

**DEPARTAMENT DE
BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA**



**MECANISMOS INTRACELULARES DE SUPERVIVENCIA
Y MUERTE NEURONAL EN MODELOS
EXCITOTÓXICOS Y TRANSGÉNICOS DE LA
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**Tesis presentada por Juan Manuel García Martínez
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona**

I.- INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada es un proceso crucial para el desarrollo normal del embrión y el posterior mantenimiento de la homeostasis de los diferentes tejidos. Su regulación es esencial durante toda la vida del individuo, y en este sentido, un mal funcionamiento de este proceso interviene en la aparición de diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (Cory y Adams, 2002).

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas están preparadas para activar el proceso de muerte, y las que no consigan el aporte trófico necesario, activarán este programa esculpiendo así las conexiones del sistema. Cuando el sistema nervioso está formado, las neuronas están definitivamente diferenciadas y ahora, mantener su viabilidad durante toda la vida del individuo se convierte en su imperativo (Benn y Woolf, 2004).

En el desarrollo de esta tesis nos hemos centrado en el estudio de los diferentes mecanismos intracelulares de muerte neuronal así como en su posible modulación mediante factores tróficos. Estos estudios se han realizado en el núcleo estriado, zona que degenera en la enfermedad de Huntington, con el propósito de identificar nuevas dianas sobre las que actuar para detener la neurodegeneración específica y desarrollar nuevos tratamientos neuroprotectores para la enfermedad.

1.- MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Actualmente no existe un consenso sobre la clasificación de los diferentes tipos de muerte celular. En el desarrollo de esta tesis destacaremos la apoptosis, como la más ampliamente estudiada (Hengartner, 2000), aunque es importante considerar que a pesar de una primera definición de apoptosis y necrosis como mecanismos únicos de muerte celular (Kerr y col., 1972), el paradigma apoptosis-necrosis es demasiado simple para englobar el amplio espectro de posibilidades que existen para eliminar células dañadas o potencialmente peligrosas. En este sentido, distintas proteasas como caspasas, calpainas, catepsinas y endonucleasas pueden ejecutar programas alternativos de muerte celular. Estos programas pueden estar dirigidos desde diferentes orgánulos intracelulares, como la mitocondria, el lisosoma y el retículo endoplasmático, y pueden además, actuar de manera independiente o colaborar unos con otros (Fig. 1). La ventaja evolutiva de la existencia de diferentes rutas de muerte es obvia y permite proteger el organismo frente a un gran número de estímulos dañinos (Broker y col., 2005).

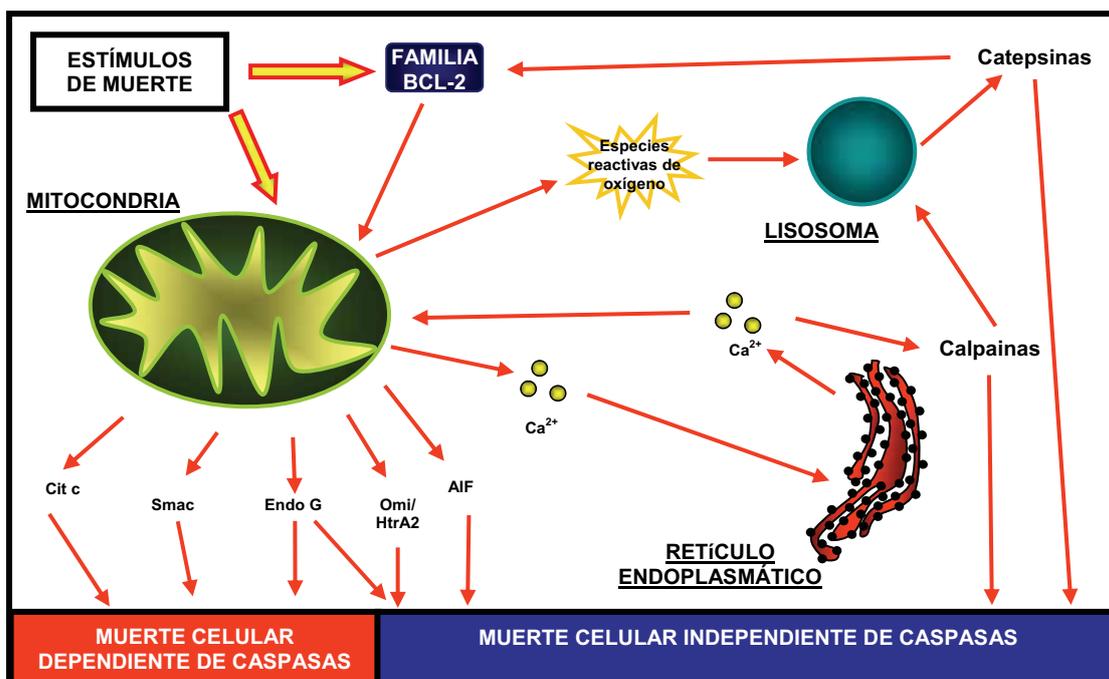


Figura 1.- Vías alternativas de muerte en respuesta a estímulos de muerte (fig. adaptada de Broker y col., 2005)

1.1.- APOPTOSIS

La muerte apoptótica da lugar a una serie de características morfológicas muy bien definidas (Kerr y col., 1972). Tanto el núcleo como el citoplasma se condensan, el ácido desoxirribonucleico (ADN) se rompe, la membrana nuclear se degrada, y la célula se deforma. Por último, se forman cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos y células adyacentes sin que se produzca una respuesta inflamatoria.

Los mecanismos de muerte celular parecen estar altamente conservados a nivel evolutivo. Gracias a este proceso, gran parte de los conocimientos actuales sobre la apoptosis en los mamíferos provienen de los estudios realizados en el nematodo *C. elegans* (Horvitz, 2003).

La apoptosis se da a través de una secuencia muy bien determinada de cascadas de señalización, siendo un mecanismo común en todas las células del organismo. En primer lugar presenta una fase de iniciación, mediada por una vía mitocondrial (vía intrínseca) o por una vía activada a través de receptores de muerte (vía extrínseca). Posteriormente, ambas vías convergen en una segunda fase de ejecución caracterizada por la activación de las caspasas, y que es responsable última de las características morfológicas de la muerte apoptótica (Krantic y col., 2005).

1.1.1.- FAMILIA DE LAS CASPASAS

Las caspasas son una familia de proteasas que constituye el principal efector de la apoptosis y su activación es un indicador de muerte apoptótica. Su estudio se originó con el descubrimiento en el nematodo *C. elegans* del gen *ced-3*, que codificaba para una proteína relacionada con la proteasa ICE en mamíferos (del inglés, *Interleukin-1 beta-converting enzyme*) (Yuan y col., 1993). Se demostró que esta proteína era suficiente para inducir apoptosis cuando se sobre-expresaba en células de mamíferos (Miura y col., 1993).

Actualmente, en mamíferos han sido identificadas alrededor de 14 caspasas y todas comparten unas características comunes. Las caspasas son sintetizadas como pro-enzimas inactivos que contienen un pro-dominio N-terminal seguido por una subunidad larga (p20) y otra corta (p10) (Wolf y Green, 1999). Basándonos en su función, las caspasas pueden clasificarse en tres grupos (Fig. 2):

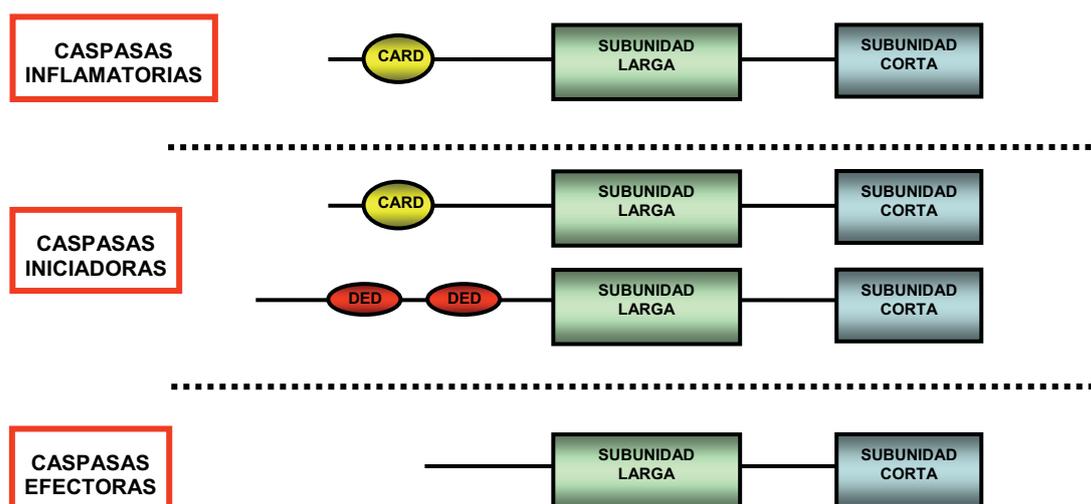


Figura 2.- Clasificación de las caspasas

- Caspasas inflamatorias. Este grupo incluye las caspasas-1, -4, -5, -11,-12, -13 y -14, que contienen en su estructura un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, de inglés *caspase-recruitment domain*) y están relacionadas con procesos inflamatorios.

- Caspasas iniciadoras de la apoptosis. Estas caspasas contienen largos pro-dominios que pueden contener un dominio efector de muerte (DED, del inglés Death Effector Domain) (caspasa-8 y -10) o un dominio CARD (caspasa-2 y -9), los cuales median su interacción con moléculas adaptadoras.

- Caspasas efectoras de la apoptosis. Estas caspasas (caspasa-3, -6 y -7) se caracterizan por la presencia de un pro-dominio muy corto y son típicamente procesadas por las caspasas iniciadoras obteniendo un complejo heterotetramérico (el enzima activo) compuesto por dos subunidades cortas y dos largas (Wolf y Green, 1999). Son las encargadas de la fase de ejecución de la apoptosis degradando directamente múltiples sustratos celulares (Degterev y col., 2003).

Las vías de señalización que convierten a los pro-enzimas inactivos en enzimas completamente activos pueden derivar tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca. Ambas vías apoptóticas inducen la oligomerización de proteínas adaptadoras de muerte, y estos oligómeros a su vez desencadenarán la agregación de pro-caspasas y su posterior activación.

El modelo de proximidad inducida (Ashkenazi y col., 1998) proponía que las caspasas iniciadoras se activaban mediante autoproteolización cuando se inducía su agregación. Esta teoría ha sido refinada por el modelo de homo-dimerización inducida, donde las caspasas iniciadoras, como por ejemplo la caspasa-8, se dimerizan y autoactivan en respuesta a determinados estímulos apoptóticos (Boatright y col., 2003; Donepudi y col., 2003). Resultados procedentes del estudio de ratones deficientes (KO, del inglés *knock-out*) indican que la caspasa-8 es requerida por todas las vías apoptóticas mediadas por receptores de muerte (Varfolomeev y col., 1998), mientras que la caspasa-9 está fundamentalmente implicada en las vías apoptóticas en las que interviene la mitocondria (Kuida y col., 1998).

Las pro-caspasas efectoras son normalmente proteolizadas y activadas por caspasas iniciadoras, aunque este fenómeno también puede producirse a través de otras proteasas como catepsinas o calpains (Johnson, 2000). Estudios genéticos han demostrado que la pérdida de la caspasa-3 produce malformaciones en el cerebro y muerte prematura. Además, el ratón KO para caspasa-3 presenta una respuesta defectuosa a estímulos apoptóticos mediados tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca (Kuida y col., 1996; Woo y col., 1998). Por estos motivos la caspasa-3 tiene un papel principal en la ejecución de la apoptosis, mientras que el resto de caspasas ejecutoras parecen tener un papel redundante en las diferentes vías apoptóticas (Zheng y col., 2000).

Aunque la activación proteolítica de las caspasas es la vía principal de regulación de su actividad, otras modificaciones post-transcripcionales como

ubiquitinización y fosforilación también juegan un papel en la regulación de la actividad de las caspasas (Cardone y col., 1998). Además, dado que la potente actividad proapoptótica de las caspasas ha de mantenerse bajo control para la supervivencia de las células, se han identificado numerosos reguladores negativos de las caspasas. Entre ellos destaca la familia de las IAPs (del inglés *inhibitor of apoptosis proteins*), que son proteínas capaces de inhibir la apoptosis inducida por una gran variedad de estímulos mediante la unión directa y la inhibición de determinadas caspasas (Leblanc, 2003).

1.1.2.- VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca se inicia por la activación de receptores de muerte de la familia del TNF (del inglés, *Tumor necrosis factor*) anclados a la membrana plasmática. La familia del TNF está constituida por más de 20 proteínas con un amplio rango de funciones biológicas, incluyendo la regulación de la supervivencia y la muerte celular o la diferenciación (Walczak y Krammer, 2000; Ashkenazi, 2002). Entre los receptores de muerte destacan el TNFR1 (del inglés, *TNF-receptor 1*), el APO1/FAS/CD95 (del inglés, *Apoptosis antigen-1*) y el TRAILR1 (del inglés, *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*). Estos receptores de muerte presentan un dominio intracelular de interacción denominado dominio de muerte. La activación del receptor se inicia a través de ligandos específicos, el ligando de Fas, el FasL (del inglés, *Fas ligand*), se une al receptor Fas, el TNF α se une al TNFR1 y el TRAIL (del inglés, *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*) al TRAILR1.

A diferencia de Fas y TRAIL, la señalización de TNF no induce muerte celular de manera espontánea, dado que el TNF α puede activar al factor de transcripción NF- κ B (del inglés, *Nuclear factor κ B*) y promover la supervivencia neuronal (Tamatani y col., 1999; Wajant y Scheurich, 2001; MacEwan, 2002). La activación de NF- κ B induce la expresión de factores anti-apoptóticos tales como el inhibidor de la caspasa-8, cFLIP (del inglés *FADD-like ICE-inhibitory protein*) (Irmeler y col., 1997), y proteínas de la familia de las IAPs (Stehlik y col., 1998). Dada esta inducción, el efecto citotóxico del TNF sólo se manifiesta si la activación de NF- κ B está bloqueada.

