col., 1995). Sin embargo, pese a las diferencias en la expresión (Sans y col., 2000) o en las interacciones proteína-proteína que establecen las MAGUKS (Lim y col., 2002), se han demostrado casos específicos de incremento compensatorio de una MAGUK cuando la expresión de otra esta comprometida (Migaud y col., 1998; Sattler y col., 1999; Elias y col., 2006). Estos cambios compensatorios en la expresión de las MAGUKS ayudarían a explicar la expresión normal de los receptores NMDA en la membrana en ratones que carecen la PSD-95 o que expresan formas mutadas de la PSD-95 (Migaud y col., 1998; Sattler y col., 1999; Elias y

col., 2006). También se ha descrito un incremento en la expresión de SAP-102 en ratones que expresan la PSD-95 mutada (Vickers y col., 2006) así como en ratones que carecen conjuntamente de la PSD-95 y la PSD-93 (Elias y col., 2006). Así pues, las MAGUKS son moduladoras endógenas de la actividad de los receptores NMDA, así como también son esenciales en la activación de vías intracelulares durante procesos fisiológicos y excitotóxicos mediados por los receptores NMDA. Una de las vías ampliamente vinculada con la señalización de los receptores NMDA en la que están involucradas las MAGUKS es la de la nNOS (del inglés, *neuronal nitric oxide synthase*)-p38 kinasa (Sattler y col., 1999; Cao y col., 2005).

La funcionalidad y señalización de los receptores NMDA también está modulada por la  $\alpha$ CaMKII, la cual es una kinasa de residuos serina/treonina, que forma parte de una familia de kinasas con cuatro isoformas, de las cuales la isoforma  $\alpha$  es la más abundante en el cerebro (Hudmon y Schulman, 2002). La  $\alpha$ CaMKII es, después de la PSD-95, la proteína más abundante de las densidades postsinápticas (Chen y col., 2005). Es especialmente sensible a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por los receptores NMDA (Fukunaga y col., col., 1992, 1993) la cual produce su activación (mediante autofosforilación, Colbran, 2004; Colbran y Brown, 2004) y su translocación hacia las densidades postsinápticas, lo que se correlaciona con el aumento en el grosor de estas estructuras inducido por el tratamiento con glutamato (Dosemeci y col., 2001). La localización sináptica de la  $\alpha$ CaMKII está mediada por su asociación a proteínas presentes en la densidad postsináptica (McNeil y Colbran, 1995), tal como los receptores NMDA. Se ha descrito que la  $\alpha$ CaMKII fosforilada se une a los extremos C-terminales de las subunidades NR1, NR2A y NR2B (Shen y Meyer, 1999; Strack y Colbran, 1998, Gadoni y col., 1998, 1999, 2001), siendo su afinidad por la subunidad NR2B aproximadamente 10 veces mayor que por las subunidades NR1 y NR2A (Strack y

Colbran, 1998). Estas interacciones están moduladas por la fosforilación de la  $\alpha$ CaMKII y/o de los receptores NMDA (Shen y Meyer, 1999; Strack y Colbran; Gardoni y col., 1991), por lo que la localización subcelular de la  $\alpha$ CaMKII es regulada dinámicamente por la actividad sináptica (Leonard y col., 1999). La asociación de la  $\alpha$ CaMKII a los receptores de glutamato proporciona un mecanismo para la regulación fina de la función de su actividad enzimática. La activación de la  $\alpha$ CaMKII conlleva a la fosforilación de diferentes sustratos, tales como la nNOS (Watanabe y col., 2003) y los receptores de glutamato tipo AMPA (Leonard y col., 1999; Scannevin y Huganir, 2000; Soderling, 2000). Se ha sugerido que la regulación de la actividad de los receptores AMPA mediada por la  $\alpha$ CaMKII juega un papel importante en la plasticidad sináptica, debido a que la fosforilación de la subunidad GluR1 dependiente de  $\alpha$ CaMKII aumenta la conductancia de los receptores AMPA (Scannevin y Huganir, 2000; Soderling, 2000), y a que este evento tiene lugar durante la LTP (Fukunaga y col. 1993). No obstante, se ha sugerido que tanto la  $\alpha$ CaMKII como las MAGUKS participan en procesos patológicos mediados por los receptores NMDA, tal como la excitotoxicidad.

