



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**

## DISCUSIÓN



En esta tesis se han estudiado algunos de los mecanismos que podrían modular la susceptibilidad de las neuronas estriatales en modelos murinos de la enfermedad de Huntington. Específicamente, nuestros trabajos han ayudado a comprender el papel de las neurotrofinas BDNF y NT-3 en la susceptibilidad de las neuronas estriatales al estrés excitotóxico y a la expresión de la htt mutada. Además, hemos estudiado la implicación de los cuerpos de inclusión intraneuronales en la patología y los factores que podrían modular sus efectos sobre las neuronas estriatales. Por último, hemos obtenido datos que confirman la efectividad de dos aproximaciones terapéuticas potenciales para la enfermedad de Huntington.

### **1.-Implicación de las neurotrofinas en la neurodegeneración estriatal en modelos murinos de la enfermedad de Huntington.**

Se ha demostrado que el núcleo estriado (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001) y la corteza cerebral (Zuccato y col, 2001) de pacientes con enfermedad de Huntington tienen niveles reducidos del BDNF y/o la NT-3. Sin embargo, no había sido demostrado si la disminución de los niveles endógenos de estas neurotrofinas formaba parte de la cascada fisiopatológica de la enfermedad y, por lo tanto, si modulaban la susceptibilidad de las neuronas estriatales en la enfermedad de Huntington. Nuestros resultados demuestran en conjunto (trabajos 1 y 2) que los niveles endógenos del BDNF y la NT-3 regulan diferencialmente la susceptibilidad de las neuronas estriatales en dos paradigmas de la enfermedad de Huntington, el transgénico (ratones que expresan la htt mutada) y el excitotóxico (inducido por la inyección intraestriatal de QUIN).

Nuestros resultados demuestran que los niveles del BDNF en los ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington dependen del número de repeticiones

CAG y de los niveles de expresión de la htt mutada (trabajo 1). En este sentido, en un modelo *in vitro* demostramos que la expresión del BDNF es inversamente proporcional al número de repeticiones CAG y al nivel de expresión de la htt mutada. Estos resultados ayudan a explicar las diferencias que presentan los ratones R6/1 y R6/2 en cuanto a la expresión de BDNF: Los ratones R6/1 (con niveles normales del BDNF, trabajo 1) expresan una sola copia del gen mutado con 115 repeticiones CAG, mientras que los R6/2 (con niveles reducidos del BDNF; Zhang y col., 2003) expresan tres copias del la htt mutada con más de 150 repeticiones CAG (Mangiarini y col., 1996). De la misma manera, el nivel de expresión de la htt mutada explica las diferencias en la expresión del BDNF observadas entre las células knock-in con uno o dos alelos mutados de la htt (Zuccato y col., 2001). Por otra parte, se ha descrito que la htt normal regula positivamente la expresión del BDNF (Zuccato y col., 2001). Así, la disminución progresiva de los niveles de htt normal se correlaciona con la disminución de los niveles del BDNF en los ratones transgénicos R6/2 (Zhang y col., 2003). De acuerdo con dichos datos, demostramos que en los ratones R6/1 los niveles de la htt normal no disminuyen, lo que correlaciona con los niveles normales del BDNF encontrados en estos ratones. Estos datos ayudan a explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en el grado de afectación entre diferentes modelos transgénicos. Así, aquellos modelos que muestran disminución del BDNF, como el R6/2 (Zhang y col., 2003), el YAC (Zuccato y col., 2001), y el bDM (trabajo 2) presentan pérdida de neuronas estriatales, mientras que otro modelo con niveles normales del BDNF como el R6/1 (trabajo 1) no sufre muerte neuronal estriatal (Mangiarini y col., 1996; trabajo 1).

Los resultados en los modelos bDM demuestran claramente que el BDNF modula la edad de inicio y la severidad de los síntomas motores en un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington (trabajo 1). Este efecto se correlaciona con

la pérdida de neuronas estriatales de proyección y la disminución de la expresión estriatal de ENK, lo que confirma la relevancia de la disminución del soporte trófico en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington. Así, es posible que la disminución de los niveles endógenos del BDNF inducida por la htt mutada sea uno de los mecanismos que determinen la degeneración específica de las neuronas estriato-palidales, ya que estas neuronas están más afectadas en los ratones bDM que en los R6/1. Estos datos demuestran que las neuronas estriato-palidales son más sensibles que las estriato-nigrales a los niveles reducidos del BDNF. En este sentido, en ratones transgénicos R6/1 y bDM sólo las neuronas estriato-palidales responden tanto al tratamiento neuroprotector basado en la administración de BDNF exógeno (trabajo 1), como a un tratamiento farmacológico que aumenta los niveles endógenos de BDNF (Borrell-Pages y col., 2006). Nuestros resultados se apoyan en estudios previos hechos en nuestro laboratorio y en otros en los que se demuestra que el BDNF protege las neuronas estriatales de la excitotoxicidad (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1996; Perez-Navarro y col., 1999, 2000). Cabe destacar que la disminución de los niveles del BDNF *per se* no causa la degeneración de las neuronas estriatales, ya que los ratones BDNF+/- no muestran signos de neurodegeneración estriatal (trabajos 1 y 3) tal como había sido descrito previamente (Jones y col., 1994; Ivkovic y col., 1997). Esto demuestra que el efecto de la disminución de los niveles endógenos de BDNF es debido a una potenciación de la toxicidad de la htt mutada. Además, el BDNF mostró tener un efecto muy específico, ya que el análisis histopatológico de los ratones n3DM demostró que la disminución de la NT-3 endógena no incrementa la muerte neuronal inducida por la htt mutada (trabajo 1). Sin embargo, ya que los ratones NT-3+/- adultos presentan una sobreexpresión de las subunidades NR1 y NR2A de receptores de glutamato (trabajo 2), parece intrigante el hecho de que los niveles reducidos de NT-3 no incrementen la muerte neuronal inducida por la htt mutada, dado que la excitotoxicidad mediada por

los receptores NMDA es uno de los mecanismos implicados en la neurodegeneración estriatal en la enfermedad de Huntington. Una posible explicación para este hecho, es que la htt mutada potencia la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA dependiendo de su composición. La htt mutada incrementa la corriente de los receptores NMDA compuestos por las subunidades NR1/NR2B, pero no por NR1/NR2A (Chen y col., 1999; Zeron y col., 2002, Li y col., 2003b, 2004), ayudando a explicar porque la sobreexpresión de NR2A en los ratones NT-3+/- no potencia la toxicidad de la htt mutada.

Sin embargo, el efecto de las neurotrofinas puede variar dependiendo del tipo de lesión. En otro modelo de la enfermedad de Huntington basado en la inducción de lesiones excitotóxicas en el núcleo estriado, aquellos ratones que expresan niveles reducidos de la NT-3 presentaron mayor susceptibilidad estriatal a la lesión inducida por QUIN (trabajo 2), mientras que aquellos con niveles reducidos del BDNF no presentaron cambios en su susceptibilidad excitotóxica. De esta manera, demostramos que el BDNF y la NT-3 endógenos modulan diferencialmente la excitotoxicidad de las neuronas estriatales dependiendo del estímulo nocivo al cual se somete la neurona diana: La disminución de los niveles endógenos de la NT-3, pero no los de BDNF, aumenta la susceptibilidad estriatal a la excitotoxicidad inducida por QUIN (trabajo 2), mientras que la disminución de los niveles endógenos de BDNF, pero no los de NT-3, aumenta la neurodegeneración estriatal inducida por la htt mutada (trabajo 1). Además, en nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que la administración exógena de BDNF previene la disminución de la expresión estriatal de PPE y PPTA inducidos por la inyección de QUIN (Perez-Navarro y col., 1999), mientras que recupera selectivamente la expresión estriatal de PPE, pero no de PPTA, en los modelos transgénico R6/1 y bDM (trabajo 1). Estos datos refuerzan la idea de que el efecto

protector de las neurotrofinas podría estar modulado por el tipo o la naturaleza de la lesión. En este sentido, cabe destacar que diferentes estímulos excitotóxicos (mediado por receptores para glutamato tipo NMDA, AMPA, Kainato o metabotrópicos) son capaces de modular diferencialmente la expresión de las neurotrofinas (Canals y col., 1998) y de sus receptores de alta afinidad (Canals y col., 1999). Por otra parte, la disminución de los niveles de NT-3 aumenta la vulnerabilidad excitotóxica tanto de las neuronas de proyección estriato-palidales y estriato-nigrales (trabajo 2), mientras que la disminución de los niveles de BDNF potencia el efecto tóxico de la htt mutada selectivamente sobre las neuronas estriato-palidales (trabajo 1). Las diferencias encontradas entre los efectos del BDNF y la NT-3 endógenos se apoyan en datos que demuestran que estas neurotrofinas tienen efectos tróficos completamente diferentes sobre la diferenciación de las neuronas corticales (McAllister et al., 1997), así como por el hecho de que presentan patrones de expresión temporo-espaciales muy distintos después de una lesión estriatal con agonistas de los receptores de glutamato (Canals y col., 1998, 1999; Checa y col., 2000, 2001). Además, se ha demostrado que la susceptibilidad excitotóxica de las neuronas estriatales es modulada diferencialmente por el BDNF o la NT-3 exógenos: BDNF tiene mayor efecto sobre la supervivencia de las neuronas estriatales (Perez-Navarro y col., 2000), mientras que la NT-3 es más potente que el BDNF evitando la atrofia neuronal inducida por una lesión excitotóxica (Perez-Navarro y col., 1999).