La pre-asociación de los receptores de muerte a través de un dominio extracelular denominado dominio de ensamblaje preligando (PLAD, del inglés *preligand assembly domain*) es crítica para la unión del ligando (Chan y col., 2000). La unión del ligando al receptor resulta en el reclutamiento de una serie de proteínas adaptadoras que se agregan en el dominio de muerte intracelular del receptor (Fig. 3). Uno de los principales adaptadores reclutados es la proteína adaptadora FADD (del

inglés *Fas Associated Death Domain*), que también posee un dominio de muerte y puede interactuar directamente con el receptor (en el caso de APO1/FAS/CD95 y TRAILR1) o indirectamente, a través de otra proteína adaptadora denominada TRADD (del inglés *TNF Receptor Associated Death Domain*) (en el caso de TNFR1) (Jin y El-Deiry, 2005).

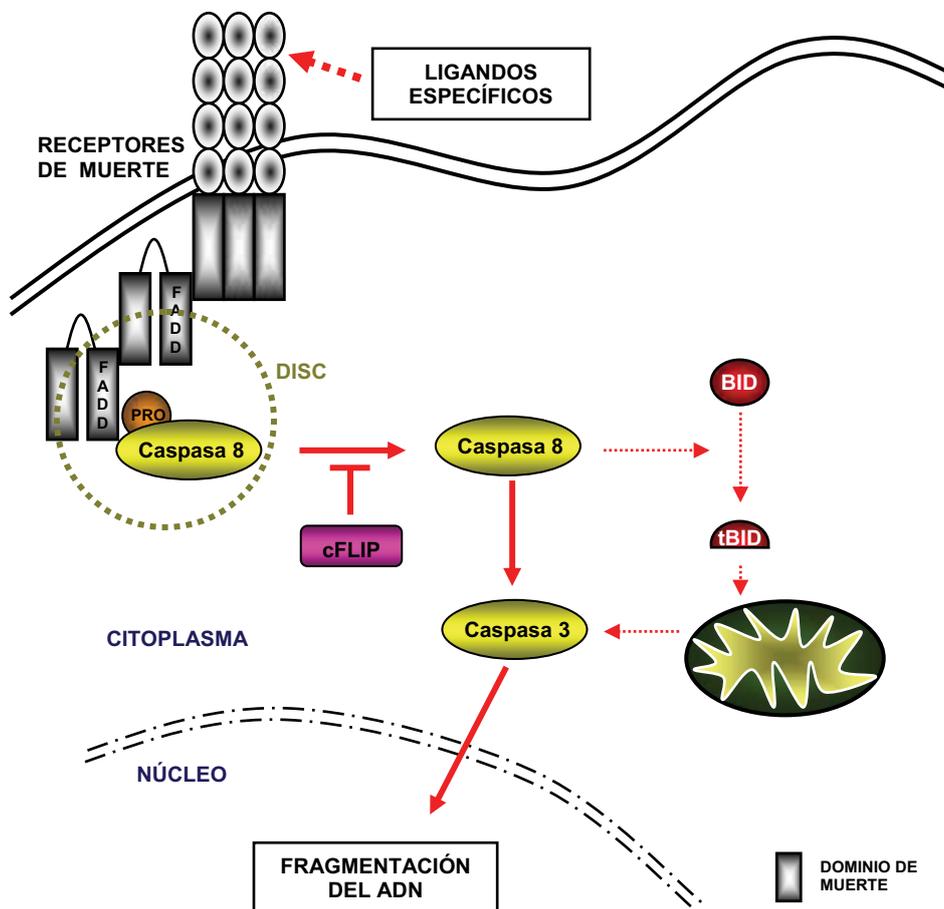


Figura 3.- Vía extrínseca de la apoptosis

FADD también contiene un segundo dominio de interacción denominado dominio efector de muerte, que interactúa con la pro-caspasa 8 formando un complejo intracelular multiproteico denominado DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*) (Wallach y col., 1999; Abe y col., 2000). Una vez formado, el DISC promueve la activación de caspasa-8 inducida por proximidad, la cual comienza entonces a ser rápidamente activada por un mecanismo autoproteolítico (Yang y col., 1998; Salvesen y Dixit, 1999). Tras este proceso autocatalítico, la caspasa-8 se libera del DISC completamente activa. La caspasa-8 es suficiente para activar directamente otros miembros ejecutores de la familia de las caspasas, como la caspasa-3, cuya acción sobre sustratos específicos conduce a la fase ejecutora de la apoptosis (Fig. 3).

Además, en la señalización mediada por APO1/FAS/CD95 y TRAILR1, existe una vía alternativa que actúa como una fase de amplificación y requiere de la mitocondria. Durante este proceso, la caspasa-8 proteoliza a una proteína de la familia de Bcl-2 (del inglés *B-cell lymphoma 2*), Bid, que en condiciones normales se encuentra de forma inactiva en el citosol, y que tras la proteólisis, forma un fragmento truncado (tBid, del inglés *truncated Bid*) que se desplaza hacia la mitocondria (Fig. 3; Desagher y col., 1999; Wei y col., 2000). El tBid inicia la permeabilización de la membrana mitocondrial estimulando la salida de factores apoptóticos como el citocromo c (cit c) o la proteína Smac/DIABLO (del inglés, *second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-associated binding protein with Low PI*) (Esposti, 2002) y la posterior activación de las caspasas efectoras. Estas caspasas, además de actuar sobre sus sustratos específicos, proteolizan a la caspasa-8 a modo de proceso de realimentación positiva (Stennicke y Salvesen, 2000).

La activación de estos receptores de muerte también puede inducir la activación de la vía de SAPK/JNK (del inglés *stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*) (Weston y Davis, 2002; Lin, 2003). JNK desencadena la muerte apoptótica inactivando a los miembros anti-apoptóticos o induciendo la activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2. Además, JNK también incrementa la expresión de moléculas pro-apoptóticas como Bim, p53 y Fas/FasL (Ip y Davis, 1998). Estudios recientes muestran que JNK juega un papel esencial en la apoptosis inducida por TNF. En estos estudios se muestra como la activación de JNK procesa a la proteína Bid generando un único producto, denominado jBid, diferente al tBid. A su vez, jBid también se desplaza a la mitocondria y permite la salida selectiva de Smac/DIABLO (Deng y col., 2003).

1.1.3.- VÍA INTRÍNSECA

La vía intrínseca se caracteriza por el papel fundamental que tiene la mitocondria. Numerosos estímulos citotóxicos agudos o semi-agudos y diferentes señales pro-apoptóticas convergen en la mitocondria induciendo la permeabilización de su membrana externa (Decaudin y col., 1998; Green y Kroemer, 2004). En las enfermedades neurodegenerativas esta vía también tiene un papel relevante, pero la naturaleza de la señal que afecta a la mitocondria es a veces desconocida pudiendo incluir especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, excitotoxinas y proteínas o lípidos tóxicos.

La activación de caspasas mediante la vía intrínseca requiere la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, suceso que está considerado el punto de “no retorno” de la apoptosis (Fig. 4).

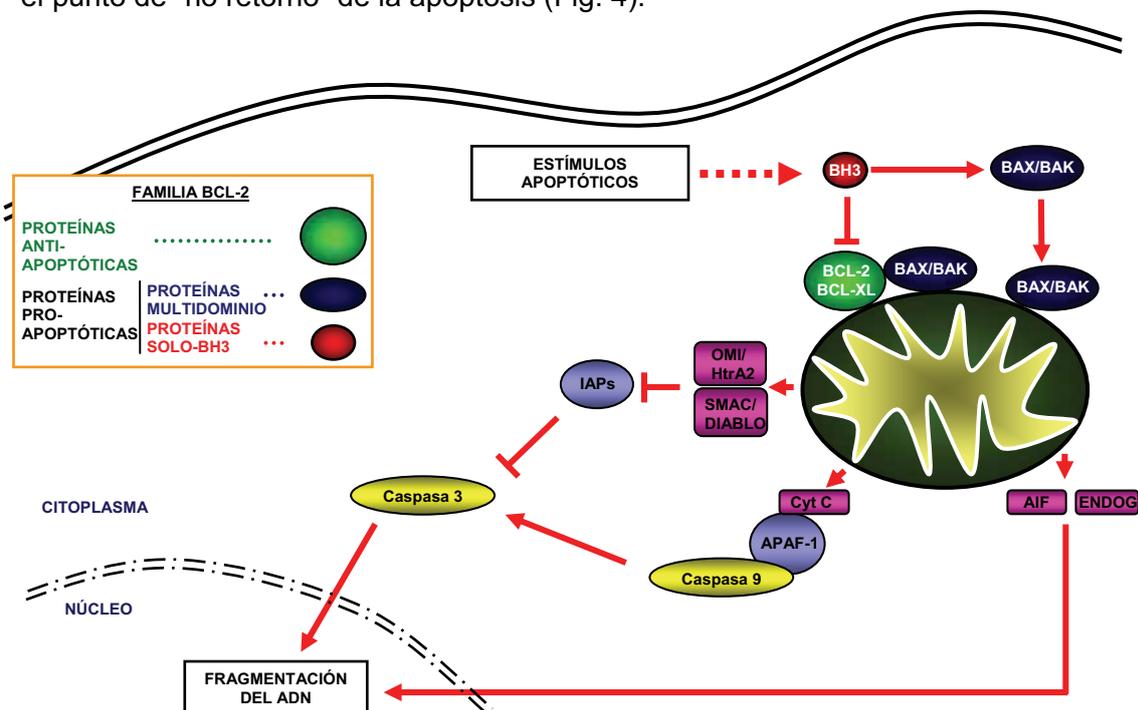


Figura 4.- Vía intrínseca de la apoptosis

Una vez que se altera la membrana mitocondrial externa, un conjunto de proteínas, que normalmente se localizan en el espacio intermembrana de la mitocondria, son liberadas al citoplasma, incluyendo el cit c, la proteína Smac/DIABLO, la proteasa Omi/HtrA2 (del inglés, *high temperature requirement serine protease*), el factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés *apoptosis inducing factor*) y la endonucleasa G (ENDO G) (Saelens y col., 2004). En el citoplasma, estas proteínas apoptogénicas desencadenan la ejecución de la muerte celular, bien promoviendo la activación de caspasas, o bien actuando como efectores de muerte independientes de la activación de caspasas (Saelens y col., 2004).

La salida del cit c desde la mitocondria desencadena directamente la activación de la caspasa-3. Una vez en el citoplasma, el cit c se une a una proteína citosólica, Apaf-1 (del inglés, *Apoptosis protease activating factor-1*), que posee un CARD dentro de su estructura. Esta unión facilita que el dominio CARD sea una plataforma donde la caspasa-9 (iniciadora) es reclutada y activada mediante la interacción CARD-CARD (Adrain y col., 1999). El complejo cit c/Apaf-1/caspasa-9 se denomina entonces apoptosoma. Este apoptosoma es el encargado de reclutar a la caspasa-3 (efectora) que es activada por la caspasa-9 residente en el complejo (Bratton y col., 2001). Una

vez activada, la caspasa-3 proteoliza sustratos específicos produciendo los cambios celulares y bioquímicos típicos de la apoptosis.

Otras proteínas liberadas al citoplasma como Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 facilitan la activación de caspasas de manera indirecta neutralizando inhibidores de caspasas endógenos, concretamente a las IAPs (Vaux y Silke, 2003). Además, Omi/HtrA2 puede actuar como proteasa de manera independiente de caspasas (Saelens y col., 2004).

La liberación de AIF y ENDOG al citoplasma representa un mecanismo apoptótico independiente de caspasas. La permeabilización de la membrana mitocondrial externa permite su liberación y posteriormente translocan al núcleo contribuyendo a la condensación de la cromatina y a la fragmentación del ADN (Cande y col., 2004; Saelens y col., 2004). Si estas proteínas son liberadas antes, al mismo tiempo, o después que el cit c es un tema muy controvertido (Arnoult y col., 2002).

1.1.4.- PAPEL DE LA FAMILIA DE BCL-2 EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

Esta familia debe su nombre al primer miembro que se descubrió, el proto-oncogén *Bcl-2*. Se observó que su expresión no promovía la proliferación celular como otros oncogenes, sino que bloqueaba la muerte celular ante múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (Vaux y col., 1988; McDonnell y col., 1989). En mamíferos, la familia de Bcl-2 consta de al menos 20 miembros, y todos y cada uno de ellos conservan al menos uno de los dominios homólogos a Bcl-2 (BH, del inglés *Bcl-2 homology*), lo cual les permite interactuar entre ellos formando homodímeros o heterodímeros, regulando así su función (Oltvai y col., 1993).

La familia de Bcl-2 se compone de tres subfamilias: (1) Las proteínas anti-apoptóticas, que incluyen Bcl-2, Bcl-x_L, MCL-1, A1 y Bcl-w. Todo este grupo de proteínas conservan los cuatro dominios homólogos a Bcl-2 (BH1-BH4). (2) Las proteínas pro-apoptóticas multidominio, Bax, Bak y Bok, que no presentan el dominio 4. Y (3) las proteínas pro-apoptóticas “solo-BH3” que como su nombre indica solo presentan el dominio 3. Esta última subfamilia conforma el otro grupo pro-apoptótico e incluye a las proteínas Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Hrk/DP5, Noxa y Puma (Fig. 5; Cory y Adams, 2002).