#### **5.1.5.-Implicación de las MAGUKS y la $\alpha$ CaMKII en la señalización neurotóxica de los receptores NMDA**

La figura 12 esquematiza el papel de las MAGUKS en la señalización intracelular de los receptores NMDA. El conocimiento más detallado de la organización molecular de las densidades post-sinápticas ha permitido desarrollar modelos que ayuden a explicar la toxicidad inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , sobre todo por el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra a través de los receptores NMDA. Se ha demostrado que el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de los receptores NMDA está ligado a vías neurotóxicas específicas para estos receptores mediante la interacción preferencial con proteínas de señalización

localizadas en las densidades postsinápticas (Tymianski y col., 1993). Se ha sugerido que las MAGUKS podrían participar en la activación específica de ciertas vías de señalización intracelular durante la excitotoxicidad (Hou y col., 2005; Aarts y col. 2002), tal como la activación de la proteína kinasa p38 inducida por la producción de óxido nítrico dependiente de la nNOS (Christopherson y col., 1999; Sattler y col., 1999; Cao y col., 2005). Además de las MAGUKS, la  $\alpha$ CaMKII también podría participar en las vías de señalización neurotóxicas durante la excitotoxicidad. Se ha demostrado que la isquemia cerebral transitoria induce un engrosamiento de las densidades postsinápticas (Dosemeci y col., 2001; Chen y col., 2005), el cual se debe en gran medida a un incremento en la expresión sináptica de la  $\alpha$ CaMKII (Chen y col., 2005). En esta condición patológica, la  $\alpha$ CaMKII se une y fosforila rápidamente a la subunidad NR2B de los receptores NMDA (Meng y Zhang, 2002). Además, se ha descrito que tanto la despolarización de neuronas hipocámpales inducida con KCl como la aplicación de glutamato a neuronas hipocámpales *in vitro* también producen un engrosamiento de las densidades postsinápticas (Dosemeci y col., 2001), debido al incremento en la expresión sináptica de la  $\alpha$ CaMKII (Dosemeci y col., 2001; Chen y col., 2005). El aumento de la expresión sináptica de la  $\alpha$ CaMKII podría conducir a una mayor interacción de la  $\alpha$ CaMKII con los receptores para glutamato presentes en la sinapsis, lo que podría participar en la muerte neuronal excitotóxica. Así, se ha demostrado que la isquemia induce un aumento en la cantidad de la  $\alpha$ CaMKII coinmunoprecipitada con la subunidad NR2B (Meng y Zhang, 2002) y un aumento de la fosforilación de esta subunidad mediada por la  $\alpha$ CaMKII (Meng y Zhang, 2002). Por otra parte, los receptores tipo AMPA también son modulados por la  $\alpha$ CaMKII. Se ha demostrado que un aumento en la señalización y en la interacción de la  $\alpha$ CaMKII con los receptores de glutamato tipo AMPA conduce a la muerte de las neuronas hipocámpales en cultivo (Gardoni y col., 2002). Este efecto es bloqueado por inhibidores de la  $\alpha$ CaMKII y

antagonistas de los receptores AMPA, demostrando que la activación de la vía de señalización de la  $\alpha$ CaMKII participa en la muerte neuronal en esta situación (Gardoni y col., 2002). También ha sido descrito que el tratamiento previo con un inhibidor de la  $\alpha$ CaMKII previene la muerte neuronal inducida por la aplicación de NMDA *in vitro* o por isquemia cerebral transitoria (Hajimohammadreza y col., 1995). De esta manera, las proteínas encargadas del andamiaje y la señalización en las sinapsis excitadoras podrían jugar un papel en enfermedades que involucran alteraciones de la neurotransmisión glutamatérgica.

#### **5.1.6.-Las MAGUKS en la enfermedad de Huntington**

La htt podría modular algunas de las funciones de las MAGUKS ya que se ha demostrado que se une directamente a la PSD-95 (Sun y col., 2001). Esta unión se ve alterada cuando la htt presenta una expansión del segmento poliQ, por lo que podría alterar la función de la PSD-95, incluyendo las propiedades de los receptores NMDA mediadas por ésta (Sun y col., 2001). De hecho, la htt mutada induce un aumento de la PSD-95 y la SRC activada en la sinapsis (Song y col., 2003), una enzima tirosina kinasa de los receptores NMDA (Salter y Kalia, 2004). Dichos cambios se correlacionan con el aumento de la fosforilación de la subunidad NR2B de los receptores NMDA inducido por la htt mutada (Song y col., 2003). Por otra parte, se han descrito niveles reducidos de la PSD-95 en ratones transgénicos R6/2 (Luthi-Carter 2002a, 2002b) y N-171-82Q (Jarabek y col., 2004), aunque la relevancia de estas alteraciones en la patología de la enfermedad de Huntington no ha sido aclarada completamente.