Nuestros resultados sugieren que el BDNF y la NT-3 actúan a través de mecanismos diferentes al modular la neurodegeneración estriatal en modelos murinos de la enfermedad de Huntington. La NT-3 endógena, pero no el BDNF endógeno, es capaz de modular la expresión estriatal de los receptores NMDA (trabajo 2). Así, los ratones NT-3<sup>+/-</sup> adultos tienen niveles elevados selectivamente de las subunidades

NR1 y NR2A en el núcleo estriado, mientras que la expresión de la subunidad NR2B no se ve afectada por los niveles reducidos de NT-3. El aumento en la expresión de los receptores NMDA en los ratones NT-3+/- se correlaciona con la mayor susceptibilidad estriatal a la lesión inducida por QUIN. Vale la pena resaltar que la administración de NT-3, mediante una línea celular que sobre-expresa esta neurotrofina, redujo selectivamente la expresión de NR2A (trabajo 2), hecho que se correlaciona con la disminución de la susceptibilidad estriatal a la lesión inducida por QUIN (Perez-Navarro y col., 1999, 2000). Por otra parte, la disminución de los niveles endógenos de BDNF no modifica ni la expresión de los receptores NMDA (trabajo 2) ni la excitotoxicidad estriatal inducida por QUIN (trabajos 2 y 3). Estos datos se correlacionan con estudios en los que se demuestra que el grado de susceptibilidad neuronal a los daños excitotóxicos está determinado, al menos en parte, por la composición y/o el grado de expresión de receptores de glutamato (Kovacs y col., 2001). Asimismo, se ha demostrado que la susceptibilidad estriatal a la excitotoxicidad durante el desarrollo (McDonald y col., 1988; Figueredo-Cardenas y col., 1997) se correlaciona con cambios en la respuesta de los receptores NMDA (Cepeda y col., 1996) y con cambios en la expresión de los receptores NMDA dependientes de la edad (Magnusson y Cotman, 1993; Villares y Stavale, 2001). Cabe destacar que estas neurotrofinas podrían ejercer sus efectos neuroprotectores a través de otros mecanismos, como la estabilización de la homeostasis del calcio intracelular (Cheng y Mattson, 1994), la activación de vías intracelulares prosupervivencia (Gavalda y col., 2004) o la regulación de la expresión de proteínas pro y/o antiapoptóticas (Garcia-Martinez y col., 2007).

Sorprendentemente, encontramos que el efecto de la NT-3 sobre la expresión de los receptores NMDA muestra un patrón bifásico dependiente de la edad. Así, los ratones con niveles reducidos de la NT-3 expresan menos subunidades NR1 y NR2A

en el núcleo estriado durante los primeros días postnatales, mientras que expresan niveles aumentados de estas subunidades a partir de las 12 semanas de edad (trabajo 2). Así, la propiedad de la NT-3 para modular la expresión selectiva de NR2A en el núcleo estriado tiene una relevancia potencial en la fisiología de las neuronas estriatales y, en general, en la integración funcional de las aferencias excitadoras del núcleo estriado. Es bien conocido que a partir de fases muy tempranas del desarrollo post-natal la proporción de la expresión NR2A/NR2B aumenta progresivamente (Scheetz y Constantine-Paton y col., 1994). Por este motivo se ha postulado que los receptores NR1-NR2B están involucrados en las primeras fases de la sinaptogénesis glutamatérgica, mientras que los receptores NR1-NR2A participarían en la consolidación y mantenimiento de la neurotransmisión en las sinapsis maduras (Van Zundert y col., 2004). De esta manera, la NT-3 podría estar implicada en la modulación de la funcionalidad de las sinapsis glutamatérgicas durante las fases tempranas del desarrollo postnatal modulando la expresión de NR2A y por ende, el balance entre NR2A/NR2B. Por otra parte, la NT-3 podría modular la viabilidad de las neuronas estriatales durante la edad adulta. Debido a que las neuronas estriatales reciben gran cantidad de aferencias glutamatérgicas, es posible que el desequilibrio de la expresión de los receptores NMDA en los ratones NT-3+/- tenga efectos deletéreos a largo plazo sobre la supervivencia de estas neuronas. De hecho, los ratones NT-3+/-, pero no los BDNF+/-, muestran una pérdida de neuronas estriatales a las 30 semanas de edad (trabajo 1), demostrando que la NT-3 participa en el mantenimiento a largo plazo de la población neuronal estriatal en el adulto. La pérdida de neuronas estriatales en los ratones NT-3+/- no fue debida a alteraciones del neurodesarrollo, ya que la caracterización de las subpoblaciones neuronales estriatales de ratones NT-3+/- de 12 semanas de edad (trabajo 2) no mostró ninguna alteración. Estos datos se correlacionan con la falta de alteraciones estructurales en el SNC descrita inicialmente en ratones

mutantes nulos para NT-3 de pocos días de edad (Ernfors y col., 1994b). Vale la pena resaltar que la muerte prematura de los mutantes nulos para NT-3 (Ernfors y col., 1994b) no ha permitido realizar estudios de las funciones de esta neurotrofina en el desarrollo postnatal y/o en la edad adulta. Es por esto que los ratones NT-3+/- representan una buena herramienta para el estudio las funciones de la NT-3 en estas fases. De la misma manera, los ratones BDNF +/- han permitido estudiar los efectos de la disminución de los niveles endógenos de BDNF en el SNC adulto (Saylor y col., 2006), imposibles de realizar en los mutantes nulos para BDNF debido a la letalidad de la supresión de ambos alelos de este gen (Ernfors y col., 1994a).

### **2.-Implicación de los receptores NMDA y de sus proteínas de andamiaje y señalización intracelular en la neurodegeneración estriatal en la enfermedad de Huntington.**

Las disfunción y degeneración de las neuronas estriatales descritas en la enfermedad de Huntington se han atribuido, al menos en parte, a un desequilibrio en la neurotransmisión glutamatérgica de la vía corticoestriatal (Cepeda y col., 2006). En ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington se han descrito alteraciones electrofisiológicas basadas en el incremento en la actividad de los receptores NMDA de las neuronas estriatales de proyección (Cepeda y col., 2001; Tang y col., 2005). Curiosamente, se ha sugerido que estas neuronas responden al estrés inducido por la expresión de la htt mutada activando diversos mecanismos protectores con la finalidad de compensar la sobreactivación de los receptores NMDA (Jarabek y col., 2004). Algunos de estos mecanismos incluyen cambios en la expresión o fosforilación de los receptores así como también, cambios en la expresión de las proteínas que controlan su expresión y/o su señalización (Jarabek y col., 2004), aunque su relación con la severidad de la

patología no ha sido aclarada. Así, nuestros trabajos han estudiado los mecanismos que modulan la susceptibilidad estriatal a la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA en dos modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington, los R6/1 y los R6/1:BDNF+/- (bDM). Demostramos que las alteraciones en la expresión de las proteínas de andamiaje y de señalización intracelular de los receptores NMDA se relacionan con la severidad de los trastornos neurológicos en los ratones R6/1 y bDM y con su grado de resistencia al QUIN.

La alteración en la función de los receptores de glutamato podría ser la causa de algunas de las alteraciones motoras y cognitivas de la enfermedad de Huntington (Cepeda y col., 2001, 2003; Jarabek y col., 2004), ya que las alteraciones electrofisiológicas de los receptores NMDA se incrementan en la misma medida que empeora la sintomatología (Cepeda y col., 2001, 2003 Klapstein y col., 2001). Nuestros resultados demuestran que la resistencia a la lesión estriatal inducida por QUIN también es directamente proporcional al grado de severidad de la patología. Los ratones bDM, con una patología más severa que la de los R6/1, son más resistentes que estos últimos a la lesión estriatal inducida por QUIN (trabajo 3). Una relación similar entre la resistencia y la severidad ha sido descrita anteriormente cuando se estudió la susceptibilidad estriatal al QUIN en ratones R6/1 y R6/2 (Hansson y col. 2001). Estas observaciones no se limitan a ratones de las líneas R6, ya que los N171-82Q también son resistentes a la lesión estriatal inducida por QUIN (Jarabek y col., 2004). Por el contrario, los ratones transgénicos YAC72 y YAC128, los cuales muestran una menor y más lenta progresión de la patología que los modelos R6, muestran una mayor susceptibilidad estriatal a la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA (Zeron y col., 2002; Tang y col., 2005). En conjunto, estos resultados sugieren que la susceptibilidad disminuida al QUIN

podría estar relacionada con el grado de la patología. Pero, ¿por qué ocurre la resistencia estriatal al QUIN en ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington?