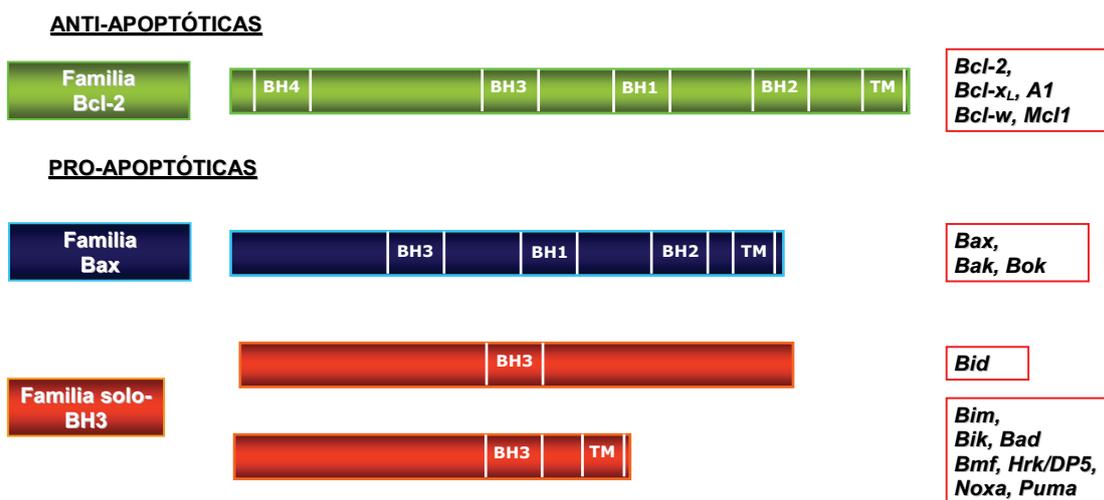


Figura 5.- Proteínas de la familia de Bcl-2

La permeabilización de la membrana mitocondrial externa es el proceso directamente regulado por las proteínas apoptóticas multidominio, principalmente Bax y Bak. Estas proteínas se expresan constitutivamente y sólo inducen la permeabilización tras un estímulo apoptótico, lo que sugiere que permanecen inactivas hasta que se recibe una señal apropiada (Kuwana y col., 2002; Letai y col., 2002). El estudio de los ratones KO para estas proteínas ha impulsado el conocimiento acerca de su función. El ratón KO para Bax presenta un mayor número de motoneuronas faciales así como de neuronas simpáticas en el ganglio cervical superior, sugiriendo graves defectos en la muerte neuronal programada durante el desarrollo (Deckwerth y col., 1996). Además, los cultivos neuronales del ratón KO para Bax son completamente resistentes a la muerte celular inducida por falta de aporte trófico, demostrando un papel crucial de Bax en la muerte de neuronas simpáticas ante la privación de NGF (Deckwerth y col., 1996). Sin embargo, otras poblaciones neuronales de estos ratones presentan un desarrollo relativamente normal, al igual que sucede en el ratón KO para Bak (Lindsten y col., 2000). En el ratón doble deficiente para Bax y Bak se observa una muerte celular defectuosa durante el desarrollo embrionario de diferentes tejidos (Lindsten y col., 2000). Además, las células obtenidas de este doble KO son resistentes a una gran variedad de estímulos que dependen de la vía mitocondrial para inducir la muerte celular (Wei y col., 2001; Hahn y col., 2004). Del estudio de estos ratones KO podemos extraer que Bax y Bak individualmente pueden tener un papel redundante en el control de la muerte celular, mientras que la ablación de ambos es una clara ventaja para la supervivencia de la célula. Sin embargo, incluso las células del doble KO son susceptibles a la apoptosis inducida mediante la vía extrínseca (Lindsten y col., 2000) y a la autofagia (Shimizu y

col., 2004), lo que explicaría porqué muchos de los órganos principales en este ratón son histológicamente normales.

La proteína Bax se localiza principalmente en el citosol (Hsu y col., 1997) mientras que Bak es constitutivamente mitocondrial (Griffiths y col., 1999), aunque como Bax, solo se inserta en la membrana tras su activación. Ambas contienen una cadena hidrofóbica de aminoácidos que es la que les permite insertarse en las membranas intracelulares, concretamente en la membrana mitocondrial externa y en la membrana del retículo endoplasmático. El mecanismo por el cual estas proteínas controlan la permeabilidad de la membrana es un tema en constante debate, aunque su oligomerización en la membrana mitocondrial externa (Gross y col., 1998) se correlaciona con la permeabilización de la misma y la salida de factores apoptogénicos al citoplasma (Mikhailov y col., 2003).

Diferentes estímulos pueden modificar los niveles de estas proteínas pro-apoptóticas multidominio. Por ejemplo, se ha observado un aumento en los niveles de expresión de Bak asociado a estrés oxidativo en células de neuroblastoma (Lovat y col., 2003). En cuanto a Bax, la inducción de su expresión es un componente importante en diferentes mecanismos de muerte celular durante procesos de isquemia y ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer (Krajewski y col., 1995; Hassouna y col., 1996; Paradis y col., 1996). Además de esta regulación transcripcional, se han descrito diferentes proteínas que impiden la localización o la oligomerización de las proteínas Bax y Bak en la mitocondria como por ejemplo Ku70 (Sawada y col., 2003), humanina (Guo y col., 2003) y VDAC2 (del inglés, *voltage-dependent anion channel 2*; Cheng y col., 2003). Sin embargo los supresores clásicos de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak son los miembros anti-apoptóticos de la familia. En condiciones normales, las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o Bcl-x_L están ancladas en las membranas de distintos orgánulos como la mitocondria y el retículo endoplasmático (Krajewski y col., 1993). Ambas proteínas pueden tener funciones redundantes, aún así el grado de inhibición de las vías de muerte celular mediado por Bcl-2 y por Bcl-x_L puede depender del tipo celular y del estímulo de muerte. Bcl-x_L parece más eficiente que Bcl-2 inhibiendo la pérdida del potencial de membrana de la mitocondria (Kim, 2005). Así pues, el ratón KO para Bcl-2 es viable aunque durante el desarrollo postnatal sufre una degeneración de las motoneuronas así como de las neuronas sensoriales (Michaelidis y col., 1996). En cambio, el ratón deficiente en Bcl-x_L es letal ya que muere sobre el día embrionario 13 (Motoyama y col., 1995).

Está demostrado que las proteínas pro-apoptóticas y las anti-apoptóticas pueden interactuar físicamente, oponiéndose mutuamente unas a otras (Oltvai y col., 1993), aunque el mecanismo por el cual esta interacción física de las proteínas anti-apoptóticas inhibe la función pro-apoptótica de las proteínas Bax y Bak aún no está bien definido. Existen estudios que demuestran que la unión de la proteína Bcl-2 a Bax en la mitocondria inhibe su oligomerización (Mikhailov y col., 2001), y una de las hipótesis propuestas sugiere que las proteínas pro-apoptóticas, una vez insertadas en las membranas, formarían polímeros que acabarían conectándose por sus extremos creando así una perturbación en la membrana que llevaría a su permeabilización. En este modelo, las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L, actuarían uniéndose a los extremos de estos polímeros impidiendo su expansión y su posterior conexión (Reed, 2006).

Además de los cambios a nivel de dimerización, las proteínas anti-apoptóticas pueden regularse por fosforilación dando lugar a una modulación de su función, bien provocando pérdida de su función anti-apoptótica (Srivastava y col., 1998), o por el contrario, incrementando su función protectora (Ruvolo y col., 1998). Estas proteínas anti-apoptóticas, bajo determinadas circunstancias donde su fenotipo se ha invertido, pueden incluso tener un papel como activadores de Bax y Bak. Esto es debido a cambios conformacionales que exponen sus dominios BH-3 normalmente ocultos. Por ejemplo, la proteólisis de Bcl-2 y Bcl-x_L por parte de las caspasas puede convertirlas en proteínas inductoras de muerte (Cheng y col., 1997).

La tercera subfamilia de proteínas, las que sólo presentan el dominio BH3, juega un papel esencial en la activación de las proteínas pro-apoptóticas multidominio para una inducción efectiva de la muerte celular. Estas proteínas funcionan como centinelas y son las encargadas de desencadenar la apoptosis en respuesta a estímulos durante el desarrollo o daños intracelulares (Huang y Strasser, 2000). El análisis de ratones KO para las diferentes proteínas solo-BH3 demuestran que, aunque entre ellas existe cierta redundancia funcional, cada proteína individual puede tener un papel fisiológico especializado (Bouillet y col., 1999; Yin y col., 1999). Es importante señalar que la activación de las proteínas solo-BH3 predispone a la célula a sufrir la apoptosis, pero no pueden ejecutarla en ausencia de los efectores Bax y Bak (Zong y col., 2001). El mecanismo concreto mediante el cual estas proteínas inducen la apoptosis está actualmente en debate. Diferentes estudios revelan que todas las proteínas solo-BH3 son capaces de unirse a proteínas anti-apoptóticas, aunque sólo determinadas parejas pueden asociarse dentro de la célula. Bim, Puma y Bid pueden

unirse a todas las proteínas anti-apoptóticas mientras que las otras presentan una mayor selectividad (Fig. 6; Chen y col., 2005; Willis y Adams, 2005).

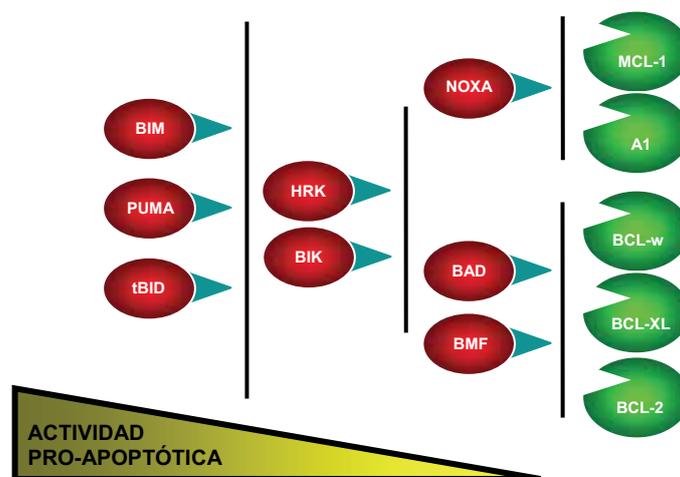


Figura 6.- Uniones selectivas de las proteínas solo-BH3
(fig. adaptada de Willis y Adams, 2005)

En cuanto a su unión con las proteínas pro-apoptóticas multidominio, una hipótesis que toma fuerza actualmente divide a las proteínas solo-BH3 en dos grupos (Fig. 7, modelo de unión directa): (1) Activadores directos (Bim y Bid), que son capaces de asociarse directamente a Bax y Bak activándolos y (2) sensibilizadores o represores (Bad, Bik, Bmf, Hrk/DP5, Noxa y Puma), que no pueden llevar a cabo esta unión directa (Letai y col., 2002). Este modelo propone que las proteínas anti-apoptóticas actuarían uniéndose a Bid y Bim (activadores directos) impidiendo la interacción directa de éstos con los efectores Bax y Bak. Mientras que la función de las proteínas solo-BH3 sensibilizadoras sería liberar a Bid y Bim de su unión con las proteínas pro-apoptóticas permitiendo así la activación de Bax y Bak.

Sin embargo, la unión directa de las proteínas solo-BH3 a las proteínas pro-apoptóticas multidominio es un tema polémico, mientras que su unión a las proteínas anti-apoptóticas está fuera de dudas (Chen y col., 2005). Estos datos favorecen un segundo modelo (Fig. 7, modelo de desplazamiento) en el que las proteínas Bax y Bak se mantienen inactivas mediante la unión de proteínas anti-apoptóticas. Las proteínas solo-BH3 pueden entonces unirse a las proteínas anti-apoptóticas desplazándolas de su unión con Bax y Bak, que una vez libres son activas para iniciar su oligomerización en las membranas (Willis y col., 2005). Cabe señalar que los datos más consistentes con el modelo de unión directa de las proteínas solo-BH3 provienen del estudio de Bax, mientras que en el modelo de desplazamiento, la mayoría de estudios se han

centrado en Bak, por lo que podrían representar diferentes mecanismos de activación para cada una de las proteínas pro-apoptóticas multiméricas (Willis y Adams, 2005).

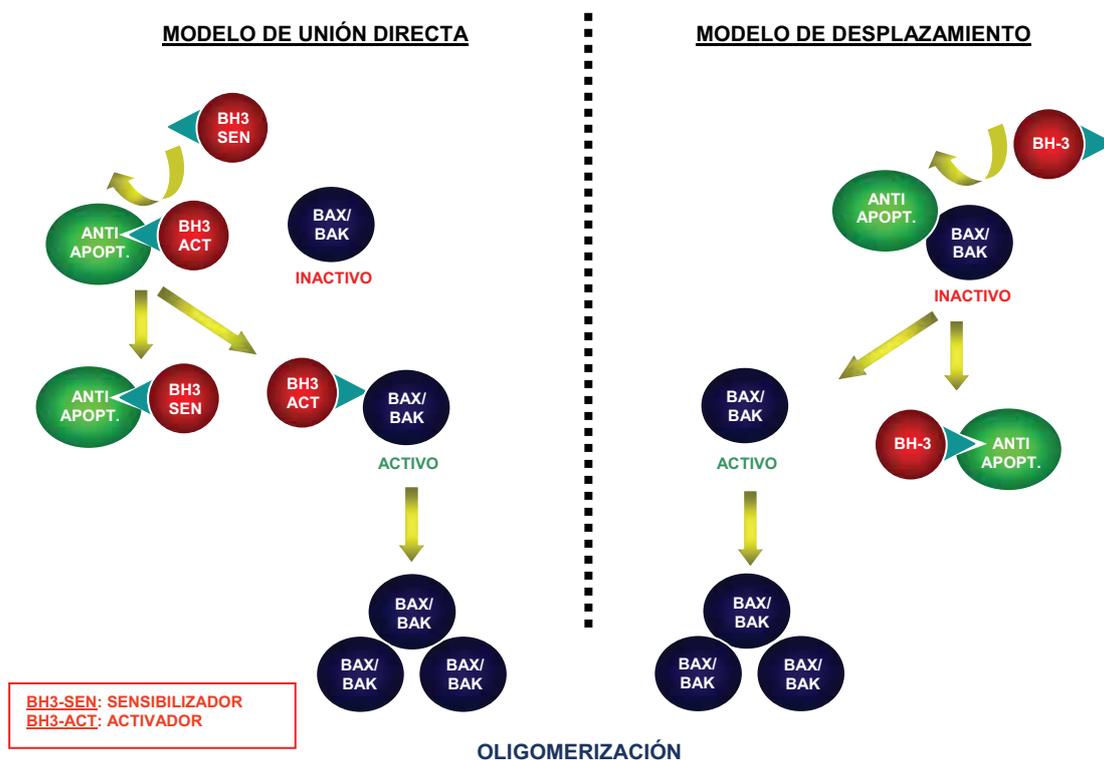


Figura 7.- Modelos de funcionamiento de las proteínas solo-BH3 (fig. adaptada de Willis y Adams, 2005)

La compleja regulación de las proteínas solo-BH3 permite un preciso control de la apoptosis. Se han descrito diferentes tipos de regulación, las proteínas Bim, Hrk/DP5, Noxa y Puma están sujetas a una regulación transcripcional. La expresión de Hrk/DP5 se induce en neuronas dañadas o bajo condiciones de estrés (Imaizumi y col., 1999). Noxa y Puma están bajo el control transcripcional de p53 (Oda y col., 2000; Yu y col., 2001). Y, por último, el control transcripcional de Bim parece ser complejo, ya que diversos grupos han descrito distintas formas de regulación, como la vía de JNK (Putcha y col., 2001), la vía de ERK/MAPK (del inglés, *extracellular signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase*) y de PI3-K (del inglés, *phosphoinositide 3-kinase*; Shinjyo y col., 2001; Reginato y col., 2003; Weston y col., 2003), así como el factor de transcripción forkhead 3 (FoxO3, Dijkers y col., 2000).