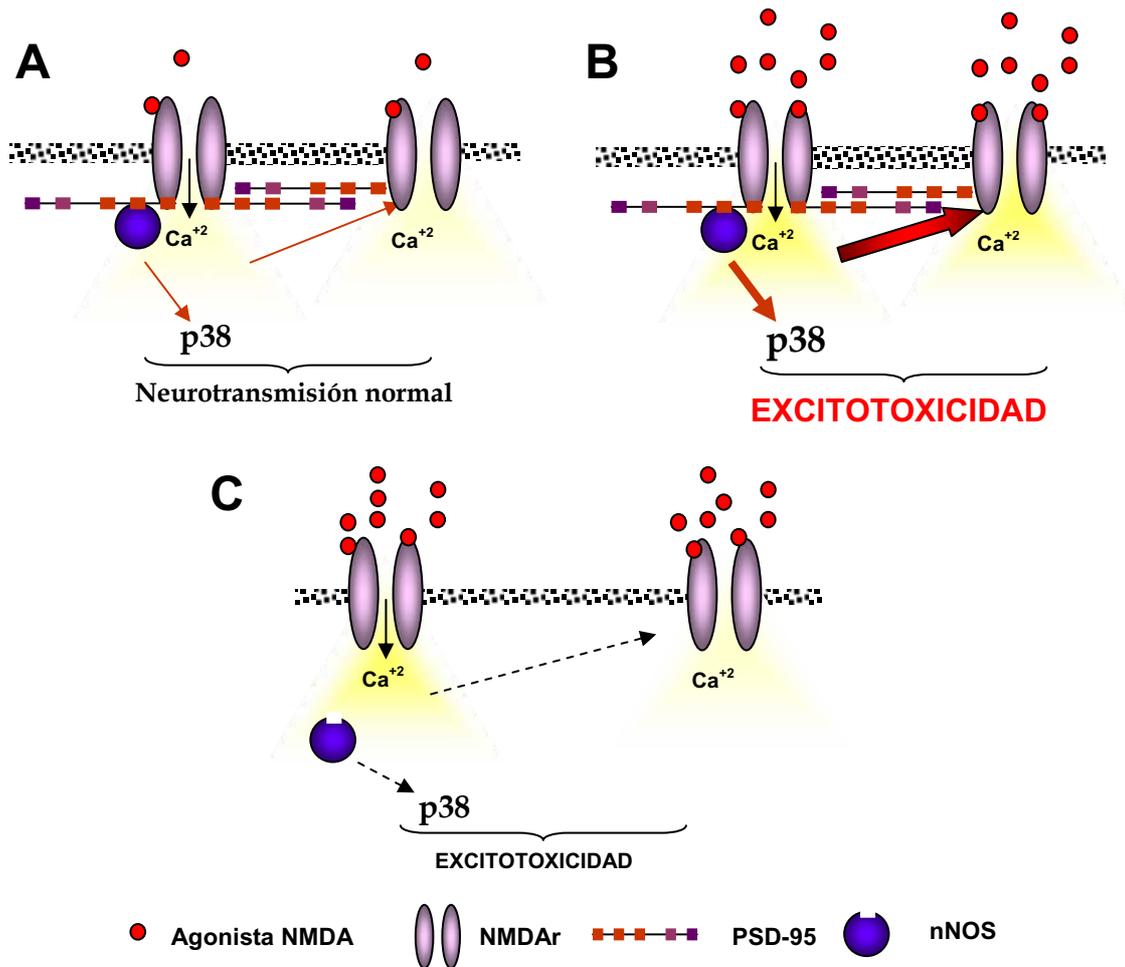


Figura 12. Papel de la PSD-95 en la neurotransmisión y excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA. (A) La activación de los receptores NMDA (NMDAr) induce un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular modulando la transcripción génica dependiente de  $Ca^{2+}$ . Además, la cercanía entre los receptores NMDA y la sintetasa de óxido nítrico (nNOS), propiciada por monómeros o por dímeros de PSD-95, facilita la activación de esta vía, con la subsiguiente activación de la kinas p38. De manera similar, la PSD-95 facilita la potenciación de otros receptores NMDA al formar acúmulos (*clusters*) en la densidad postsináptica, lo que conduciría a una mayor entrada de calcio. (B) Cuando la entrada de  $Ca^{2+}$  es excesiva desencadena una vía neurotóxica en la que participa la sobreexcitación de la vía nNOS-p38, y la sobre potenciación de los receptores de glutamato. (C) La disminución de la expresión de la PSD-95 disminuye tanto la activación de la vía nNOS-p38, como la potenciación de los receptores de glutamato, disminuyendo la señalización neurotóxica inducida por la sobreestimulación de los NMDAr.