En el marco de la enfermedad de Huntington, la teoría excitotóxica se basa en estudios que demuestran que la htt mutada es capaz de incrementar la actividad de los receptores NMDA (Cepeda y col., 2001; Laforet y col., 2001; Levine y col., 1999, Zeron y col., 2002), produciendo un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Hansson y col., 2001; Tang y col., 2005). Es posible que frente a estas alteraciones las neuronas estriatales respondan activando cambios compensatorios o mecanismos de defensa en contra del estrés excitotóxico, tal como ha sido sugerido anteriormente (Hansson y col., 2001; Jarabek y col., 2004). Estos mecanismos pudieran estar relacionados con el condicionamiento neuronal, un mecanismo mediante el cual una sobreestimulación subtóxica de los receptores NMDA provee tolerancia al daño causado por un segundo estímulo excitotóxico de mayor magnitud (Ogita y col., 2003). Así, se ha descrito que la depresión extendida (del inglés, *spreading depression*; Wiggins y col., 2003) o el tratamiento subtóxico crónico con NMDA (Llado y col., 1999; Tarabal y col., 2005) son capaces de prevenir la muerte inducida por lesiones excitotóxicas posteriores.

Si este concepto se pudiera aplicar a la enfermedad de Huntington, ¿como podría la htt mutada inducir una estimulación subletal de los receptores NMDA en las neuronas estriatales? En este sentido, demostramos que los niveles de fosforilación de los receptores NMDA dependientes de PKC y PKA están elevados en los ratones R6/1 y bDM (trabajo 3). Debido a que la fosforilación de los receptores NMDA dependientes de PKC y de PKA aumentan las corrientes y/o el promedio de apertura de éstos (Westphal y col., 1999; Logan y col., 1999; Rosenblum y col., 1996; Rostas y col., 1996), nuestros resultados sugieren que la actividad incrementada de los receptores NMDA

(producto posiblemente de su hiperfosforilación) podría ser la causa del incremento de la actividad de los receptores NMDA, y por ende, el desencadenante de los mecanismos compensatorios. De hecho, los ratones bDM, los cuales son más resistentes que los R6/1, presentan los niveles de fosforilación de los receptores NMDA más elevados que estos últimos, por lo que, el grado de sobreactivación de los receptores NMDA inducido por la htt mutada podría modular la intensidad de los mecanismos compensatorios, y como consecuencia, del condicionamiento y/o resistencia. La caracterización de la electrofisiología de las neuronas estriatales de los ratones R6/2 y YAC72 apoya esta hipótesis. Ambos modelos muestran una sobreactivación de los receptores NMDA y una mayor excitabilidad de las neuronas estriatales, sin embargo, estas alteraciones son más intensas en los R6/2 que en los YAC72 (Cepeda y col., 2001). Estas diferencias ayudarían a explicar por qué los ratones R6/2 desarrollan resistencia al QUIN, mientras que los YAC72 no. Vale la pena resaltar que se ha sugerido anteriormente (Jarabek y col., 2004) que debido a la lenta progresión de la patología en los YAC72 pudiera ser necesario esperar hasta etapas muy avanzadas de la enfermedad para que la resistencia al QUIN se hiciera evidente, ya que los estudios de la susceptibilidad estriatal al QUIN en este modelo se han realizado en fases tempranas de la enfermedad (Zeron y col., 2002). En este sentido, el máximo nivel de resistencia estriatal al QUIN en ratones transgénicos se correlaciona con la edad a la que comienza la etapa sintomática en los ratones R6/1 y R6/2 (Hansson y col., 2001, trabajo 1) y en los bDM (trabajos 1 y 3). La susceptibilidad excitotóxica de las neuronas estriatales en los ratones YAC podría depender de otro factor además del grado de la patología, tal como la intensidad del estímulo excitotóxico. Así, un reciente estudio *in vitro* (Leavitt y col., 2006) describió que las neuronas estriatales de estos ratones mostraron ser resistente a la lesión inducida por NMDA a bajas dosis (100 $\mu$ M), mientras que fueron más sensible que las controles a dosis altas del agonista NMDA (500 $\mu$ M), demostrando

que la resistencia de las neuronas estriatales a la excitotóxica no está restringida a modelos transgénicos que expresan el exón 1 de la htt mutada.

En nuestros trabajos demostramos que los ratones bDM de 30 semanas de edad presentan niveles reducidos NR2B sin alteración del resto de subunidades de los receptores NMDA (trabajo 3). Estos resultados sugieren una degeneración más acentuada de las neuronas que expresan esta subunidad, lo cual se correlaciona con la pérdida de neuronas estriatales de proyección descrita en los bDM a esa edad (trabajo 1). De la misma manera, los niveles de las subunidades NR2 están reducidos en muestras post-mortem de enfermos de Huntington (Dure y col., 1991), apoyando la teoría de que las neuronas estriatales que expresan receptores NMDA compuestos por estas subunidades son las más vulnerables en la enfermedad de Huntington (Young y col., 1988; Albin y Gilman 1990). En este mismo sentido, se ha demostrado que la subunidad NR2B está más implicada en el proceso inicial de la degeneración de las neuronas estriatales en el modelo transgénico YAC72 (Li y col., 2004) y en modelos celulares (Chen y col., 1999; Zeron y col., 2001). Además, demostramos que la disminución de los niveles de NR2B no se correlaciona con la resistencia estriatal al QUIN, ya que a las 12 semanas de edad, justo cuando manifiestan la resistencia al QUIN, los niveles totales y sinápticos de NR2B son normales en los R6/1 y bDM. Esta observación se apoya en los niveles normales de receptores NMDA encontrados en otro modelos transgénico con resistencia estriatal al QUIN (Jarabek y col., 2004; Hansson y col., 2001). Por el contrario, los niveles totales de MAGUKS, proteínas responsables del andamiaje sináptico de estos receptores, si están reducidos en los ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington al momento de expresar resistencia al QUIN. La mayor resistencia al QUIN observada en los bDM a las 12 semanas de edad se correlaciona con una reducción selectiva y más acentuada en los niveles estriatales de las MAGUK. Así, los ratones R6/1 tienen niveles reducidos de la PSD-95 y la SAP-97, mientras que

los ratones bDM presentan una disminución específica en los niveles de la SAP-102 y la PSD-93, además de la disminución en los niveles de la PSD-95 y la SAP-97. De manera similar, los ratones N171-82Q (Jarabek y col., 2004) y los R6/2 (Luthi-Carter y col., 2002b) también presentan niveles reducidos de MAGUKS en el núcleo estriado y muestran resistencia estriatal al QUIN (Hansson y col., 1999, 2001; Jarabek y col., 2004). Sin embargo, el mecanismo responsable de la disminución de los niveles de las MAGUKS activado por la htt mutada no ha sido aclarado. La menor expresión de las MAGUKS podría ser consecuencia de la sobreactivación de los receptores NMDA producto del incremento de su hiperfosforilación en los R6/1 y bDM. En este sentido, la sobreactivación de los receptores NMDA induce la disociación del complejo NMDAR:PSD-95 conllevando a la degradación de la PSD-95 por el sistema ubiquitina-proteosoma (Colledge y col., 2003). También se ha sugerido que la disminución de la PSD-95 observada en los ratones R6/2 pudiera ser producto de las alteraciones transcripcionales inducidas por la htt mutada (Luthi-Carter y col., 2002b).