En cuanto a lo que se refiere a la regulación post-transcripcional, la proteína Bid requiere de su ruptura proteolítica para alcanzar su máxima actividad pro-apoptótica (Li y col., 1998; Luo y col., 1998). Mientras que las proteínas Bim, Bad y Bik pueden fosforilarse. La fosforilación de Bad permite su secuestro en el citoplasma mediante la unión a la chaperona 14-3-3 (Zha y col., 1996), mientras que la

fosforilación de Bik incrementa su actividad pro-apoptótica (Verma y col., 2001). La fosforilación de Bim parece ser un mecanismo más complejo que puede bloquear o inducir su actividad pro-apoptótica, por lo que lo discutiremos más detenidamente.

Por último, como un mecanismo distinto de regulación, algunas de estas proteínas pueden estar secuestradas por diferentes estructuras intracelulares. En determinados tipos celulares, Bim y Bmf se encuentran secuestrados en el citoesqueleto, Bim unida a la dineína (Puthalakath y col., 1999) y Bmf al complejo motor miosina V (Puthalakath y col., 2001). También se ha descrito que la proteína Bim puede encontrarse de manera constitutiva en la mitocondria, donde permanece inactiva mediante la unión a proteínas anti-apoptóticas (Zhu y col., 2004).

Es interesante destacar que de todas las proteínas solo-BH3, la unión directa y posterior activación de Bax y Bak sólo ha sido descrita para Bim y Bid. Existen tres isoformas de Bim que se sintetizan a partir del mismo transcrito (O'Connor y col., 1998), Bim_{EL} (del inglés, *extra-long*), Bim_L (del inglés, *long*), y Bim_S (del inglés, *short*), lo cual representa un nivel de regulación adicional a nivel de *splicing* de pre-RNA. Bim_S es el más efectivo induciendo la apoptosis y es normalmente el menos detectado. Bim_{EL} y Bim_L son menos efectivos que el anterior y ambos contienen el dominio de unión a dineína (O'Connor y col., 1998). Bim_{EL} es la isoforma más abundante y cumple una doble función, por un lado actúa como sensor evitando la fuerte actividad pro-apoptótica de Bim_S, y por otro, los dominios adicionales de su estructura ofrecen diferentes mecanismos de regulación post-transcripcional. En este sentido Bim_{EL} puede ser fosforilada por diferentes quinasas, mientras que la acción de JNK es capaz de potenciar la actividad pro-apoptótica de Bim_{EL} (Putcha y col., 2003), su fosforilación mediante la vía de ERK1/2 induce su degradación vía proteosoma (Ley y col., 2003; Luciano y col., 2003). Además, recientemente se ha descrito una nueva fosforilación mediante la vía de PI3K/Akt que promueve su unión a la chaperona 14-3-3 disminuyendo así su actividad pro-apoptótica (Qi y col., 2006). Esta proteína también puede ser regulada una vez que se ha inducido la activación de las caspasas. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que Bim_{EL} puede ser proteolizada en su extremo N-terminal por la caspasa-3. El fragmento generado posee una mayor afinidad por la proteína anti-apoptótica Bcl-2, induciendo así una mayor actividad pro-apoptótica (Chen y Zhou, 2004). Esta última regulación, dotaría a Bim_{EL} de un mecanismo general de retroalimentación para amplificar estímulos de muerte.

En cuanto a la proteína Bid, los primeros estudios demostraron que su sobre-expresión era capaz de inducir la apoptosis (Wang y col., 1996). Esta proteína está

normalmente localizada en el citoplasma, aunque puede encontrarse unida a membranas intracelulares debido a su capacidad intrínseca de interactuar con lípidos. La ruptura proteolítica de la proteína no es un requerimiento absoluto para su translocación a la mitocondria y su naturaleza pro-apoptótica. En este sentido, diferentes trabajos muestran como la proteína Bid endógena es capaz de translocar a la mitocondria e inducir muerte celular sin que exista proteólisis (Tafari y col., 2002; Sarig y col., 2003; Valentijn y Gilmore 2004). Sin embargo, el fragmento truncado de la proteína, tBid, es mucho más potente que la proteína completa en la activación de Bax o Bak (Luo y col., 1998; Li y col., 1998). Bid es considerada como el nexo fundamental entre la vía intrínseca y la extrínseca. La proteólisis de Bid fue inicialmente descrita bajo la acción de la caspasa-8 y fue considerada un mecanismo específico de la vía extrínseca de la apoptosis, sin embargo, estudios recientes muestran como Bid puede ser proteolizada de manera específica por otras proteasas como la Granzima B (Lord y col., 2003), calpainas (Chen y col., 2001; Mandic y col., 2002) y catepsinas (Cirman y col., 2004). Puede considerarse por tanto que esta proteína actúa como un centinela de diferentes estímulos dañinos que cursan con activación de proteasas. La proteína Bid tiene un papel crítico conectando estos estímulos a la mitocondria, permitiendo así que el proceso apoptótico avance, o bien, una vez iniciado, se amplifique (Yin, 2006).

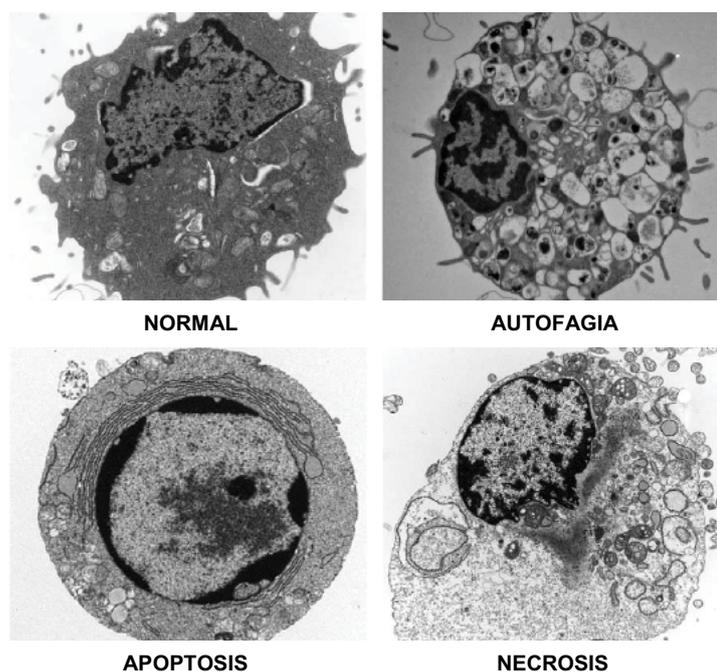
1.2.- MECANISMOS ALTERNATIVOS DE MUERTE CELULAR

Además de la apoptosis se han descrito modelos alternativos de muerte celular que pueden tener lugar de manera independiente a la activación de caspasas. Estas vías de muerte pueden activarse directamente en respuesta a agentes citotóxicos y estímulos concretos, y además suponen un importante mecanismo que protege al organismo frente a células potencialmente dañinas cuando los mecanismos dependientes de caspasas están bloqueados (Broker y col., 2005). Así, una vez que se recibe un estímulo dañino, la célula tiene acceso a diferentes programas de muerte que pueden ser ejecutados de manera dependiente o independiente de la activación de caspasas (Fig. 1). En este sentido, el tipo de muerte vendrá determinado por la velocidad relativa de los diferentes mecanismos disponibles, y sólo los más rápidos y efectivos se hacen finalmente evidentes (Bursch, 2001).

1.2.1.- NECROSIS

La necrosis se caracteriza morfológicamente por la vacuolización del citoplasma, la ruptura de la membrana plasmática y la inducción de una respuesta inflamatoria alrededor de la célula que está muriendo (Fig. 8; Proskuryakov y col.,

2002). Se han identificado células con una morfología necrótica en un amplio rango de estados patológicos tales como hipoxia e isquemia, también durante el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Martin, 2001). Además, estudios genéticos demuestran que la necrosis puede sustituir a la apoptosis en determinados procesos durante el desarrollo. En este sentido, el ratón doble KO para la caspasa-3 y la caspasa-9, aunque presenta severas malformaciones en el prosencéfalo, tiene un desarrollo normal de las neuronas de la medula espinal y del tronco encefálico (Oppenheim y col., 2001).



**Figura 8.- Morfología de los diferentes tipos de muerte celular
(Imágenes de Edinger y Thompson, 2004)**

Tradicionalmente se ha considerado la necrosis como un proceso pasivo e independiente del consumo de energía. Sin embargo, estudios recientes apuntan hacia la idea de que la muerte necrótica también puede regularse. La señal intracelular desencadenada por la unión de FADD al receptor de muerte Fas podría inducir un proceso necrótico (Okada y Mak, 2004). Además, el calcio, la ceramida y la activación de vías de estrés como JNK y p38 también juegan un papel importante como mediadores de la muerte necrótica (Proskuryakov y col., 2002). Sin embargo, el significado funcional de esta regulación en un contexto fisiológico no está muy definido (Edinger y Thompson, 2004). De hecho, todos estos mecanismos son componentes compartidos con el programa apoptótico, y aunque actualmente no está claro el mecanismo por el cual la célula determina continuar mediante una u otra vía de muerte, parece claro que la dimensión del daño mitocondrial inducido por los

diferentes estímulos es un factor determinante a la hora de tomar la decisión. En este sentido, es importante considerar que la necrosis es inducida en células que están sometidas a un severo estrés bioenergético (Edinger y Thompson, 2004).

Finalmente, en sus últimas fases, el proceso necrótico conduce a una activación de proteasas. En algunos modelos de muerte necrótica esta fase es ejecutada por caspasas, mientras que en otros la inhibición de caspasas no sólo no detiene la necrosis sino que favorece su ejecución (Hirsch y col., 1997). Así, otras proteasas están probablemente involucradas en la digestión durante la necrosis como las calpainas (Lankiewicz y col., 2000) y las catepsinas (Foghsgaard y col., 2001), aunque los sustratos concretos durante el proceso necrótico no están actualmente bien definidos (Proskuryakov y col., 2003).

1.2.2.- AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso lisosomal que constituye la vía principal mediante la cual la célula degrada orgánulos y proteínas de vida larga. Es un mecanismo muy conservado evolutivamente y ocurre virtualmente en todas las células eucariotas, desde las levaduras a los mamíferos (Levine y Klionsky, 2004). El proceso comienza con la compartimentalización de una región del citoplasma que contiene proteínas y organelas dentro del autofagosoma (Fig. 8), proceso controlado por una serie de genes regulados a su vez por la quinasa mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*). El contenido de este autofagosoma es posteriormente degradado mediante la fusión con un lisosoma o un endosoma tardío (Nixon, 2006). Los estudios en levaduras dejan fuera de dudas que la autofagia representa un mecanismo empleado por la célula para sobrevivir a una falta de nutrientes (Levine y Klionsky, 2004). En mamíferos, también parece funcionar como un mecanismo protector, y la autofagia juega un papel especialmente importante en el sistema nervioso adulto, protegiendo a las neuronas del daño oxidativo, de la síntesis de proteínas defectuosas y de otros estímulos tóxicos, genéticos o ambientales (Brunk y Terman, 2002).

El concepto de autofagia como mecanismo de defensa está en claro contraste con las evidencias de que la autofagia puede actuar como un mecanismo de muerte en determinadas circunstancias. En este sentido, diferentes estudios morfológicos han descrito un tipo de muerte programada de neuronas durante el desarrollo que cursa con una gran proliferación de vacuolas autofágicas y la progresiva desaparición de orgánulos, pero con una relativa integridad del citoesqueleto y el núcleo hasta etapas muy avanzadas del proceso (Schweichel y Merker, 1973; Hornung y col., 1989). En su

definición original, este tipo de muerte celular tendría lugar por una hiperactividad autofágica, que conllevaría la digestión de orgánulos y moléculas reguladoras esenciales, o bien un incremento en la degradación de factores inhibidores de muerte (Baehrecke, 2005). Sin embargo, parece más que probable que otras vías de muerte estén también activadas durante las últimas fases de esta muerte autofágica.

Una actividad defectuosa o ineficiente de la autofagia también puede llevar a una muerte celular, dado que sin la actividad protectora de este mecanismo, las células son más vulnerables a un mayor rango de estímulos tóxicos. Actualmente, esta muerte celular producida por una actividad autofágica ineficiente está tomando relevancia en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Nixon y col., 2005; Yu y col., 2005), la enfermedad de Parkinson (Anglade y col., 1997), y la enfermedad de Huntington (Ravikumar y col., 2005). En ellas es difícil de identificar el mecanismo por el cual la agregación de proteínas y la neurotoxicidad se desarrollan en etapas tardías de la vida. La autofagia disminuye considerablemente durante el desarrollo normal del individuo (Martinez-Vicente y col., 2005), por lo que una disminución de la eficiencia en la degradación de proteínas podría ser un componente importante en la muerte de neuronas que ocurre en las últimas etapas de estas enfermedades. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la ablación genética de la autofagia en ratones puede inducir neurodegeneración y acumulación de proteínas ubiquitinadas (Hara y col., 2006; Komatsu y col., 2006). Además, algunas de las mutaciones genéticas responsables de estas enfermedades neurodegenerativas afectan directamente a los sistemas proteolíticos encargados de la degradación de las formas mutadas de las proteínas, apoyando aún más la relevancia de la autofagia, en el proceso de neurodegeneración en estas enfermedades.