## **5.2.-Implicación de las neurotrofinas en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington**

Dada la relevancia de los factores neurotróficos en la supervivencia y la diferenciación neuronal se introdujo la hipótesis de que alteraciones en sus niveles y/o en la transducción de su señal podrían estar implicadas en la fisiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington (Dawbarn y Allen, 2003). Específicamente, las neurotrofinas podrían ser excelentes candidatos para el tratamiento de estas enfermedades (Arenas E., 1996; Semkova y Krieglstein, 1999) debido a los efectos protectores que éstas tienen *in vivo* e *in vitro* sobre las neuronas estriatales (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1996; Alexi y col., 1997; Perez-Navarro, 1999, 2000; Alberch y col., 2002; Dawbarn y Allen, 2003), las más afectadas en la enfermedad de Huntington (Alberch y col., 2002, 2004; Perez-Navarro y col., 2006).

### **5.2.1.-Factores neurotróficos**

Los factores neurotróficos son proteínas endógenas solubles que regulan la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación y la plasticidad neuronal. Sus funciones fueron descritas principalmente durante el desarrollo (Huang y Reichardt, 2001), no obstante actúan también sobre neuronas maduras para mantener su viabilidad y sus características funcionales (Conner y Varon, 1996; Sofroniew y col., 1990). Los factores neurotróficos pueden actuar por diversos mecanismos (figura 13), tales como, un mecanismo retrógrado al ser secretados por la diana de inervación (Thoenen y col., 1987; Altman J., 1992), un mecanismo autocrino en el que la célula secretora del factor trófico posee receptores para éste mismo (Kokaia y col., 1993., Miranda y col., 1993), o bien un

mecanismo paracrino en el que la célula secretora está próxima a la célula receptora (Davies, 1996). Por último, también se ha descrito un mecanismo de acción anterógrado, a través del cual la neurona postsináptica recibe los factores neurotróficos de la neurona presináptica (Von Bartheld y col., 1996; Altar y col., 1997).

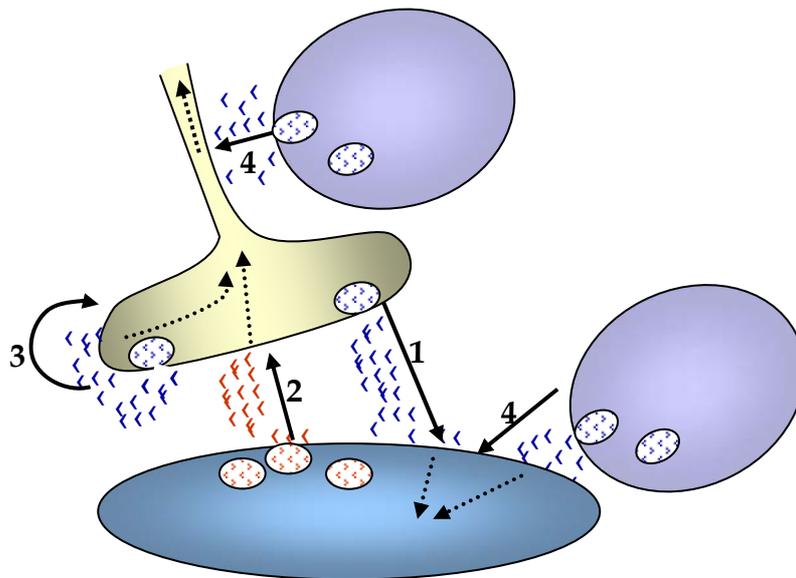


Figura 13. Mecanismos generales de acción de los factores neurotróficos: (1) Anterógrado, (2) retrógrado, (3) autocrino y (4) paracrino. En color amarillo se representa una terminal presináptica, en azul la célula diana (postsináptica) y en violeta dos células del entorno de las neuronas pre y postsinápticas. Las líneas punteadas representan las vías de señalización activadas por los factores neurotróficos en sus respectivas dianas.