Nuestros resultados sugieren que las MAGUKS podrían ser muy determinantes en la vulnerabilidad selectiva de las neuronas estriatales a lesiones mediadas por los receptores NMDA. Es bien conocido que las MAGUKS interactúan con las subunidades NR2 de los receptores NMDA desde su síntesis en el retículo endoplasmático (Sans y col., 2001, 2003, 2005; Van Zundert y col., 2004). En este sentido, llama la atención que los niveles sinápticos de receptores NMDA permanezcan normales a pesar de los niveles reducidos de MAGUKS, sobre todo en los ratones bDM, los cuales tienen niveles reducidos de la SAP-102 (trabajo 3). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de la SAP-102 no altera la expresión sináptica de receptores NMDA en este modelo. Múltiples observaciones apoyan estos resultados. Cuando el tráfico de receptores NMDA dependiente de SAP-102 está

alterado, las subunidades NR2 son retenidas en las endomembranas (Sans y col., 2005), sin embargo los niveles de NR2B en la fracción de membranas ligeras (endomembranas) de los ratones R6/1 y bDM son normales (trabajo 3). Las diferencias entre nuestros resultados y los de Sans y colaboradores podrían ser explicadas por las condiciones experimentales empleadas. Nosotros encontramos una disminución no mayor del 30% en los niveles de la SAP-102 (totales y citosólicos) mientras que Sans y colaboradores emplearon un sistema de sobreexpresión (Sans y col., 2005). El significado fisiológico de las observaciones basadas en la sobreexpresión en un sistema heterólogo no ha sido aclarado. Por otra parte, el silenciamiento de la SAP-102 mediante ARNi no altera las corrientes sinápticas dependientes de los receptores NMDA, pero el mismo ARNi contra la SAP-102 reduce las corrientes postsinápticas excitatorias de los receptores NMDA sólo cuando ocurre la falta total de la PSD-95 y la PSD-93 (Elias y col., 2006). En conjunto estos resultados sugieren que la expresión sináptica de los receptores NMDA es afectada sólo cuando los niveles de MAGUKS caen por debajo de un umbral determinado, tal y como ha sido sugerido por otros (Elias y col., 2006). Sin embargo, es posible que la cinética del tráfico y /o la expresión sináptica de los receptores NMDA dependientes de las MAGUKS puedan estar alteradas en fases más avanzadas de la enfermedad, en las cuales hemos detectado niveles más reducidos de la SAP-102, la PSD-95 y la PSD-93 en los bDM, tal como ocurre en las muestras procedentes de pacientes con enfermedad de Huntington (trabajo 3).

Ha sido demostrado que la disminución de los niveles de una MAGUK puede conducir a cambios compensatorios en la expresión de las otras (Kim and Sheng, 2004). Pero ¿estos cambios compensatorios ocurren en la enfermedad de Huntington? Nuestros resultados indican que los ratones R6/1 de 12 semanas de edad sufren cambios en la composición de las proteínas de andamiaje de la membrana

postsináptica, ya que detectamos que la expresión sináptica de las MAGUKS está alterada en los R6/1 y bDM. Así, los niveles sinápticos de la PSD-95 están reducidos, y los de la PSD-93 están incrementados, mientras que los niveles citosólicos de la PSD-93 disminuyen, sugiriendo que la PSD-93 transloca desde el citosol hasta la membrana postsináptica para compensar la disminución de la PSD-95. Se puede esperar una compensación funcional de las MAGUKS debido a su redundancia estructural. De hecho, se han encontrado cambios compensatorios de la SAP-102 en ratones que expresan la PSD-95 mutada (Vickers y col., 2006) o que tienen un carencia conjunta de la PSD-95 y la PSD-93 (Elias y col., 2006). El mecanismo que controla la translocación de la PSD-93 hacia las membranas postsinápticas no ha sido estudiado. Es posible que la falta de la PSD-95 le permita a la PSD-93 unirse a los sitios desocupados por ésta. Esta idea se apoya en el hecho de que los niveles sinápticos de los receptores NMDA (sitios de unión de la PSD-93 y la PSD-95) se mantienen normales en los ratones R6/1 y bDM (trabajo 3). Sin embargo, hay datos que sugieren que la unión de la PSD-93 y la PSD-95 a los receptores NMDA pudiera no seguir un patrón pasivo/competitivo, ya que la falta de la PSD-93 no incrementa la unión de la PSD-95 a la subunidad NR2B (Jiang y col., 2003). Todos estos resultados sugieren que un mecanismo activo podría estar involucrado en la redistribución selectiva de la PSD-93. Se ha demostrado que el anclaje de la PSD-93 a las membranas (Nada y col., 2003) y la expresión sináptica de la PSD-95 (Firestein y col., 2000; El Husseini y col., 2000b) dependen de la palmitoilación de sus respectivos extremos N-terminales. No obstante, no se ha determinado si la excitotoxicidad y/o la htt mutada podrían modular la distribución sináptica de las MAGUKS dependiente de la palmitoilación.

De acuerdo con los cambios compensatorios de las MAGUKS a nivel sináptico, encontramos que los niveles de la nNOS en la fracción de membranas postsinápticas,

los cuales dependen de la interacción con el complejo receptor NMDA-MAGUKS (Brenman y col., 1996a), no están alterados en los ratones R6/1 y bDM. Este resultado se correlaciona con los niveles normales de fosforilación de la kinasa p38, lo sugieren que la señalización de la nNOS no está alterada en los ratones R6/1 ni en los bDM. Aunque se ha demostrado que la alteración de la señalización de la nNOS disminuye la susceptibilidad a la lesión excitotóxica en modelos *in vivo* (Hou y col., 2005) e *in vitro* (Sattler y col., 1999; Cao y col., 2005), ni los niveles sinápticos de la nNOS ni los de la kinasa p38 fosforilada en nuestro modelo se correlacionan con las diferencias en la susceptibilidad de las neuronas estriatales a una lesión mediada por los receptores NMDA. Estos resultados sugirieron que otras vías de señalización pudieran estar relacionadas con la resistencia al QUIN observada en los ratones R6/1 y DM. En este sentido, las alteraciones en la composición de la densidad postsináptica inducidas por la htt mutada no están restringidas a la MAGUKS, ya que en los bDM encontramos niveles sinápticos reducidos de  $\alpha$ CaMKII, uno de los principales componentes de las densidades postsinápticas (Chen y col., 2005). Los niveles reducidos de  $\alpha$ CaMKII en las membranas sinápticas de los bDM podría explicar la mayor resistencia a la lesión inducida por QUIN encontrada en este modelo. Así, ha sido ampliamente demostrado que la  $\alpha$ CaMKII juega un papel esencial en procesos de plasticidad sináptica (Colbran y Brown, 2004), así como también en procesos excitotóxicos (Hajimohammadreza y col., 1995). Durante la isquemia cerebral (Yan y col., 2004) y el daño cerebral traumático (Atkins y col., 2006) ocurre un aumento de la fosforilación de la  $\alpha$ CaMKII y un aumento de la cantidad de la  $\alpha$ CaMKII en la densidad postsináptica (Dosemeci y col., 2001; Chen y col., 2005). Además, el tratamiento previo con inhibidores específicos de la  $\alpha$ CaMKII protege contra la excitotoxicidad inducida por NMDA y la hipoxia-hipoglicemia (Hajimohammadreza y col., 1995). Investigaciones recientes han revelado el mecanismo mediante el cual la  $\alpha$ CaMKII está involucrada en la señalización neurotóxica de los

receptores NMDA. La fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B mediadas por CaMKII disminuyen la desensibilización de los receptores NMDA (Gardoni y col., 1999). Además, la activación de la  $\alpha$ CaMKII potencia la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores AMPA (Gardoni y col., 2002) y activa la SynGAP (Oh y col., 2004), un modulador negativo de la vía RAS, lo que a su vez regularía negativamente la señalización de la vía RAS-ERK (Oh y col., 2004), una vía de señalización prosupervivencia ampliamente conocida (Gavalda y col., 2004). Así, se ha descrito que la isquemia cerebral aumenta la fosforilación de la SynGAP mediado por la  $\alpha$ CaMKII (Song y col., 2004). De esta manera, es posible que durante la lesión inducida por QUIN en los ratones bDM estén disminuidas tanto la potenciación de los receptores NMDA y AMPA mediada por la  $\alpha$ CaMKII, como la inhibición de la señalización vía RAS-ERK mediada por SynGAP (Oh y col., 2004; figura 15).

Otra posibilidad es que algunos de los cambios en la expresión de las MAGUKS descritos en nuestros trabajos pudieran estar alterando las funciones de los receptores NMDA o el resto de funciones dependiente de las MAGUKS. En este sentido, se han descrito alteraciones en la función de los receptores NMDA y en la expresión de MAGUKS tanto en esquizofrenia (Mohn y col., 1999) como en depresión (Kristiansen y Meador-Woodruff, 2005; Toro y Deakin, 2005), y precisamente en pacientes con enfermedad de Huntington ocurren manifestaciones psiquiátricas de este tipo (Lovestone y col., 1996; Hanes y col., 1996). Además, se han descrito alteraciones en la expresión y en la localización subcelular de PSD-95 (Nash y col. 2005) y de SAP-102 (Gardoni y col., 2006) en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, las cuales correlacionan con las algunas alteraciones del comportamiento motor descritas en este modelo. Así, estos resultados en conjunto pudieran ayudar a esclarecer el papel potencial de las MAGUKS en fisiopatología de estas enfermedades neurológicas.