2.- PRINCIPALES VÍAS INTRACELULARES DE SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL

2.1.- VÍA AKT/PKB

La proteína serina/treonina quinasa AKT, también conocida como proteína quinasa B (PKB), fue inicialmente descrita por tres grupos diferentes, basándose en su homología a la proteína quinasa A (PKA; Coffey y Woodgett, 1991), a la proteína quinasa C (PKC; Jones y col., 1991a), y como un homólogo celular del oncogen retroviral akt (v-Akt; Bellacosa y col., 1991). En mamíferos han sido identificados tres genes AKT/PKB (Jones y col., 1991b; Cheng y col., 1992; Brodbeck y col., 1999), y

durante la última década se ha constituido como la pieza central de las vías de transducción en respuesta a factores tróficos e insulina. Su actividad contribuye a diferentes funciones celulares, incluyendo el metabolismo de nutrientes y la regulación de la transcripción, y además está considerada como el regulador esencial de la proliferación y la supervivencia celular (Brazil y Hemmings, 2001).

Las tres isoformas de la AKT están constituidas por una estructura conservada (Fig. 9) que se compone de un dominio amino-terminal denominado dominio de homología a pleckstrina (PH, del inglés *pleckstrin homology*), un dominio central, donde reside la actividad quinasa, y un dominio carboxi-terminal, que funciona como dominio regulador (Song y col., 2005). De las tres isoformas, AKT 1 es la más estudiada. La regulación de su actividad viene determinada por dos sitios de fosforilación dentro de su estructura, la treonina 308 (Thr308), que se localiza en el dominio quinasa, y la serina 473 (Ser473), que se encuentra en el dominio regulador. La fosforilación de la Thr308 activa parcialmente a AKT, mientras que la fosforilación de ambos sitios es requerida para una completa activación. En este sentido, una fosforilación exclusiva de la Ser473 tiene un efecto escaso en la actividad de AKT (Alessi y col., 1996).



Figura 9.- Estructura de Akt1
(fig. adaptada de Song y col., 2005)

La activación de AKT por factores tróficos depende de la proteína PI3-K (Burgering y Coffey, 1995; Franke y col., 1995; Kohn y col., 1995). Cuando el factor trófico se une específicamente a su receptor, la PI3-K es reclutada de las proximidades de la membrana plasmática. Tras su activación, la subunidad catalítica de la PI3-K fosforila el glicerofosfolípido de membrana PI(4,5)P₂ (del inglés *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) produciendo los fosfoinosítoles fosfato PIP₃ (del inglés *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) y PIP₂ (del inglés *phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate*) en la membrana citoplasmática interna (Chong y col., 2005). PIP₃ actúa como segundo mensajero, y sus niveles están regulados de forma precisa por la acción de fosfatasa como la PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*; Simpson y Parsons, 2001). AKT no es activada directamente por PIP₃, pero es reclutada a la membrana plasmática debido a la alta afinidad de su dominio PH hacia el fosfoinosítole fosfato, una vez en la membrana se altera su conformación lo que permite su posterior fosforilación (Andjelkovic y col., 1997).

La fosforilación de AKT en la Thr308 depende de la actividad de la quinasa PDK1 (del inglés, *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*; Alessi y col., 1997; Stokoe y col., 1997). La quinasa PDK1 es una serina/treonina que contiene un dominio PH en su extremo C-terminal. PIP₃ y la co-localización de AKT con PDK1 son elementos necesarios para la fosforilación de la Thr308 (Andjelkovic y col., 1997; Anderson y col., 1998).

El mecanismo de fosforilación de la Ser473 no está completamente descrito. Desde que se describió que esta fosforilación era dependiente de PI3-K, se asumió que PDK1 era también la responsable de esta fosforilación (Balendran y col., 1999). Sin embargo, trabajos en el ratón KO para PDK1 y en sistemas con sobre-expresión de la misma indican que PDK1 puede contribuir indirectamente en el proceso, pero no es la responsable directa de la fosforilación (Williams y col., 2000; Hill y col., 2001). Distintos grupos han implicado a diferentes proteínas en este proceso, como la quinasa ILK (del inglés, *integrin-linked kinase*) (Persad y col., 2001), el complejo rictor-mTOR (Sarbasov y col., 2005) o la AKT por sí misma mediante un proceso de auto-fosforilación (Toker y Newton, 2000). En este sentido, el mecanismo de fosforilación de la Ser473 continúa actualmente en debate (Bayascas y Alessi, 2005).

Diferentes estudios sugieren que la proteína AKT puede ser activada de manera independiente a PI3-K, aunque el significado de dicha activación está actualmente por determinar. En este sentido, se ha descrito que agentes como la forskolina, que aumentan la concentración de AMPc en la célula, pueden activar a AKT mediante PKA (Sable y col., 1997; Filippa y col., 1999).

Además de por su fosforilación, en los últimos años se han identificado diferentes proteínas que pueden unirse a AKT regulando su actividad (Song y col., 2005). Entre los reguladores positivos cabe destacar a la familia de las Hsp (del inglés *heat shock proteins*). Estas proteínas son inducidas en la célula en respuesta a estrés y actúan como chaperonas promoviendo la estabilización y el plegamiento de determinadas proteínas. Hsp27 puede asociarse a la proteína AKT activándola en respuesta a condiciones de estrés celular y choque térmico (Konishi y col., 1997). La regulación de AKT mediante la asociación a Hsp27 puede incluso inhibir la apoptosis en neutrófilos (Rane y col., 2003). Otro de los miembros de esta familia, la Hsp90, ha sido descrita como chaperona de diferentes proteínas quinasas, y más concretamente, su inhibición, ha sido descrita como causa de la degradación de AKT (Solit y col., 2003).

La activación final de la vía de AKT dota a las células de una señal de supervivencia que les permite hacer frente a diferentes estímulos apoptóticos (Fig. 10; Yao y Cooper, 1995). Sus efectos anti-apoptóticos pueden ser debidos a tres mecanismos distintos: (1) Regulación directa de la vía apoptótica, (2) control transcripcional de la supervivencia celular y (3) regulación del metabolismo celular (Song y col., 2005).

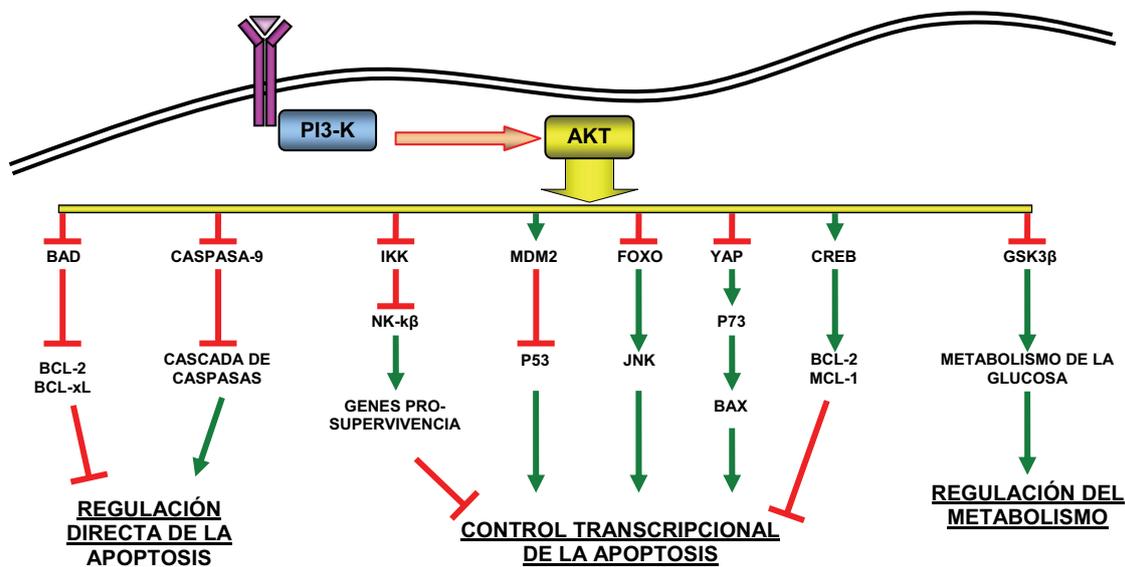


Figura 10.- Mecanismos de supervivencia celular mediados por AKT/PKB (fig. adaptada de Song y col., 2005)

En lo que respecta a la regulación directa (1), AKT puede fosforilar diferentes miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 como Bad (Datta y col., 1997) y Bim (Qi y col., 2006). Una vez fosforiladas por AKT, se produce su unión a las chaperonas 14-3-3 en el citoplasma con lo que se inactiva su función pro-apoptótica. Otros efectos directos sobre la vía apoptótica conllevan la inactivación por fosforilación de la caspasa-9 (Cardone y col., 1998), o la regulación negativa de SAPK/JNK (Paradis y Ruvkun, 1998; Kim y col., 2001; Barthwal y col., 2003).

Respecto al control transcripcional (2), AKT puede fosforilar diferentes factores de transcripción modulando así su actividad. La fosforilación de la familia de factores de transcripción FoxO, entre cuyas funciones se encuentra la inducción de la apoptosis, provoca una redistribución celular de estos factores desde el núcleo al citoplasma causando una inhibición de su actividad (Brunet y col., 1999). La inactivación mediante la fosforilación por AKT sobre los factores pro-apoptóticos p53 y p73 también ha sido descrita. Esta regulación ocurre de manera indirecta, mediante la fosforilación de las proteínas Mdm2 (del inglés *Murine double minute 2*), en el caso de p53 (Gottlieb y col., 2002), y de la proteína YAP (del inglés *yes-associated protein*), en

el caso de p73 (Basu y col., 2003). A diferencia de los anteriores, la fosforilación de AKT sobre los factores CREB (del inglés *cyclin AMP-response element binding protein*) y NF- κ B puede inducir la expresión de diferentes genes anti-apoptóticos (Barkett y Gilmore, 1999; Wang y col., 1999). La fosforilación mediante AKT induce un aumento en la expresión de ambos factores de transcripción, actuando directamente sobre CREB (Du y Montminy, 1998), e indirectamente sobre NF- κ B, inhibiendo a la quinasa I κ B que lo regula negativamente (Kane y col., 1999).

Por último, los efectos de AKT sobre la supervivencia celular podrían estar relacionados con sus efectos sobre el metabolismo (3). AKT es capaz de fosforilar e inhibir a la enzima GSK3 β (del inglés *glycogen synthase kinase 3 beta*) promoviendo la acumulación de glucógeno (Cross y col., 1995). Esta inhibición de GSK3 β es capaz además de inhibir la apoptosis en numerosas circunstancias, aunque el mecanismo concreto es actualmente desconocido (Pap y Cooper, 1998).

La activación de la vía de PI3-K/AKT por factores tróficos y sus efectos sobre la supervivencia se han demostrado en varias poblaciones neuronales, como las neuronas estriatales (Stroppolo y col., 2001; Perkinson y col., 2002; Gavalda y col., 2004), neuronas corticales (Yamada y col., 1997, 2001; Hetman y col., 1999), células granulares de cerebelo (Nonomura y col., 1996), neuronas simpáticas (Creedon y col., 1997; Vaillant y col., 1999), neuronas hipocámpales (Righi y col., 2000), y motoneuronas (Dolcet y col., 1999; Soler y col., 1999; Nishimune y col., 2000). Además, en el sistema nervioso, AKT se induce sustancialmente en respuesta a estrés celular. En este sentido se han observado cambios en la fosforilación de AKT tras estímulos agudos como la isquemia cerebral o una lesión de los axones de las motoneuronas (Jin y col., 2000; Sakurai y col., 2001), así como en procesos crónicos como la esclerosis lateral amiotrófica (Wagey y col., 1998), la corea de Huntington (Humbert y col., 2002; Gines y col., 2003b) o la enfermedad de Alzheimer (Zubenko y col., 1999).

Además de la implicación de la vía de señalización PI3-K/AKT en la supervivencia neuronal, también se ha demostrado que puede tener un papel importante en fenómenos de diferenciación como la extensión neurítica, o la elongación y ramificación axonal (Markus y col., 2002; Gavalda y col., 2004; Dijkhuizen y Ghosh, 2005).

2.2.- VÍA ERK/MAPK

La vía de ERK/MAPK forma parte de la familia de las MAPKs junto a otras dos subfamilias, la vía de SAPK/JNK y la vía de p38 (Schaeffer y Weber, 1999). Esta vía es una de las más conservadas a lo largo de la evolución y, a diferencia de las otras dos subfamilias que son principalmente inductoras de apoptosis (Xia y col., 1995), está implicada en el control de diferentes procesos celulares fundamentales, incluyendo proliferación celular, supervivencia, diferenciación y metabolismo (O'Neill y Kolch, 2004; Wellbrock y col., 2004).

La vía de ERK/MAPK más caracterizada es la cascada de Ras-Raf-MEK (del inglés *MAPK and ERK kinase*)-ERK/MAPK. Diferentes receptores anclados en la membrana, como los específicos para factores tróficos, inducen la activación de Ras, una proteína con actividad GTP-asa que se une y recluta de forma específica a las quinasas Raf hacia la membrana celular para su posterior activación (Fig. 11).