Se han descrito una gran variedad de familias de factores tróficos con distintas funciones y diferentes patrones temporo-espaciales de expresión. Entre éstas tenemos: 1.- La familia de las neurotrofinas; 2.- la familia de las citoquinas; 3.- la superfamilia del TGF- $\beta$  (del inglés, *Transforming growth factor- $\beta$* ), la cual engloba a las familias del GDNF (del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) y de las BMP (del inglés, *bone morphogenetic proteins*). Esta tesis se centrará en la familia de las neurotrofinas.

## 5.2.2.-Las neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas son la familia de factores neurotróficos mejor estudiada. Está compuesta por el NGF (del inglés, *nerve growth factor*), el BDNF (del inglés, *brain-derived neurotrophic factor*), la NT-3 y la NT-4/5 (del inglés, *neurotrophin-3* y *neurotrophin-4/5*, respectivamente). Para poder llevar a cabo sus funciones las neurotrofinas han de unirse a receptores presentes en las membranas citoplasmáticas. Todas las neurotrofinas se unen a su receptor de baja afinidad, el p75<sup>NTR</sup> (del inglés, *p75 neurotrophin receptor*) y a sus respectivos receptores de alta afinidad Trk (del inglés, *tropomyosin-related kinase*). Los receptores Trk fueron descubiertos inicialmente como producto del protooncogén Trk, una oncoproteína del carcinoma de colon humano (Martín-Zanca y col., 1986, 1989), y luego se les asoció como los receptores de alta afinidad del NGF (Hempstead y col., 1991., Kaplan y col., 1991., Klein y col., 1991). El NGF se une específicamente al TrkA, el BDNF y la NT4/5 se unen al receptor TrkB, aunque la NT4/5 se puede unir con menor afinidad al TrkA, y por último la NT-3 se une con gran afinidad con el TrkC, aunque también puede unirse al TrkA y al TrkB (figura 14). Por otra parte, la cantidad relativa de receptores Trk y p75<sup>NTR</sup> es crucial para determinar la especificidad entre neurotrofina y receptor. Así, la coexpresión de los receptores p75<sup>NTR</sup> y TrkB no modifica la activación de TrkB por BDNF, mientras que reduce significativamente su activación inducida por la NT-3 o la NT-4/5 (Bibel y col., 1999), al igual que restringe la activación del TrkA por el NGF, pero no por el NT-3 (Benedetti y col., 1993). La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk también se ve influenciada por la existencia de diferentes isoformas de receptores Trk con variaciones en sus dominios extracelulares de unión a neurotrofinas que afectan su afinidad (Barbacid, 1994). Además, existen isoformas truncadas de receptores TrkB y TrkC que carecen del dominio intracelular con actividad enzimática tirosina kinasa (Barbacid,

1994) responsable de la activación de las vías de señalización intracelular en las que las neurotrofinas están implicadas (Chao y col., 1998; Friedman y col., 1999; Sofroniew y col., 2001). Sorprendentemente, en los últimos años se ha atribuido a las isoformas truncadas de Trk funciones asociadas inicialmente a las formas completas del receptor, tal como el crecimiento dendrítico (Ichinose y Snider, 2000; Yacoubian y Lo, 2000).

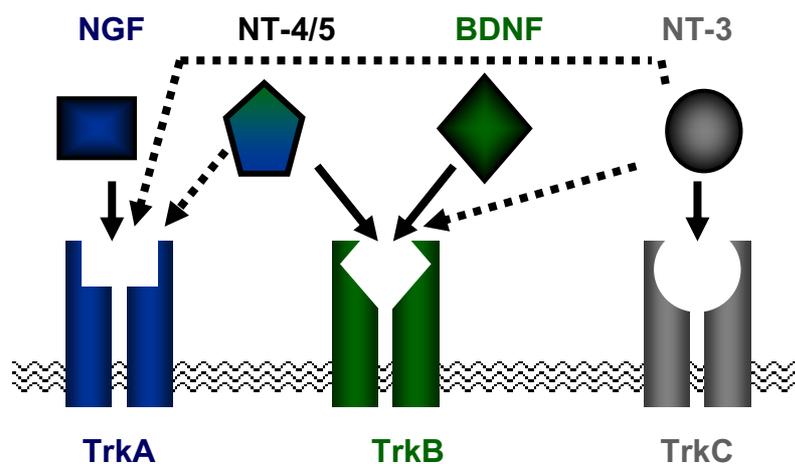


Figura 14. Las neurotrofinas y sus receptores. Las líneas continuas y discontinuas representan alta o baja afinidad, respectivamente.