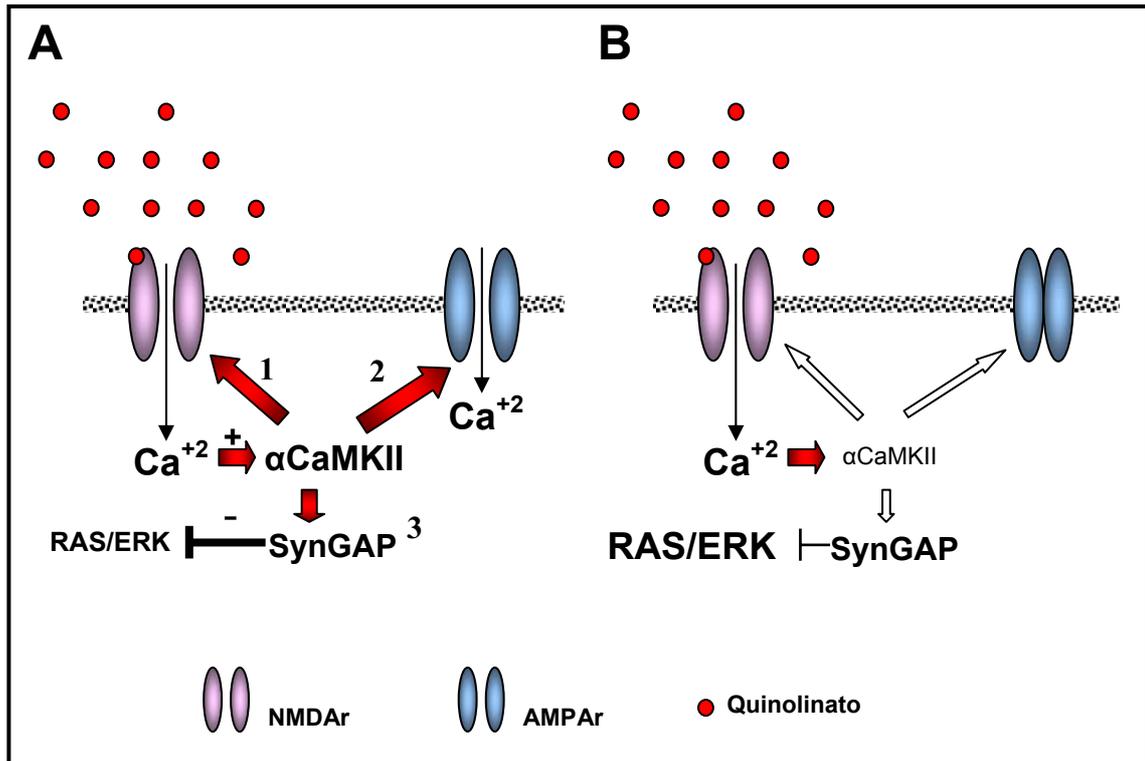


Figura 15. Papel de la  $\alpha$ CaMK II en la excitotoxicidad inducida por QUIN. (A) La entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores NMDA inducida por el QUIN activa la  $\alpha$ CaMK II, la cual puede activar tres mecanismos neurotóxicos: 1.- Potenciar los receptores NMDA (NMDAr); 2.-Potenciar los receptores AMPA (AMPA) incrementando la entrada de  $Ca^{2+}$  y 3.- Activar SynGAP, un regulador negativo de la vía RAS/ERK, disminuyendo la activación de esta vía. (B) Hipótesis propuesta para el posible papel de la disminución de  $\alpha$ CaMK II en la resistencia a la lesión inducida por QUIN encontrada en los bDM: La disminución de los niveles sinápticos de  $\alpha$ CaMK II disminuiría la potencia de los receptores NMDA y AMPA además de atenuar la inhibición de la vía RAS/ERK mediante la menor estimulación de SynGAP. La disminución de los niveles reducidos de  $\alpha$ CaMK II en (B) se representa con letras pequeñas. Las vías activadas se representan con flechas rojas, mientras que las menos activadas con flechas blancas.

### 3.-Papel de los agregados intraneuronales de htt en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington

En la enfermedad de Huntington y algunas ataxias espino-cerebelosas, todas causadas por expansiones de tripletes CAG, se han descrito cuerpos de inclusión intraneuronales (Michalik y Van Broeckhoven, 2003). Ha llamado enormemente la atención de los investigadores que tanto la manifestación de la patología en humanos

como la formación de los agregados de la proteína mutada tengan una fuerte correlación con la longitud del segmento de poliglutaminas (Vonsattel y col., 1985; Myers y col., 1988; Becher y col., 1998; Li y Li, 1998). Por ello, se ha sugerido que la agregación podría estar relacionado con la patogénesis y ser, al menos en parte, la responsable del proceso neurodegenerativo. Sin embargo, diversas líneas de investigación arrojan datos muy contradictorios sobre el papel de los agregados intraneuronales en la patología de las enfermedades de triplete CAG. Por este motivo, la pregunta de que si estos agregados son dañinos, inocuos o incluso protectores continúa siendo uno de los enigmas más apasionantes dentro la investigación de las enfermedades neurodegenerativas. En conjunto, nuestros trabajos sugieren que la toxicidad de los agregados intraneuronales presentes en la enfermedad de Huntington depende de la localización subcelular (trabajo 1) y del nivel de ordenamiento/agregación de los mismos (trabajo 4).

La relevancia de los agregados intranucleares *in vivo* fue estudiada en los modelos R6/1 y bDM (trabajo 1). Se estudió el número de agregados inmunopositivos para la htt mutada y para la ubiquitina en el núcleo estriado de los ratones R6/1 y los bDM, encontrando que ambos modelos presentan el mismo número de agregados. De igual manera, la localización de los agregados estriatales no mostró diferencia entre los R6/1 y los bDM. El hallazgo de que estos dos modelos difieren enormemente en la severidad de la patología pero no presentan diferencias en el número ni en la localización de sus agregados sugiere claramente que los agregados intranucleares no determinan la severidad de las alteraciones motoras ni histopatológicas en estos modelos. El análisis de muestras procedentes de pacientes con enfermedad de Huntington respalda nuestras observaciones ya que la localización de los agregados intranucleares no correlaciona con el patrón de degeneración estriatal selectiva. Así, los

agregados intranucleares son más abundantes en las neuronas corticales que en las estriatales (Kuemmerle y col., 1999) incluso en etapas iniciales de la enfermedad (Gutekunst y col., 1999), siendo las neuronas estriatales mucho más afectadas que las corticales (Perez-Navarro y col., 2006). De la misma manera, se ha demostrado que la formación de agregados intranucleares no se correlaciona con la neurodegeneración inducida por la htt mutada *in vitro* (Saudou y col., 1998). Además, las interneuronas estriatales, las cuales son menos afectadas que las neuronas estriatales de proyección, muestran una mayor prevalencia de inclusiones de htt que las neuronas estriatales de proyección (Kuemmerle y col., 1999). El estudio de modelos transgénicos también apoya nuestra teoría. Así, los ratones YACss presentan agregados intranucleares estriatales en ausencia de signos conductuales o histopatológicos de neurodegeneración estriatal (Slow y col., 2005) demostrando que la presencia de inclusiones intranucleares de htt *per se* no es suficiente para inducir la neuropatología. Además, un estudio reciente estudió el efecto de los agregados intranucleares sobre las alteraciones transcripcionales observadas en las neuronas estriatales de los ratones R6/2 y encontró el mismo grado de alteración transcripcional tanto en neuronas estriatales que contenían agregados intranucleares como en las que no los contenían (Sadri-Vakili y col., 2006). Incluso, se ha sugerido que el desarrollo de agregados representa una respuesta en contra de la htt mutada la cual tendría como finalidad disminuir su toxicidad (Arrasate y col., 2004). Sin embargo, es difícil imaginar como un cuerpo de inclusión ubicado en el neurópilo, interrumpiendo por lo tanto el transporte axonal, podría ser neuroprotector. Así, es posible que los agregados no nucleares (citoplasmáticos o del neurópilo) podrían representar formas más tóxicas de la htt mutada. Resultados previos de nuestro laboratorio refuerzan esta idea. Los ratones bDM, con mayor número de agregados citoplasmáticos en la sustancia negra que los R6/1, tienen alteraciones de la vía nigroestriatal más severas que éstos (Pineda y col., 2005). Estos agregados

citoplasmáticos podrían afectar el transporte axonal en estas células (Pineda y col., 2005). Además, los agregados de htt mutada localizados en el seno de las neuritas distróficas (DiFiglia y col., 1997) se correlaciona más estrechamente con la patología que los agregados intranucleares (Gutekunst y col., 1999). En conjunto, estos datos sugieren que los agregados intraneuronales de htt mutada podrían tener diferentes papeles dentro de la patología de la enfermedad de Huntington dependiendo de su localización subcelular.