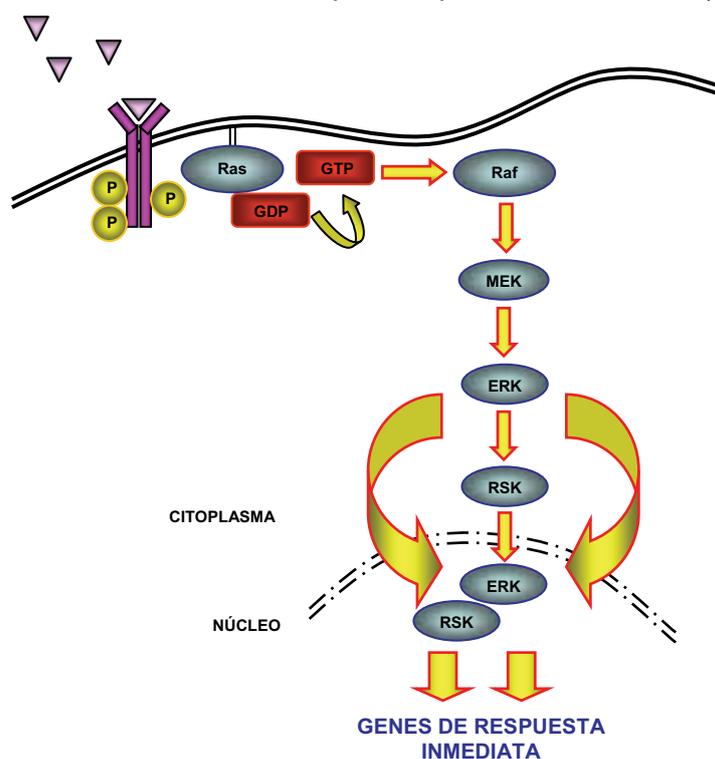


Figura 11.- Activación de la vía ERK/MAPK
(fig. adaptada de Murphy y Blenis, 2006)

Se han descrito tres isoformas de Raf, A-Raf, B-Raf y Raf-1 (O'Neill y Kolch, 2004) pero el mecanismo exacto por el que Raf se activa no está totalmente descrito, aunque se sabe que requiere de la unión a Ras y de diferentes fosforilaciones en la membrana (Chong y col, 2003). Una vez que Raf se activa desencadena una triple cascada de proteínas quinasas característica de todas las MAPK, en la que Raf activa a las quinasas MEK1 y MEK2 que son las encargadas de fosforilar y activar a

ERK/MAPK (Kolch, 2005). La vía comprende la fosforilación de ERK1 y ERK2 (ERK1/2), también llamadas p42 y p44 (p42/p44 MAPK). Este sistema de triple cascada de quinasa dota al sistema de una gran amplificación de la señal inicial. Una vez se fosforila en los sitios Thr²⁰² y Tyr²⁰⁴, una gran proporción de ERK1/2 se acumula en el núcleo (Chen y col., 1992; Gonzalez y col., 1993; Lenormand y col., 1993) donde regula la transcripción de varios genes dando lugar a una respuesta inmediata (Fig. 11). Se ha observado que c-Jun, c-Fos, c-Myc, c-Myb, Elk y CREB son sustratos fosforilables por la vía de ERK/MAPK (Davis, 1995; Gille y col., 1995; Grewal y col., 1999; Vanhoutte y col., 1999). Aparte de ser translocada al núcleo, también se han identificado sustratos de ERK/MAPK asociados a membranas y a diferentes componentes del citoesqueleto en el citoplasma (Roux y Blenis, 2004). Uno de los sustratos de ERK1/2 son las proteínas quinasas RSKs (del inglés *p90 ribosomal S6 kinases*), las cuales, una vez fosforiladas, pueden también translocar al núcleo participando en la fosforilación de los factores de transcripción junto a ERK1/2 y a las isoformas nucleares de RSKs (Fig. 11; Bonni y col., 1999; Bruning y col., 2000).

Diferentes proteínas pueden interaccionar con los miembros de la cascada de ERK/MAPK induciendo bien una estimulación o bien una inhibición de su actividad (Kolch, 2005). Además, existe una familia de fosfatasa, las MKPs (del inglés *MAPK phosphatases*), que pueden unirse directamente a ERK1/2 defosforilando los residuos Thr y Tyr (Tonks y Neel, 2001).

La duración de la estimulación de la vía de ERK/MAPK puede regular el efecto que tendrá lugar tras la activación. Por ejemplo, una activación sostenida en el tiempo puede dar lugar a procesos de diferenciación que no ocurren tras una activación transitoria (Marshall, 1995). Diferentes estudios presentan un modelo en el que los productos de algunos de los genes de respuesta inmediata pueden actuar como sensores de la intensidad y la duración de la señal (Murphy y col., 2002, 2004). Por ejemplo, c-Fos, tras ser inducida su síntesis, puede además ser fosforilado por ERK1/2 y las RSKs (Chen y col., 1993). Su fosforilación aumenta su estabilidad y promueve más fosforilaciones incrementando sus efectos (Chen y col., 1996). Esta hiperfosforilación de c-Fos sólo se produce si la activación de ERK1/2 y las RSKs se mantiene en el tiempo (Murphy y col., 2004). Sin embargo, si la señal es transitoria, los productos de estos genes de respuesta inmediata son inestables y son degradados por el proteosoma. Además, otros ejemplos muestran la importancia del receptor a través del cual se activa la vía y de los tipos celulares específicos (Stanciu y col., 2000; Zhu y col., 2005), por lo que la respuesta final a la activación de ERK/MAPK parece

variar con la duración del estímulo, la naturaleza del mismo y los diferentes tipos celulares.

La vía de la ERK/MAPK puede regularse también por neurotransmisores. Se ha observado un incremento en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la estimulación glutamatergica (Wang y col., 2004). Los agonistas del receptor NMDA (del inglés *N-methyl-D-aspartate*) activan la vía de la ERK/MAPK (Sgambato y col., 1998; Mao y col., 2004) probablemente a través de un mecanismo que implica una serie de quinasas sensibles al calcio (Perkinton y col., 1999, 2002). También se ha observado una activación de esta vía cuando se estimulan los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I y V, aunque esta activación está menos caracterizada (Vanhoutte y col., 1999; Thandi y col., 2002; Yang y col., 2004).

Varios estudios demuestran que la activación de la vía ERK/MAPK regula la supervivencia celular (Parrizas y col., 1997; Feng y col., 1999; Hetman y col., 1999; Chaib-Oukadour y col., 2004). Entre otras funciones, esta quinasa puede fosforilar directamente a proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bad (Scheid y col., 1999) y Bim_{EL} (Biswas y Greene, 2002), inhibiendo su actividad. También se ha descrito que su activación participa en fenómenos de neuroprotección por factores tróficos (Hetman y col., 1999; Han y Holtzman, 2000; Rossler y col., 2004; Wu y col., 2004; Leeds y col., 2005). Además de la regulación de la supervivencia neuronal, la vía de ERK/MAPK aparece también implicada en fenómenos de diferenciación neuronal (Perron y Bixby, 1999; Atwal y col., 2000; Gavalda y col., 2004; Soler y col., 2004). Diferentes trabajos implican la actividad de esta vía en la regulación de la síntesis de proteínas en dendritas (Yin y col., 2002; Ehlers, 2003) y en la formación y estabilización de espinas dendríticas (Wu y col., 2001; Goldin y Segal, 2003). Por último, estudios recientes en modelos transgénicos, implican a la vía de ERK/MAPK en la regulación de la translación de proteínas requeridas para el LTP (del inglés *long term potentiation*) y la formación de la memoria *in vivo* (Giovannini y col., 2001; Kelleher y col., 2004).

En claro contraste con sus efectos beneficiosos para distintas poblaciones neuronales, también se ha descrito su implicación en procesos de muerte neuronal (Murray y col., 1998; de Bernardo y col., 2004). Este papel se ha extendido a varios modelos de neurodegeneración como modelos de enfermedad de Alzheimer (Perry y col., 1999; Rapoport y Ferreira, 2000), modelos de enfermedad de Parkinson (Kulich y Chu, 2001; Gómez-Santos y col., 2002) y modelos de demencia con cuerpos de Lewy (Zhu y col., 2002). En este sentido, la vía de ERK/MAPK podría estar relacionada con

programas de muerte independientes de caspasas en las neuronas (Subramaniam y col., 2004), pero los detalles de esta activación y la posible relación de la vía con otros efectores de este tipo de muerte no están establecidos.

3.- FACTORES NEUROTROFICOS

Los factores neurotróficos son proteínas que promueven la supervivencia y la diferenciación de ciertas poblaciones neuronales, regulan el proceso de formación y establecimiento de las conexiones sinápticas, y además, regulan la expresión génica a través de su interacción con receptores celulares específicos (Huang y Reichardt, 2001). Los factores neurotróficos juegan un papel muy importante durante el desarrollo, controlando el proceso de muerte celular programada y regulando el número final de neuronas y conexiones del sistema nervioso.

La teoría trófica propone que, durante el desarrollo, las neuronas tienen que competir por concentraciones limitantes de factores tróficos secretados por el tejido diana (Purves y col., 1988). Las neuronas que consigan obtener las concentraciones suficientes y adecuadas de factores tróficos serán las que sobrevivan, mientras que las que no alcancen dichas cantidades morirán mediante muerte celular programada (Thoenen y col., 1987; Altman, 1992). Además de actuar como factores derivados de la diana por un mecanismo retrógrado, los factores tróficos también pueden actuar mediante un mecanismo autocrino, en el que la misma célula que expresa receptores para dichos factores en su membrana plasmática sintetiza los factores tróficos (Kokaia y col., 1993; Miranda y col., 1993), o bien paracrinos, en el que la célula que secreta el factor trófico está próxima a la célula receptora (Davies, 1996). Por último, también se ha descrito un mecanismo anterógrado de acción, a través del cual la neurona postsináptica recibe los factores tróficos de la neurona presináptica (Fig. 12; von Bartheld y col., 1996; Altar y col., 1997).

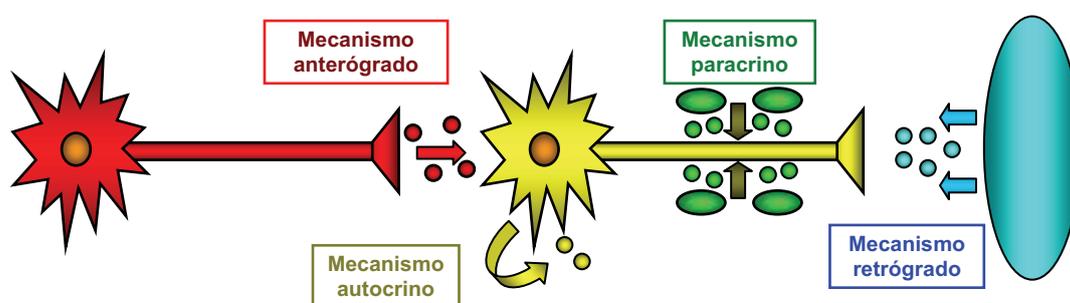


Figura 12.- Mecanismos de acción de los factores tróficos

La presencia de factores tróficos también es requerida durante la etapa adulta para el mantenimiento de una correcta función y fenotipo neuronal (Sofroniew y col., 1990; Conner y Varon, 1996; Cooper y col., 1996). Las alteraciones en los niveles de factores neurotróficos tienen efecto sobre una amplia variedad de fenómenos en los que se incluye la mielinización, el dolor, la agresividad, la depresión y el abuso de drogas (Chao, 2003). Además, diferentes estudios demuestran que los factores neurotróficos pueden proteger a las neuronas frente a estímulos de muerte. Estos efectos neuroprotectores han sido demostrados en numerosos modelos animales de trastornos neurológicos como la isquemia (Holtzman y col., 1996), la enfermedad de Alzheimer (Fisher y col., 1987; Hefti, 1994), la enfermedad de Parkinson (Akerud y col., 1999; Alexi y col., 2000; Kordower y col., 2000) y la enfermedad de Huntington (Alexi y col., 2000; Alberch y col., 2002).

Se ha descrito una gran variedad de familias de factores tróficos con distintas funciones: (1) la familia de las neurotrofinas; (2) la familia de las citoquinas, dentro de la cual destacan el CNTF (del inglés, *Ciliary neurotrophic factor*), el LIF (del inglés, *Leukaemia-inhibitory factor*) y la interleuquina-6; y (3), la superfamilia del TGF- β (del inglés, *Transforming growth factor- β*), que engloba a la familia del TGF- β , a la familia del GDNF (del inglés, *Glial cell line-derived neurotrophic factor*), a la familia de las BMP (del inglés, *Bone morphogenetic proteins*) y a la familia de las activinas. Cada grupo de factores tróficos realizará sus efectos a través de receptores diferentes y específicos. En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de los efectos neuroprotectores del miembro de la familia de las neurotrofinas, BDNF (del inglés, *Brain-derived Neurotrophic Factor*), así como de la regulación de los diferentes efectos del GDNF sobre las neuronas estriatales.

3.1.- FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS

Las neurotrofinas son la familia de factores tróficos mejor estudiada. Está compuesta por NGF (del inglés, *Nerve Growth Factor*), BDNF, NT-3 y NT-4/5 (del inglés, *neurotrophin-3* y *neurotrophin-4/5*, respectivamente).

El NGF fue el primer miembro de la familia de las neurotrofinas que se descubrió por sus efectos sobre la extensión neurítica y la supervivencia de las neuronas simpáticas y sensoriales en cultivo (Levi-Montalcini y Angeletti, 1968). Años más tarde se aisló (Barde y col., 1982) y se clonó (Leibrock y col., 1989) el BDNF. Mediante la homología entre las secuencias del BDNF y del NGF se identificaron la NT-3 y la NT-4/5, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Ernfors y col.,

1990; Hohn y col., 1990; Maisonpierre y col., 1990). En un principio, NT-4 y NT-5 se consideraron factores de crecimiento distintos (Berkemeier y col., 1991; Hallbook y col., 1991), pero posteriormente se observó que eran homólogos de un mismo factor que se expresaba en especies animales diferentes (Ip y col., 1992).