Tanto las alteraciones en la expresión, el transporte y la secreción de las neurotrofinas, como los cambios en la afinidad por sus receptores y en su señalización intracelular, podrían modificar la funcionalidad o la vulnerabilidad neuronal en diferentes condiciones fisiológicas o patológicas. De hecho, existe evidencia que relaciona específicamente al BDNF y la NT-3 con la degeneración de las neuronas estriatales en la enfermedad de Huntington (Zuccato y col., 2001). Por este motivo, se resumirán a continuación algunas de las funciones de estas dos neurotrofinas en el núcleo estriado.

### **5.2.3.-El BDNF y la NT-3: Expresión y funciones en el núcleo estriado**

Las neurotrofinas actúan en ventanas temporoespaciales determinadas por los patrones de expresión de los ligandos y de sus receptores. En el núcleo estriado, las neurotrofinas son expresadas desde el desarrollo embrionario y perdura durante el resto de la vida. Sin embargo, presentan patrones de expresión diferentes. El BDNF aumenta su expresión estriatal después del nacimiento específicamente durante la tercera semana postnatal (Checa y col., 2000), aunque se ha detectado que los niveles de BDNF disminuyen casi a la mitad en ratas de edad avanzada (Kato-Semba y col., 1998). Además del núcleo estriado, el BDNF se expresa en las áreas que conectan con él. Los niveles de ARN mensajero en la corteza cerebral alcanzan su máximo nivel en el día postnatal 21 (Checa y col., 2000). En la sustancia negra, el nivel máximo de expresión se da en el séptimo día postnatal, y después del primer mes disminuye progresivamente hasta los niveles de la edad adulta (Friedman y col., 1991; Checa y col., 2000). La expresión de la NT-3 está regulada de forma diferente en el núcleo estriado y en las zonas con las que conecta. La NT-3 presenta su máxima expresión en el núcleo estriado al final del desarrollo embrionario (Maisonpierre y col., 1990) y aunque baja drásticamente su expresión después del nacimiento, mantiene constantes sus niveles durante la edad adulta, mientras que en la corteza y la sustancia negra ocurre una disminución y un aumento, respectivamente (Checa y col., 2000). En el adulto, se detecta ARN mensajero de la NT-3 en todas estas zonas (Hohn y col., 1990; Canals y col., 1998; Checa y col., 2000).

Por todo lo expuesto anteriormente, no es de extrañar que el BDNF y la NT-3 tengan propiedades tróficas sobre las neuronas estriatales. Estas neurotrofinas regulan la expresión de proteínas quelantes de  $Ca^{2+}$ , como la calbindina o la parvalbúmina, en las neuronas estriatales (Mizuno y col., 1994; Ventimiglia y col., 1995; Ivkovic y Ehrlich, 1999).

Además, el BDNF estimula la supervivencia de las neuronas estriatales *in vitro* (Ventimiglia y col., 1995), mientras que la NT-3 promueve su diferenciación incrementando el número de células GABAérgicas en cultivos estriatales (Ventimiglia y col., 1995). Sin embargo, estas dos neurotrofinas pueden tener efectos diferentes, e incluso opuestos, en la regulación del crecimiento axonal y dendrítico de las neuronas piramidales de la corteza (McAllister y col., 1997; Castellani y Bolz, 1999). Por otra parte, los ratones mutantes nulos (*knockout*) para BDNF mueren generalmente durante la primera semana postnatal, aunque pueden llegar a vivir hasta 3 semanas, período durante el cual muestran grandes alteraciones sensoriales (Jones y col., 1994; Ernfors y col., 1994a; Conover y col., 1995), mientras que no muestran alteraciones en el SNC (Ernfors y col., 1994a). Por el contrario, la deficiencia de su receptor de alta afinidad, el TrkB, parece modular la supervivencia neuronal en el SNC durante el desarrollo postnatal. Así, los ratones *knockout* para el receptor TrkB, presentan mayor proporción de muerte apoptótica en el núcleo estriado y en otras áreas del cerebro (Alcantara y col., 1997), reforzando el papel de su señalización como mecanismo prosupervivencia de las neuronas estriatales. Además, los ratones *knockout* para la NT-3 presentan alteraciones en la conducta motora (Ernfors y col., 1994b; Klein y col., 1994) relacionada principalmente con la afección de neuronas sensoriales y simpáticas (Farinas y col., 1994; Klein y col., 1994), mientras que estudios preliminares de estos modelos no han sido detectadas alteraciones de la citoarquitectura del SNC. Los requerimientos tróficos de las diferentes poblaciones neuronales están determinados por la interacción entre las neurotrofinas y sus receptores, por lo que dependen de sus patrones específicos de expresión en cada población neuronal.