Hemos demostrado que los niveles de BDNF no modifican el número ni la localización de los agregados en el núcleo estriado de los ratones R6/1: Los R6/1 y los bDM tiene el mismo número de agregados estriatales intranucleares (trabajo 1). Resultados similares han sido descritos en un modelo celular. El tratamiento con BDNF disminuye la toxicidad inducida por la expresión de htt mutada sin modificar la formación de agregados intracelulares (Saudou y col., 1998). Sin embargo, este efecto parece depender de la región cerebral estudiada. Así, los ratones bDM presentan más agregados en la sustancia negra que los R6/1, dato que correlaciona con las alteraciones de la vía nigro-estriatal más severas en este modelo (Pineda y col., 2005). Estos resultados sugieren que los mecanismos de formación/eliminación de los agregados pudieran ser diferentes en las neuronas estriatales y nigrales y que el efecto del BDNF sobre la formación de los agregados de htt podría ser específico de cada tipo celular, tal como ha sido demostrado con otras funciones celulares moduladas por esta neurotrofina (Schinder y col., 2000).

Además de la localización de los agregados dentro de la célula, es posible que otros factores, como el grado de ordenamiento de la htt mutada y/o de empaquetamiento dentro del agregado, modulen su toxicidad (Sánchez y col., 2003; Ross

y Poirier 2004, 2005). En este sentido, se han descrito diversos intermediarios de la htt mutada que van desde los oligómeros, protofibrillas, fibras y agregados (o cuerpos de inclusión), hasta agregados densamente empaquetados como los amiloideos teñibles con tioflavina-S (Poirier y col., 2002). De hecho, en cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington (McGowan y col., 2000) y en los ratones transgénicos Tet/HD94 (trabajo 4) se han descrito agregados amiloideos (positivos para rojo congo y tioflavina-S), aunque la relevancia de éstos en la patología de la enfermedad de Huntington no ha sido aclarada. En el trabajo 4 se aborda precisamente esta incógnita. Observamos que pese a la reversión completa del fenotipo motor (mediante el silenciamiento del transgen) persisten los agregados estriatales amiloideos, sugiriendo que este tipo de agregados podrían no ser la forma más tóxica de la htt mutada y/o que no participen en la patología de la enfermedad. De forma similar, se ha descrito la recuperación total de los síntomas en un modelo transgénico condicional de la enfermedad de Alzheimer a pesar de la persistencia de agregados amiloideos (SantaCruz y col., 2005). La causa de la toxicidad disminuida de los agregados amiloideos aún no está clara, pero parece lógico pensar que como consecuencia de la alta concentración de htt mutada dentro del agregado se consiguiera un mayor grado de madurez y un mayor empaquetamiento tal como ha sido descrito previamente (Poirier y col., 2002). En este escenario los constituyentes potencialmente tóxicos de los agregados perderían su capacidad de interactuar con sus respectivas dianas dada la disminución de su solubilidad (Ross y Poirier, 2004; 2005) en otras palabras, a la disminución de los niveles libres de las formas tóxicas de la htt mutada (Arrasate y col., 2004). Consistentemente con estas observaciones, demostramos que la ultraestructura de las inclusiones remanentes en los ratones Tet/HD94 estaban formados por una zona externa constituida por filamentos orientados al azar y un núcleo compacto de material altamente ordenado. Este alto grado de ordenamiento en el núcleo del agregado sugiere un estado mayor de

maduración del mismo, compatible con un material amiloideo (Poirier y col., 2002). Además, en general nuestros resultados apoyan las observaciones de que formas menos ordenadas de htt mutada como los oligómeros, protofibrillas y las fibrillas, tienen mayor toxicidad que los agregados propiamente dichos (Sanchez y col., 2003; Arrasate y col., 2004; Ross y Poirier, 2004, 2005; figura 16).

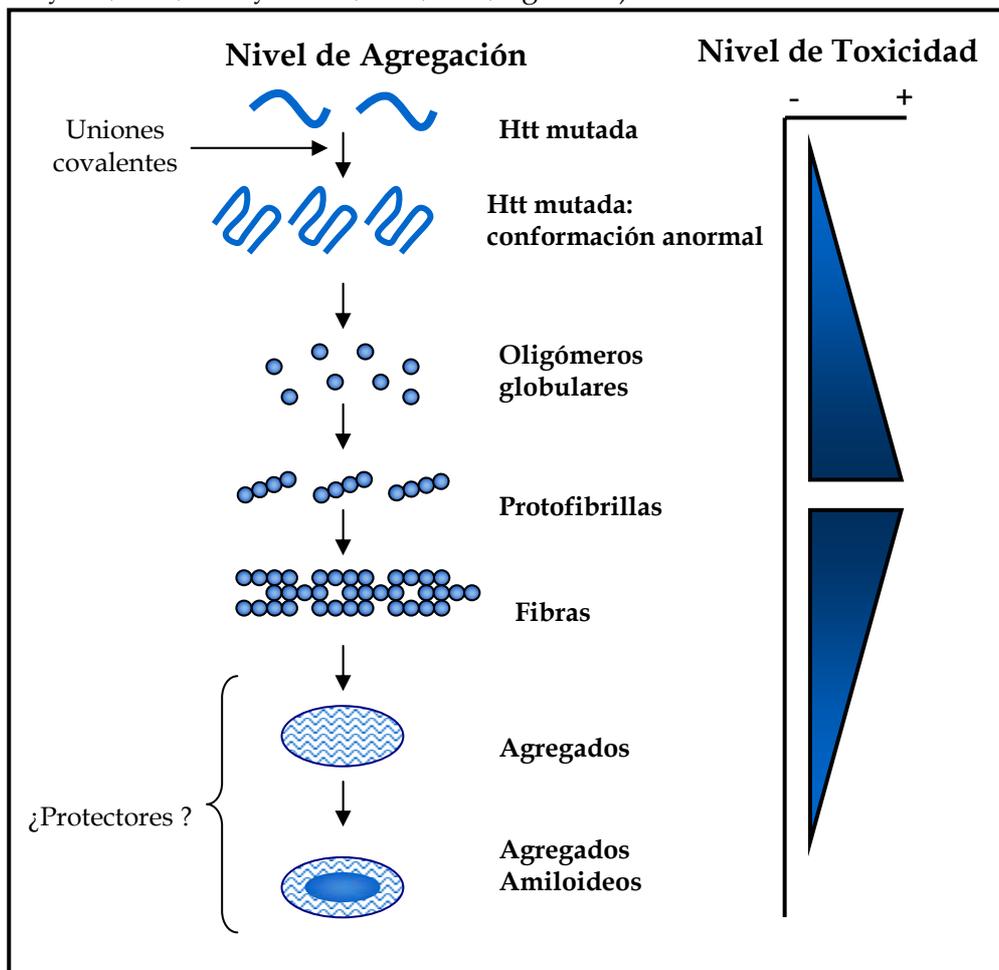


Figura 16. Agregados intracelulares en la patología de la enfermedad de Huntington: Importancia del nivel de agregación en la toxicidad de la htt mutada. El evento inicial en la agregación podría ser la modificación covalente de la htt mutada (por fosforilación y/o clivaje), modificando su conformación secundaria hacia hojas  $\beta$ . Luego, por oligomerización, se formarían los intermediarios con mayor toxicidad, como los oligómeros globulares y las protofibrillas. Por este motivo, es posible que la inhibición de la oligomerización tenga efectos beneficiosos (Sánchez y col., 2004). Las fibras podrían formarse por unión de protofibrillas o por la incorporación de oligómeros y/o protofibrillas a una fibra preformada. Estas a su vez, formarían agregados visibles al microscopio óptico. Es posible que la formación de los agregados disminuya la toxicidad de sus componentes, tal como ha sido sugerido anteriormente (Arrasate y col., 2004). Por último, se formarían agregados amiloideos altamente ordenados como consecuencia de la elevada concentración de la proteína dentro del agregado (McGowan y col., 2000). Tal como indican nuestros resultados (trabajo 4), los agregados amiloideos podría no ser la forma más tóxica de Htt mutada. Modificado de Ross y Poirier, 2004.

### **4.-Reversión de la neuropatología estriatal en modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington: Aproximaciones terapéuticas.**

A pesar de los grandes avances en el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Huntington, actualmente no se conoce la cura de esta enfermedad, por lo que sus tratamientos van dirigidos a paliar la sintomatología psiquiátrica y motora. Por este motivo, la investigación sobre estrategias terapéuticas para la enfermedad de Huntington debería dirigirse hacia el desarrollo de tratamientos que detengan los procesos neurodegenerativos activados por la htt mutada específicamente en las regiones afectadas y/o que incrementen los mecanismos neuroprotectores endógenos. En conjunto, nuestros resultados sugieren que es posible abordar el tratamiento de la enfermedad de Huntington con dos aproximaciones terapéuticas: Modular el sopote trófico de las neuronas afectadas (trabajo 1) y/o el silenciamiento del gen mutado de la htt (trabajo 4).