Las neurotrofinas son inicialmente sintetizadas como precursores o pro-neurotrofinas, las cuales deben ser proteolizadas para obtener las neurotrofinas maduras (Mowla y col., 2001). Su actuación sobre las células puede hacerse mediante la unión a dos tipos de receptores de membrana, el receptor $p75^{\text{NTR}}$ (del inglés, *p75 neurotrophin receptor*), y los receptores Trk (del inglés, *Tropomyosin-related kinase*), de la familia tirosina quinasa. Estos receptores suelen presentarse en la misma célula coordinando y modulando la respuesta de las neuronas a las neurotrofinas (Miller y Kaplan, 2001). Las diferentes neurotrofinas se unen de manera específica a los diferentes receptores Trk: NGF se une preferentemente a TrkA, BDNF y NT-4/5 a TrkB, y NT-3 a TrkC (Fig. 13); si bien, también se han descrito interacciones de menor afinidad (Chao, 2003). En cuanto al receptor $p75^{\text{NTR}}$, se ha observado que puede unir a todas las neurotrofinas con igual afinidad.

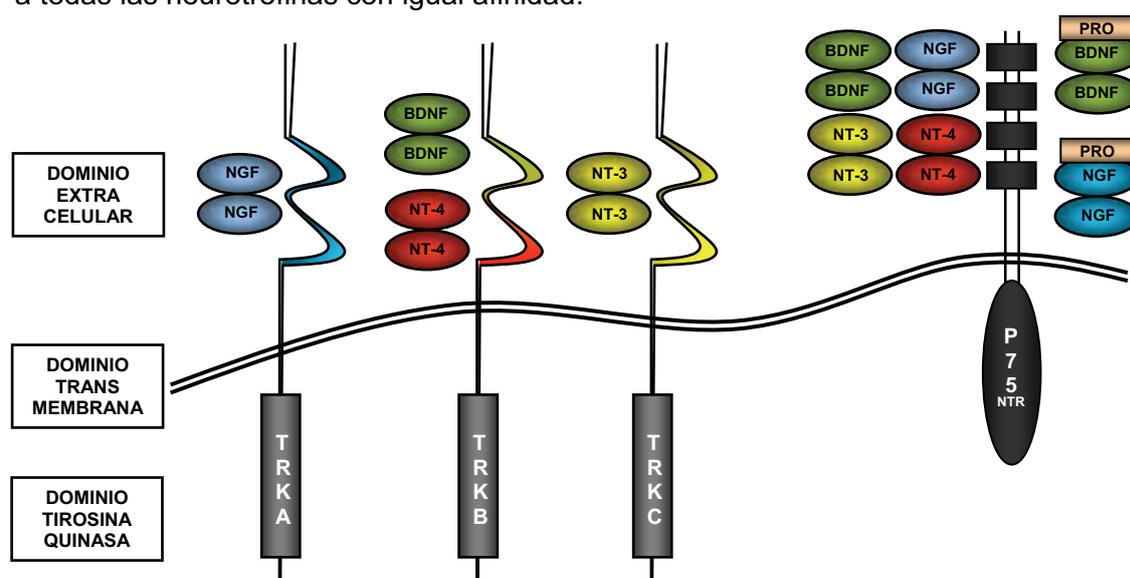


Figura 13.- Familia de las neurotrofinas y sus receptores

Los receptores Trk y $p75^{\text{NTR}}$ señalizan de manera independiente. Los receptores Trk son proteínas transmembrana cuya actividad tirosina quinasa intrínseca es sensible a la unión del ligando. La parte extracelular es la que permite la unión específica a las distintas neurotrofinas y además previene de una incontrolada auto-activación del receptor (Arevalo y col., 2001). La unión del ligando produce la oligomerización de estos receptores induciendo una fosforilación recíproca, además, la dimerización inducida por las neurotrofinas provoca también una auto-

transfosforilación del receptor. Como resultado, se generan una serie de residuos fosforilados en el dominio tirosina quinasa intracelular que son utilizados por proteínas adaptadoras para activar las vías de señalización intracelulares (Benito-Gutierrez y col., 2006). Cabe destacar que se puede dar *splicing* diferencial del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de los receptores Trk, lo que produce la expresión de proteínas con diferencias en sus dominios extracelulares que afectan a las interacciones con sus ligandos (Barbacid, 1994). Además, el *splicing* diferencial también puede afectar a los exones que codifican para los dominios tirosina quinasa, que son los determinantes para la respuesta de las neurotrofinas, generando formas truncadas de los receptores, siendo sólo el TrkB y el TrkC los que presentan variantes truncadas del receptor (Barbacid, 1994). Las formas truncadas del receptor se expresan tanto en células neuronales como en células gliales, y por el contrario, sólo las neuronas expresan el receptor con todos sus dominios. En las células no neuronales las formas truncadas actuarían reclutando y presentando la neurotrofina a las neuronas. En cambio, en las neuronas, en un principio se pensó que las formas truncadas eran las responsables de la captación de dicha neurotrofina, actuando como inhibidoras de las isoformas tirosina quinasa y atenuando la respuesta de la neurotrofina (Eide y col., 1996). Sin embargo, en los últimos años se les han atribuido también algunas funciones asociadas a la forma completa del receptor (Ichinose y Snider, 2000; Yacoubian y Lo, 2000).

Entre las vías de señalización activadas por receptores Trk en respuesta a neurotrofinas, la vía de MAPK, la de AKT y la de PKC (del inglés *PLCγ-protein kinase C*), son las más estudiadas (Fig. 14). El adaptador mejor caracterizado para los receptores Trk es la proteína Shc (del inglés *Src homologous and collagen-like*). Una vez reclutada por el receptor Trk activado, Shc se asocia a otros dos adaptadores, Grb2 (del inglés, *growth factor receptor bound protein 2*) y Gab1 (del inglés, *GRB2-associated binding protein 1*) para activar a PI3K y consiguientemente a AKT/PKB. La supervivencia neuronal mediada por NGF en células PC12 requiere de la unión de PI3K a Gab1 (Holgado-Madruga y col., 1997). Mediante la unión a otra combinación de adaptadores, Grb2 y SOS, Shc es capaz de inducir la activación de la proteína Ras con el consiguiente efecto sobre la activación de ERK/MAPK. La activación de Ras mediante esta vía promueve una activación transitoria de ERK/MAPK (Marshall, 1995), pero las neurotrofinas estimulan también una activación prolongada de ERK/MAPK mediante una vía que implica a los adaptadores CrkII/CrkL, C3G, Rap1 y B-Raf (York y col., 1998) y una internalización del receptor Trk (York y col., 2000; Wu y col., 2001). Por último, los receptores Trk pueden también reclutar y activar a PLC-γ (del inglés

phospholipase C-γ), este proceso conduce a la activación de PKC que actúa sobre la vía de ERK1 mediante la proteína Raf (Corbit y col., 1999).

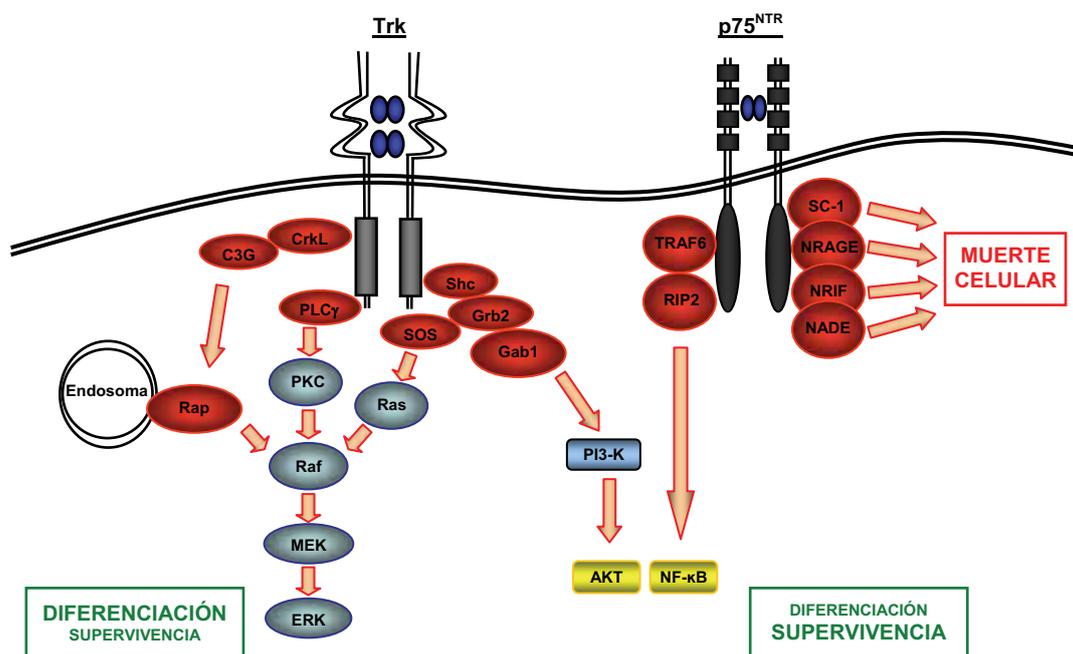


Figura 14.- Vías de señalización intracelular de los receptores de neurotrofinas

Una regulación adicional de la señalización mediada por las neurotrofinas es la que se denomina transporte retrógrado. Las señales activadas por las neurotrofinas en los terminales de las neuronas deben ser enviadas hasta el soma para inducir los efectos pertinentes. Se ha propuesto un mecanismo de transporte retrógrado en el que los receptores activados viajan en vesículas endocíticas para transmitir la señal (Grimes y col., 1996). De esta forma, mediante una combinación específica de la fosforilación de residuos de los receptores Trk, el reclutamiento de unos u otros adaptadores y la regulación del tráfico de receptores en la membrana, las diferentes neurotrofinas pueden inducir respuestas fisiológicas individuales.

En cuanto al receptor p75^{NTR}, su activación ha sido implicada tanto en efectos de supervivencia y arborización, como en procesos inductores de apoptosis (Lee y col., 2001; Cosgaya y col., 2002; Du y col., 2006). Puede actuar como co-receptor junto a los receptores Trk, en este sentido la interacción entre ambos receptores puede incrementar la afinidad hacia el ligando específico, impidiendo uniones de menor afinidad (Bibel y col., 1999). Además, se ha descrito recientemente que p75^{NTR} puede actuar como receptor de alta afinidad para las pro-neurotrofinas (Lee y col., 2001). La falta de una actividad catalítica intrínseca en su dominio intracelular sugiere que la señalización a través de p75^{NTR} es llevada a cabo por proteínas adaptadoras que pueden estar bien asociadas a él de forma constitutiva, o que son reclutadas en

respuesta a la activación por neurotrofinas (Fig. 14). Los efectos pro-apoptóticos mediados por $p75^{\text{NTR}}$ dependen de la regulación de diferentes adaptadores como TRAF6 (del inglés *TNF receptor-associated factor-6*), NRIF (del inglés *neurotrophin receptor interacting factor*), NRAGE (del inglés *neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog*), NADE (del inglés *p75^{NTR}-associated cell death executor*) y SC-1 (del inglés Schwann cell-1). Mientras que una importante vía de supervivencia que implica la activación de la vía de NF- κ B necesita de otra serie de adaptadores como TRAF6, p62, IRAK (del inglés *interleukin-1 receptor-associated kinase*) y RIP2 (del inglés *receptor-interacting protein-2*) (Arevalo y Wu, 2006).

De cualquier modo, aunque se han descrito muchas funciones para $p75^{\text{NTR}}$, los últimos trabajos que demuestran su potente activación por pro-neurotrofinas (Lee y col., 2001), su unión con la proteína *sortilin* mediante la que induce apoptosis (Nykjaer y col., 2004) y el reciente interés por su regulación mediante la proteólisis en membrana (DiStefano y Jonson, 1988; Jung y col., 2003) dejan a $p75^{\text{NTR}}$ en el centro de un debate abierto acerca de los mecanismos de regulación de sus múltiples funciones.

3.2.- FAMILIA DEL GDNF

El GDNF fue purificado y caracterizado en 1993 como un factor de crecimiento que promovía la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Lin y col., 1993). Tras este primer efecto, se observó que podía actuar como un potente factor trófico sobre motoneuronas (Henderson y col., 1994) y neuronas noradrenérgicas (Arenas y col., 1995). Los otros miembros de la familia son neurturina (Kotzbauer y col., 1996), artemina (Baloh y col., 1998b) y persefina (Milbrandt y col., 1998), y junto con el GDNF, son los encargados del mantenimiento de diferentes poblaciones neuronales, así como de promover su supervivencia y regular su diferenciación (Airaksinen y Saarma, 2002).

Los efectos de los miembros de la familia de GDNF están mediados por un complejo de receptores que consiste en un receptor tirosina quinasa denominado RET (del inglés, *receptor tyrosine kinase proto-oncogene*; Jing y col., 1996; Treanor y col., 1996; Trupp y col., 1996), y un segundo receptor denominado receptor α ($\text{GFR}\alpha$, del inglés *GDNF family receptor alpha*). Los receptores α carecen de dominio intracelular y están anclados en la membrana mediante un dominio GPI (del inglés *glycosyl-phosphatidylinositol*). Todos los miembros de la familia comparten a RET como un receptor común en su señalización. Sin embargo, la especificidad de unión al ligando

del complejo de receptores viene dada por los receptores $GFR\alpha$ (Fig. 15). Se han descrito cuatro $GFR\alpha$ diferentes, GDNF se une específicamente a $GFR\alpha1$ (Jing y col., 1996; Treanor y col., 1996), neurturina a $GFR\alpha2$ (Baloh y col., 1997; Buj-Bello y col., 1997), artemina a $GFR\alpha3$ (Baloh y col., 1998a; Masure y col., 1998), y persefina a $GFR\alpha4$ (Enokido y col., 1998; Masure y col., 2000).