En el núcleo estriado, las neurotrofinas y sus receptores poseen patrones específicos de expresión a nivel celular. Así, el receptor TrkB es el más abundante y

está principalmente localizado en las neuronas estriatales de proyección (Merlio y col., 1992), mientras que el receptor TrkC se expresa con menor intensidad que el TrkB (Merlio y col., 1992). Por el contrario, el receptor TrkA está prácticamente restringido a las interneuronas colinérgicas (Holtzman y col., 1995). Esta distribución ayuda a explicar los efectos tróficos preferenciales del BDNF y la NT-3 sobre las neuronas de proyección del núcleo estriado, y del NGF sobre las interneuronas colinérgicas (Ivkovic y col., 1997, Mizuno y col., 1994, Ventimiglia y col., 1995). La expresión de estas neurotrofinas y sus receptores puede ser regulada diferencialmente por los receptores de glutamato. Así, la expresión del NGF y del BDNF en neuronas hipocampales aumentan después de la administración de kainato *in vitro* (Zafra y col., 1990) e *in vivo* (Zafra y col., 1990; Dugich-Djordjevic y col. 1992) y por la inyección de QUIN *in vivo* (Rocamora y col., 1994). Por el contrario la expresión de la NT-3 en el hipocampo disminuye después de la administración de agonistas glutamatérgicos (Rocamora y col., 1994). En el núcleo estriado la inyección intraestriatal de QUIN incrementa la expresión del NGF (Pérez-Navarro y col., 1994; Canals y col., 1998), mientras que el kainato y el ACPD, agonista de los receptores metabotrópicos, son específicos para la regulación del BDNF y la NT-3, respectivamente (Canals y col., 1998). Por el contrario, la estimulación de los receptores AMPA produce una respuesta amplia incrementando la expresión tanto del BDNF como del NGF y disminuyendo la de la NT-3 (Canals y col., 1998). Por su parte, la expresión de los receptores Trk puede ser regulada de forma independiente a la de sus ligandos. Así pues, la expresión del TrkB es aumentada por la activación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato (Canals y col., 1999). El TrkA es incrementado tras la inyección de kainato y ACPD, pero es disminuido por la inyección de QUIN (Canals y col., 1999). Por el contrario, el receptor TrkC no es modulado por ninguno de estos agonistas (Canals y col., 1999). Por otra parte, se ha observado una regulación transneuronal de la expresión del BDNF en la corteza

cerebral tras una lesión excitotóxica. Se ha descrito que una lesión excitotóxica del núcleo estriado inducida por QUIN o kainato produce una respuesta endógena de las neuronas corticales incrementando la expresión del BDNF (Canals y col., 2001). De forma similar, se ha descrito que una lesión excitotóxica del núcleo estriado induce un aumento en la expresión del BDNF en la parte compacta de la sustancia negra (Canudas y col., 2005; Rite y col., 2005). Se ha sugerido que el aumento en la expresión de BDNF en las dianas del núcleo estriado lesionado representa un mecanismo autocrino/paracrino de protección neuronal frente a la disminución del soporte trófico retrógrado por parte del núcleo estriado (Canals y col., 2001; Canudas y col., 2005). Pero también pudiera corresponder a un mecanismo compensatorio de soporte trófico anterógrado de la corteza y la sustancia negra hacia el núcleo estriado, ya que se ha descrito que el BDNF puede ser transportado mediante un mecanismo anterógrado al núcleo estriado (Altar y col., 1997). Por todo lo descrito anteriormente la modulación de la expresión de las neurotrofinas y sus receptores representa un mecanismo neuroprotector endógeno del núcleo estriado contra estímulos excitotóxicos.

### **5.2.4.-Las neurotrofinas en modelos de la enfermedad de Huntington**

Las neurotrofinas previenen la atrofia y/o la muerte de neuronas estriatales inducida por la inyección intraestriatal de QUIN (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1996; Alexi y col., 1997; Araujo y Hilt, 1997; Bemelmans y col., 1999; Pérez-Navarro y col., 1999; 2000; Kells y col., 2004) o de kainato (Gratacos y col., 2001), modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington. En otro modelo de esta enfermedad, como la lesión inducida por la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico, el BDNF también protege las neuronas estriatales de proyección, así como también mejora el daño motor inducido por esta toxina (Ryu y col., 2004). Sin embargo, las neurotrofinas difieren en

cuanto a la intensidad y tipo de protección contra las lesiones excitotóxicas. De todas las neurotrofinas, el BDNF es la neurotrofina más potente para evitar la muerte de las neuronas estriatales de proyección después de la inyección de QUIN (Perez-Navarro y col., 2000; Gratacos y col., 2001), mientras que la NT-3 es la más efectiva para prevenir la disminución de la expresión de neuropéptidos estriatales inducidos por el QUIN (Pérez-Navarro y col., 1999). La evidencia que vincula las neurotrofinas con la enfermedad de Huntington no está restringida a modelos excitotóxicos.