Los resultados del trabajo 1 sugieren que una terapia neuroprotectora basada en el BDNF podría ser una herramienta útil para disminuir y/o retardar la neurodegeneración estriatal en la enfermedad de Huntington. La administración intraestriatal de BDNF a ratones R6/1 y bDM de 20 semanas de edad rescató la expresión de ENK en las neuronas de proyección estriatopalidales (trabajo 1), las más afectadas en la enfermedad de Huntington (Richfield y col., 1995; Reiner y col., 1988). De manera similar, la sobreexpresión de ENK tras la administración intra-estriatal de BDNF ha sido observada anteriormente en nuestro laboratorio al transplantar células que sobreexpresan el BDNF en un modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington (Perez-Navarro y col., 1999). El efecto neuroprotector del BDNF se ha comprobado al incrementar su expresión mediante el tratamiento con cystamina o

cysteamina, fármacos inhibidores de la transglutaminasa que han demostrado ser neuroprotectores en modelos de la enfermedad de Huntington (Dedeoglu y col., 2002; Karpuj y col., 2002; Bailey y Jonson, 2006; Wang y col., 2005). Estos tratamientos, farmacológicos además de incrementar los niveles de BDNF en ratones normales, restablecen la expresión, el transporte y la secreción normal del BDNF en modelos celulares y animales de la enfermedad de Huntington (Borrell-Pages y col., 2006). El aumento de la expresión de BDNF inducido por cysteamina se correlaciona con la recuperación de la expresión estriatal de ENK en ratones transgénicos R6/1 y bDM (Borrell-Pages y col., 2006). La modulación de la expresión de ENK dependiente de los niveles de BDNF mostró ser muy específica, dado que los niveles de SP no se modificaron por el tratamiento con BDNF (trabajo 1). De manera similar, el tratamiento con cysteamina no modificó la expresión estriatal de SP en estos modelos transgénicos (Borrell-Pages y col., 2006). Vale la pena resaltar, que en el modelo excitotóxico el efecto del BDNF exógeno carece de esta especificidad ya que aumenta la expresión tanto de ENK como de SP en el núcleo estriado (Perez-Navarro y col., 1999). En este sentido, se ha demostrado que la expresión de BDNF y TrkB aumentan tras la lesión con QUIN (Canals y col., 2001, Canals y col., 1999), observaciones que correlaciona con el mayor y más amplio efecto del BDNF exógeno sobre la expresión de neuropéptidos estriatales tras la excitotoxicidad inducida por QUIN (Perez-Navarro y col., 1999). Estas diferencias apoyan la hipótesis mencionada anteriormente de que el efecto neurotrófico del BDNF podría estar modulado diferencialmente por distintos estímulos neurotóxicos.

Estudios pilotos de la administración de BDNF exógeno, lejos de mostrar efectos beneficiosos, han desencadenado muchos efectos secundarios debidos posiblemente a la administración sistémica de altas dosis de la neurotrofina (Apfel S., 2002; Thoenen y Sendtner, 2002). Por este motivo, otra alternativa de terapia

neuroprotectora a considerar sería la administración local de BDNF o el incremento de la expresión del BDNF endógeno en los núcleos más propensos a degenerar. En este sentido, habíamos comentado previamente que la cysteamina incrementa los niveles del BDNF endógeno en ratones normales y que en modelos de la enfermedad de Huntington restaura la expresión normal de BDNF (Borrell-Pages y col., 2006). Por este motivo la cysteamina es un tratamiento potencial para la enfermedad de Huntington. Sin embargo, existe un parámetro a considerar en el tratamiento neuroprotector basado en BDNF: La integridad de su vía de señalización, específicamente, la expresión de su receptor de alta afinidad TrkB. Dado que se ha demostrado que los niveles del receptor trkB están disminuidos en fases tardías de la enfermedad de Huntington (Gines y col., 2006), el tratamiento con BDNF sería efectivo en las fases iniciales o intermedias de la enfermedad. Consecuentemente con esta observación, el tratamiento con BDNF en ratones de 20 semanas de edad (trabajo 2), así como el tratamiento con cysteamina en ratones de 16 semanas de edad (Borrell-Pages, 2006) mostraron ser efectivos para rescatar los niveles de ENK en ratones R6/1 y bDM, mientras que el tratamiento con cysteamina en ratones mayores (26 semanas de edad) fue incapaz de recuperar la expresión de DARPP-32 en los bDM (Borrell-Pages, 2006), sugiriendo que la efectividad del tratamiento neuroprotector basado en BDNF depende de la severidad de la patología.

En este sentido, es necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas cuya efectividad no se vea afectada en fases avanzadas de la enfermedad. Hemos demostrado que la reversión de la patología es posible en fases más avanzadas de la enfermedad caracterizadas por la pérdida de neuronas estriatales. La interrupción de la expresión de la htt mutada en el modelo condicional Tet/HD94 (Yamamoto y col., 2000; Martin-Aparicio y col., 2001) y en otro modelo transgénico (Harper y col., 2005) ha

demostrado ser suficiente para la total remisión de las alteraciones motoras y neuropatológicas, estableciendo claramente que la interrupción de la expresión de la htt mutada es una excelente diana terapéutica. Sin embargo, en dichos estudios la reversión se llevó a cabo en fases tempranas de la enfermedad en las cuales la pérdida de neuronas estriatales aún no había ocurrido (Yamamoto y col., 2000; Martín-Aparicio y col., 2001; Schilling y col., 1999). Así, el hallazgo más significativo del trabajo 4 representa la posibilidad de revertir la sintomatología de la enfermedad de Huntington incluso después de que ya hubiese ocurrido muerte neuronal en el núcleo estriado. Este trabajo refuerza la teoría de que la mejor terapia para la enfermedad de Huntington debe abordar la cascada fisiopatológica desde su inicio, es decir, desde la expresión de la htt mutada. En este sentido, el uso de ARN de interferencia (ARNi) para interrumpir la expresión del alelo mutado de la htt se postula como uno de los mejores tratamientos de la enfermedad de Huntington. De hecho, el uso de ARNi ha demostrado su efectividad en un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington (Harper y col., 2005), lo que extiende la posibilidad de emplear esta novedosa terapia en pacientes.

Las estrategias empleadas en los trabajos 1 y 4 han demostrado revertir la neurodegeneración estriatal en dos modelos transgénicos mostrando evidencias bioquímicas y funcionales. Nuestros datos muestran que después de la infusión intraestriatal de BDNF, los ratones bDM mostraron un comportamiento rotatorio unilateral en respuesta a anfetamina (trabajo 1), lo que sugiere la recuperación funcional de las neuronas estriatales. Igualmente, los ratones Tet/HD94 mostraron una recuperación de la coordinación motora tras el silenciamiento de la htt mutada llegando a ser indistinguibles de los ratones controles en la prueba del rota-rod (trabajo 4). Tras los tratamientos respectivos, ambos modelos mostraron la recuperación de marcadores bioquímicos de las neuronas estriatales: ENK en los R6/1 y bDM y DARPP-32 en los

Tet/HD94. Así, en conjunto nuestros resultados sugieren una implicación funcional de la expresión de ENK y DARPP-32 en la enfermedad de Huntington. Aunque en nuestro conocimiento no existen datos que relacionen directamente la disminución de la expresión de ENK con alteraciones funcionales de las neuronas estriatales, existe evidencia que demuestra la repercusión funcional de la falta de DARPP-32 (Fienberg y Greengard, 2000). Los ratones mutantes nulos de DARPP-32 presentan una actividad locomotora menor que los ratones controles en respuesta a cocaína, una sustancia dopaminomimética (Fienberg y col., 1998). Los ratones bDM también muestran menor actividad locomotora en respuesta a la anfetamina, otro fármaco dopaminomimético (Pineda y col., 2005). Esta alteración de los bDM es detectable desde las 15 semanas de edad, sin embargo, la máxima afectación la muestran a las 30 semanas de edad (Pineda y col., 2005) coincidiendo con la más baja expresión de DARPP-32 en este modelo (trabajo 1).