Recientemente se ha demostrado que la htt está implicada en la regulación de la expresión del BDNF, ya que se detectaron niveles reducidos de esta neurotrofina en la corteza cerebral de pacientes con enfermedad de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col. 2001). Este hallazgo se confirmó en algunos modelos transgénicos de la enfermedad como el YAC72 (Zuccato y col. 2001; 2003), N171-82Q (Duan y col., 2003); R6/2 (Zhang y col., 2003) y knock-in (Gines y col., 2003b; Zuccato y col., 2001). Por una parte, la sobreexpresión de la htt normal incrementa los niveles de proteína de BDNF *in vitro* e *in vivo* mientras que, la expresión de la htt mutada modula negativamente la expresión de BDNF (Zuccato y col., 2001). Así, tanto cultivos neuronales estriatales como tejido estriatal procedentes de ratones que expresan la htt mutada expresan menos BDNF que sus respectivos controles (Zuccato y col., 2001). De igual manera, este efecto se encontró *in vivo* en otras zonas del cerebro como la corteza cerebral y el hipocampo en uno de estos modelos, el YAC72 (Zuccato y col., 2001). Aunque ambas proteínas, la htt normal y la mutada ejercen su efecto a través de un mecanismo transcripcional, la htt normal incrementa la expresión sólo del exón 2 del BDNF mientras que, la htt mutada disminuye la expresión de los exones 2, 3 y 4 (Zuccato y col., 2001, 2005). Estos datos sugieren que la htt mutada y la htt normal podrían actuar a través de diferentes mecanismos transcripcionales. Recientemente se ha postulado un mecanismo mediante

el cual la htt mutada podría modular la expresión del BDNF (Zuccato y col., 2003). La htt normal se une y secuestra en el citoplasma un regulador negativo de la transcripción génica llamado NRSF (del inglés, *neuron restrictive silencer factor*) lo que impide que el NRSF entre al núcleo, donde se uniría al promotor del gen del BDNF reprimiendo su transcripción. Se ha postulado que el secuestro de la htt normal por la htt mutada resultaría en un incremento en los niveles del NRSF libre, lo que aumentaría la translocación del NRSF hacia al núcleo y por último disminuiría la expresión del BDNF. Además, se ha demostrado que la htt participa en la vía secretora del BDNF (Gauthier y col., 2004), por lo que la mutación de la htt podría producir una alteración en esta vía. Así, se ha demostrado que el tráfico en el aparato de Golgi (Del Toro y col., 2006) y el transporte vesicular del BDNF (Gauthier y col., 2004; Charrin y col., 2005; Borrell-Pages y col., 2006; Del Toro y col., 2006) están alterados en modelos celulares la enfermedad de Huntington. Por otra parte, se ha demostrado recientemente que existen otros factores implicados en el fallo del soporte trófico neuronal en la enfermedad de Huntington. La expresión del receptor TrkB, pero no la de TRC, también está disminuida en el núcleo estriado de pacientes con enfermedad de Huntington y en varios modelos transgénicos de esta enfermedad (Gines y col., 2006), lo que sugiere que en la enfermedad de Huntington está alterada la señalización a través del receptor TrkB. Vale la pena resaltar que tanto en muestras procedentes de pacientes con enfermedad de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001) como de algunos modelos transgénicos de esta enfermedad (Zuccato y col., 2001; Zhang y col., 2003; Duan y col., 2003) se han descrito niveles disminuidos del BDNF y /o de la NT-3, mientras que no se han detectado alteraciones en la expresión de otros factores neurotróficos como el NGF, la NT-4/5 o el CNTF (Zuccato y col., 2001). De esta manera, la disminución del soporte trófico de las neuronas estriatales de proyección mediado por el BDNF y/o la

NT-3 podría estar implicada en los mecanismos que determinan la degeneración selectiva de estas neuronas en la enfermedad de Huntington.