Nuestros resultados apoyan fuertemente la teoría de que el sustrato fisiopatológico de la enfermedad de Huntington, al menos en las fases tempranas, es la disfunción más que la muerte de las neuronas estriatales. Esta teoría es sustentada por el hecho de que diversos modelos de animales transgénicos presentan síntomas motores, alteraciones bioquímicas y/o electrofisiológicas en ausencia de muerte neuronal en el núcleo estriado (Mangiarini y col., 1996; Hansson y col., 1999; Guidetti y col., 2001; Martin-Aparicio y col., 2001; Gines y col., 2003b). Incluso, las neuronas de proyección estriatales de ratones R6/2 en fases tempranas son morfológicamente indistinguibles de las de un ratón control, aunque presentan alteraciones electrofisiológicas significativas (Hodgson y col., 1999; Klapstein y col., 2001). Esto último sugiere incluso que las alteraciones funcionales preceden a los cambios neurodegenerativos (atrofia neuronal). Además, en el trabajo 4 se demuestra que después del silenciamiento de la

Los ratones que han sufrido la pérdida del 20% de las neuronas estriatales son indistinguibles de los controles en cuanto a parámetros que miden la coordinación motora. Es posible que el 80% de las neuronas restantes de esos ratones asuman las funciones de las neuronas perdidas. Para esto sería necesario que las aferencias estriatales se redistribuyeran entre la población de neuronas remanentes del núcleo estriado y/o que estas últimas inervaran las dianas de sus homólogas perdidas. Por otra parte, es posible que la muerte de las neuronas estriatales no sea estrictamente necesaria para que aparezcan los síntomas motores y, más específicamente, que la pérdida del 20% de las neuronas estriatales en este modelo no repercuta sobre la coordinación motora, y que sea necesario sobrepasar un umbral de muerte neuronal para que ésta contribuya a la sintomatología motora tal como sucede con la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson (Hardy y col., 2006). Sin restar importancia a la contribución de la muerte neuronal en el decline neurológico propio de las fases avanzadas de la enfermedad de Huntington, estos resultados sugieren que los procesos neurodegenerativos evidentes en fases más tardías son precedidos por una fase de disfunción neuronal, la cual se caracterizaría por la presencia de manifestaciones clínicas sin evidencias de neurodegeneración y/o muerte neuronal. Así, los procesos de disfunción, degeneración, y muerte neuronal no serían eventos mutuamente excluyentes, sino, etapas secuenciales y finalmente concomitantes del mismo proceso patológico.

Después de todo lo expuesto cabe mencionar que ambas terapias planteadas en nuestros trabajos son factibles en el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Sin embargo, ambas poseen ciertas limitaciones dignas de ser mencionadas. Una de las limitaciones concierne al método empleado para controlar la liberación continua de ARNi y/o BDNF en las dianas apropiadas. Para ello se han diseñado diversas

alternativas. La administración local de un factor neurotrófico, el CNTF, se ha efectuado mediante implantación intracerebral de células encapsuladas modificadas genéticamente para producirlo (Bachoud-Levi y col., 2000), por lo que esta misma herramienta podría ser empleada para la liberación controlada del BDNF. Por su parte, se han empleado vectores virales para lograr la liberación regional de ARNi en un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington y de ataxia espinocerebolosa tipo 1 (Harper y col., 2005; Xia y col., 2004). Por otra parte, aunque los casos de pacientes homocigotos de la enfermedad de Huntington representan una minoría, se ha de considerar que la inhibición de la expresión de la htt mutada endógena no sería posible en estos casos, ya que se ha demostrado que el silenciamiento de ambos alelos de la htt conduce a la degeneración de las neuronas estriatales (Dragatsis y col., 2000). En todo caso, ambas aproximaciones están en fases muy preliminares, por lo que deben realizarse estudios en los que se demuestre la relación riesgo/beneficio de estas estrategias. Es por esto que el tratamiento neuroprotector basado en el incremento de la expresión de BDNF inducido por cysteamina (Cystagon®), un fármaco aprobado por la FDA (del inglés, *U.S Food and Drug Administration*), lo considero a título personal como la alternativa terapéutica con mejores perspectivas a corto plazo para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Los principales hallazgos de esta tesis se resumen en la figura 17.

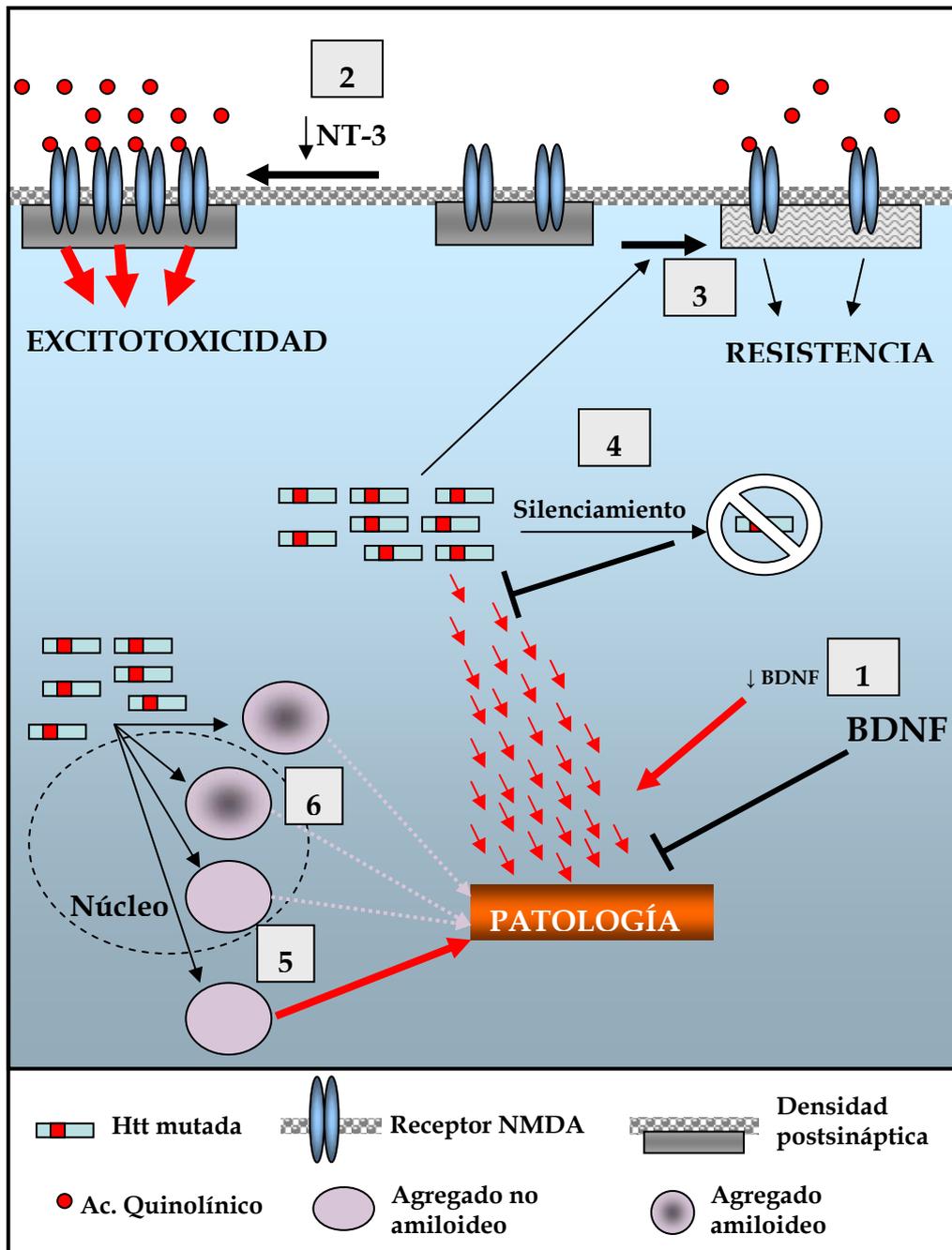


Figura 17. Resumen de los mecanismos implicados en la neurodegeneración estriatal en modelos excitotóxicos y transgénicos de la enfermedad de Huntington. Nuestros estudios demuestran que las neurotrofinas BDNF y NT-3 modulan la degeneración de las neuronas estriatales en modelos excitotóxicos y transgénicos de la enfermedad de Huntington. 1: La administración del BDNF rescata selectivamente la expresión de ENK en los ratones R6/1 y bDM. Además, la disminución de los niveles endógenos del BDNF aumenta la patología inducida por la Htt mutada. 2: La NT-3 modula la degeneración de las neuronas estriatales selectivamente en el modelo excitotóxico regulando la expresión de los receptores NMDA. Así, la disminución de los niveles de la NT-3 aumenta la

expresión de los receptores NMDA en el estriado adulto, aumentando la susceptibilidad excitotóxica de las neuronas estriatales. 3: La Htt mutada induce cambios compensatorios que implican cambios en la composición de las densidades postsinápticas. Estos cambios implican la disminución de los niveles de PSD-95 y  $\alpha$ CaMKII y el aumento de PSD-93. La intensidad de estos cambios compensatorios se correlaciona con la intensidad de la patología y podrían estar modulados por el BDNF. 4: El silenciamiento de la expresión de la Htt mutada detiene la cascada de eventos patológicos desde su raíz, revirtiendo la patología en la enfermedad de Huntington incluso en fases muy avanzadas. 5: Los agregados de Htt mutada podrían participar en la patología dependiendo de su localización. Los agregados citoplasmáticos y/o del neurópilo participan en la patología, a diferencia de los agregados nucleares, los cuales no se correlacionan con la severidad de la patología. 6: De todas las formas de agregación de la Htt mutada, los agregados amiloideos no son las especies más tóxicas de la Htt mutada, ya que su presencia no se correlaciona con patología.