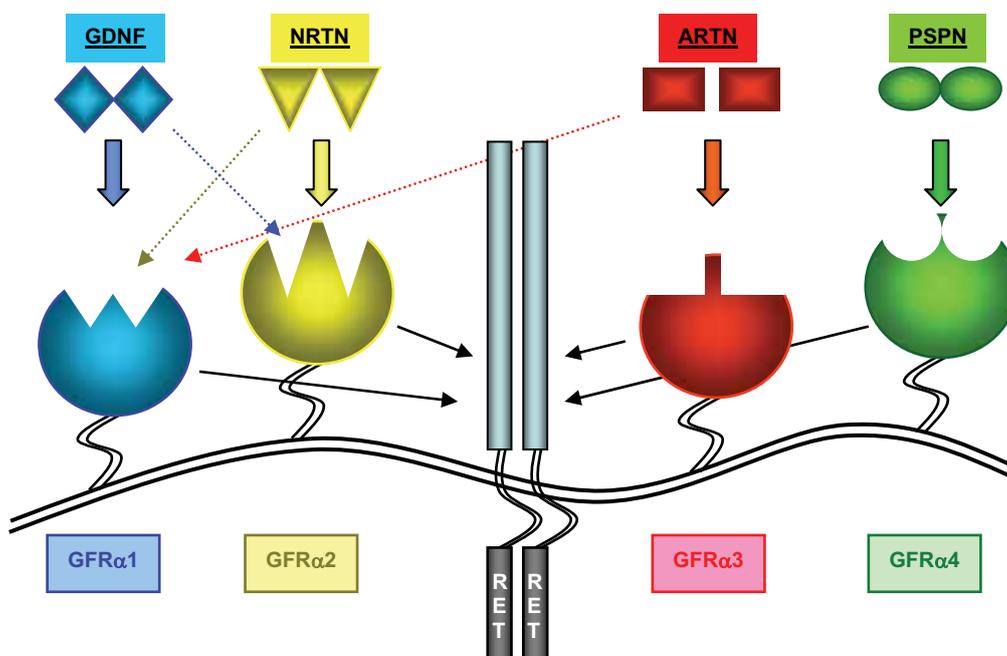


Figura 15.- Familia del GDNF y sus receptores

Aunque existe esta especificidad de un $GFR\alpha$ para cada ligando, un mismo ligando puede unirse a otros $GFR\alpha$, aunque con menor afinidad (Baloh y col., 1997, 1998a; Cacalano y col., 1998; Scott e Ibáñez, 2001). En un primer paso, la unión de los miembros de la familia de GDNF con sus receptores α específicos forma un complejo de alta afinidad. Este complejo que contiene un miembro de la familia de GDNF y un homodímero de $GFR\alpha$, recluta dos moléculas del receptor RET, y es el acercamiento de estas dos moléculas lo que desencadena la transfosforilación de residuos específicos en sus dominios tirosina quinasa y con ella, la señalización intracelular (Airaksinen y Saarma, 2002).

Los receptores RET pueden activar varias vías de señalización intracelular incluyendo a ERK/MAPK (Worby y col., 1996), PI3K/AKT (Murakami y col., 1999) y la vía de SAPK/JNK (Chiariello y col., 1998). La activación de RET afecta a diferentes vías dependiendo de su localización dentro o fuera de los unos microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos localizados en la membrana plasmática, los denominados

lipid rafts (Fig. 16). Estos microdominios tienen un papel esencial en procesos de señalización a través de la membrana durante diferentes procesos fisiológicos (Simons y Toomre, 2000).

Los $GFR\alpha$, se localizan dentro de los *lipid rafts* mediante su dominio GPI, mientras que el RET inactivo se localiza fuera. Tras una estimulación mediante los miembros de la familia de GDNF, los $GFR\alpha$ reclutan al receptor RET hacia los *lipid rafts* activándolo. Y una vez activo, el receptor RET puede permanecer dentro del *rafts* o volver a salir, lo que dará lugar a diferentes señalizaciones intracelulares dependiendo de proteínas adaptadoras específicas (Fig. 16). También se ha descrito un mecanismo por el cual moléculas solubles de $GFR\alpha$ son las encargadas del reclutamiento de RET, aunque los mecanismos están aún en debate (Paratcha e Ibáñez, 2002; Tsui-Pierchala y col., 2002).

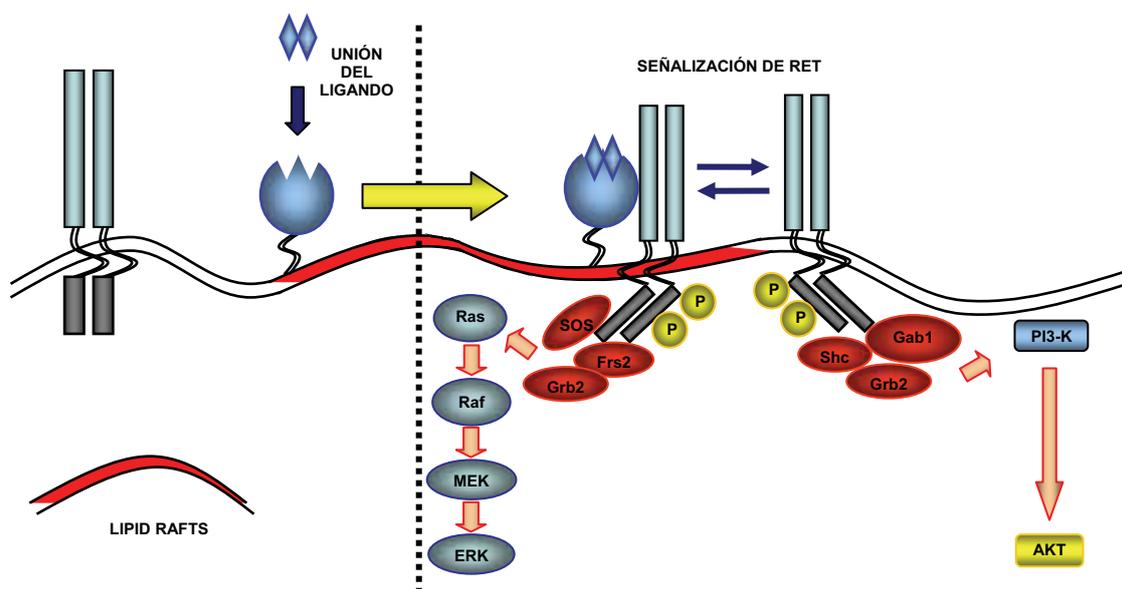


Figura 16.- Reclutamiento hacia los lipid rafts y señalización del receptor RET

Otra forma adicional de regulación de la señal sería mediante el *splicing* diferencial a nivel del ARNm de RET. Se da lugar al menos a dos isoformas distintas de receptor, el Ret-9 y el Ret-51, las cuales difieren sólo en el extremo C-terminal que se asocia a distintos complejos de señalización (Tsui-Pierchala y col., 2002).

A pesar del papel fundamental de ambos receptores, la unión de GDNF a $GFR\alpha1$ puede activar una transducción de señal independiente de Ret (Poteryaev y col., 1999; Trupp y col., 1999). Además, trabajos recientes han identificado a moléculas neuronales de adhesión celular, las NCAM, como un receptor alternativo para los miembros de la familia de GDNF. En ausencia de RET, las NCAM podrían

actuar como receptores de baja afinidad, y la asociación GFR α -NCAM uniría a los miembros de la familia de GDNF con una gran afinidad activando a las proteínas quinasas Fyn (de la familia de quinasas Src) y FAK (del inglés *Focal adhesion kinase*; Paratcha y col., 2003).

Del mismo modo, el receptor RET puede ser activado de manera independiente a los miembros de la familia de GDNF o GFR α . En este caso, la neurotrofina NGF sería la inductora de la fosforilación de RET mediante un mecanismo aún desconocido, pero aparentemente indirecto (Tsui-Pierchala y col., 2002).

4.- LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

En el desarrollo de esta tesis nos hemos centrado en el estudio de los procesos de muerte celular y su modulación por parte de distintos factores tróficos dentro del contexto de las enfermedades neurodegenerativas, y más concretamente en diferentes modelos de la enfermedad de Huntington. Esta enfermedad fue inicialmente descrita en base a sus manifestaciones clínicas en 1872 (Huntington, 1872) y se trata de una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la disfunción y la posterior muerte de neuronas en de zonas específicas del cerebro. Esta neurodegeneración ocurre principalmente en el núcleo estriado (núcleo caudado y putamen), aunque en etapas más avanzadas, también se ha descrito una pérdida de poblaciones neuronales específicas de la corteza cerebral (DeLa Monte y col., 1988; Mann y col., 1993). La pérdida de las neuronas del núcleo estriado produce disfunciones motoras, mientras que la atrofia de las neuronas corticales sería la responsable de la pérdida cognitiva observada en los enfermos de Huntington (Martin y Gusella, 1986; Ross, 2002).

La causa de la enfermedad reside en la mutación de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 4, esta mutación consiste en una expansión de un trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) y se traduce en una repetición de poliglutaminas (polyQ) en el extremo N-terminal de la proteína codificada denominada huntingtina (htt; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). El número de repeticiones del triplete CAG en la población no afectada varía entre 6 y 35, las personas con un número entre 35 y 39 están en riesgo de padecer la enfermedad, mientras que aquellas con más de 40 repeticiones siempre terminan desarrollando el proceso neurodegenerativo (Myers y col., 1988). Además, existe una relación directa entre el número de repeticiones y la gravedad de la enfermedad, de manera que un mayor número de repeticiones implica un desarrollo más temprano de los síntomas y

una patología más severa (Duyao y col., 1993; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

La mutación en el gen de la *huntingtina* induce una neurodegeneración muy específica de determinadas zonas cerebrales, y, dentro de las diferentes áreas, es a su vez específica para determinados tipos celulares. Dentro del núcleo estriado podemos encontrar neuronas de proyección, que utilizan el GABA como neurotransmisor y representan un 90-95% de la población estriatal, e interneuronas que representan sólo el 5-10 % pero ejercen un papel importante en el control de la excitabilidad de las neuronas de proyección. En la enfermedad de Huntington, las neuronas de proyección son las que sufren un marcado proceso neurodegenerativo (Ferrante y col., 1991), mientras que las interneuronas no se ven prácticamente afectadas (Ferrante y col., 1985, 1987; Vonsattel y col., 1985). Esta neurodegeneración dependiente del tipo celular es aún más específica y afecta de manera distinta a las subpoblaciones de las neuronas estriatales de proyección. Las células que expresan encefalinas y proyectan al globo pálido externo se ven afectadas antes y de una manera más severa que las que expresan dinorfina y sustancia P y envían sus axones a la sustancia negra *pars reticulata* y al globo pálido interno (Reiner y col., 1988; Albin y col., 1992; Ritchfield y col., 1995; Mitchell y col., 1999; Glass y col., 2000). La degeneración cortical también presenta un patrón específico, y, en estadios avanzados de la enfermedad, se produce una atrofia de las neuronas piramidales de la capa III, V y VI de la corteza motora y asociativa (Cudkowicz y Kowall, 1990; DiFiglia y col., 1997; MacDonald y Halliday, 2002). Es importante señalar que a pesar de la especificidad de la neurodegeneración, la htt se expresa en prácticamente todas las poblaciones neuronales del sistema nervioso central, en los tejidos periféricos y también durante el desarrollo embrionario (Strong y col., 1993; Bhide y col., 1996). Por lo tanto, esta neurodegeneración selectiva puede deberse no sólo a los efectos de la htt mutada, sino también a las propiedades intrínsecas de cada tipo celular.

La correlación directa entre la mutación del gen de la *huntingtina* y el proceso neurodegenerativo aún no ha sido establecida. Para entender la actividad patológica de la htt, es importante el estudio de su función en condiciones normales. La htt se puede localizar en el citoplasma, donde estudios recientes la relacionan con la regulación de diferentes mecanismos de transporte intracelular y procesos de señalización, y también puede localizarse en el núcleo, donde se ha relacionado con proteínas implicadas en la transcripción (Harjes y Wanker, 2003; Landles y Bates,

2004; Li y Li, 2004). Un papel esencial de la htt es su contribución a la supervivencia celular. Los ratones KO para htt mueren antes de E7.5 (Duyao y col., 1995; Nasir y col., 1995) y la delección condicional de esta proteína en el prosencéfalo induce neurodegeneración (Dragatsis y col., 2000). Además, también se ha descrito como proteína esencial durante la hematopoyesis y la neurogénesis (White y col., 1997; Metzler y col., 2000). Por último, también ha sido demostrado el papel de la htt como proteína anti-apoptótica. Su sobre-expresión protege a neuronas estriatales frente a la privación de suero o al tratamiento con la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP; Rigamonti y col., 2001), actuando a un nivel entre las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 y la activación de la caspasa-3 (Rigamonti y col., 2000), o bien interaccionando con diferentes proteínas que bloquean la apoptosis inducida por la caspasa-8 (Gervais y col., 2002). Dadas todas estas funciones fisiológicas, recientemente se ha planteado que la pérdida de función de la htt podría contribuir a la neuropatología característica de la enfermedad de Huntington (Cattaneo y col., 2005). Sin embargo, existen también evidencias que avalan que la ganancia de función de la htt mutada asociada a su expansión polyQ sería la responsable de activar el proceso neurodegenerativo. Así pues, el debate sobre si la neurodegeneración de la enfermedad de Huntington se debe a una pérdida o a una ganancia de función por parte de la htt mutada está actualmente abierto.

Una de las características patológicas de la enfermedad de Huntington es la presencia de agregados que contienen htt mutada en las neuronas. Estos agregados se localizan principalmente en el citoplasma aunque también se detectan dentro del núcleo. El mecanismo preciso por el que la htt mutada forma estos agregados insolubles no está definido, aunque existe una correlación entre la densidad de agregados y el número de repeticiones CAG (Vonsattel y col., 1985; Myers y col., 1988; Becher y col., 1998). Tampoco existe un consenso sobre el papel exacto que tienen los agregados en la patología de la enfermedad. Según diferentes hipótesis, su función puede ser considerada: (1) tóxica y directamente relacionada con la neurodegeneración (Davies y col., 1997; DiFiglia y col., 1997; Ordway y col., 1997; Becher y col., 1998), (2) un proceso secundario que no correlaciona con la vulnerabilidad de las neuronas estriatales (Kim y col., 1999; Leavitt y col., 1999), (3) o incluso neuroprotectora (Saudou y col., 1998; Arrasate y col., 2004; Ravikumar y col., 2004).

Uno de los hitos en la investigación de la enfermedad de Huntington ha sido el desarrollo de modelos animales que expresan un elevado número de repeticiones CAG en el gen de la huntingtina (Fig. 17).

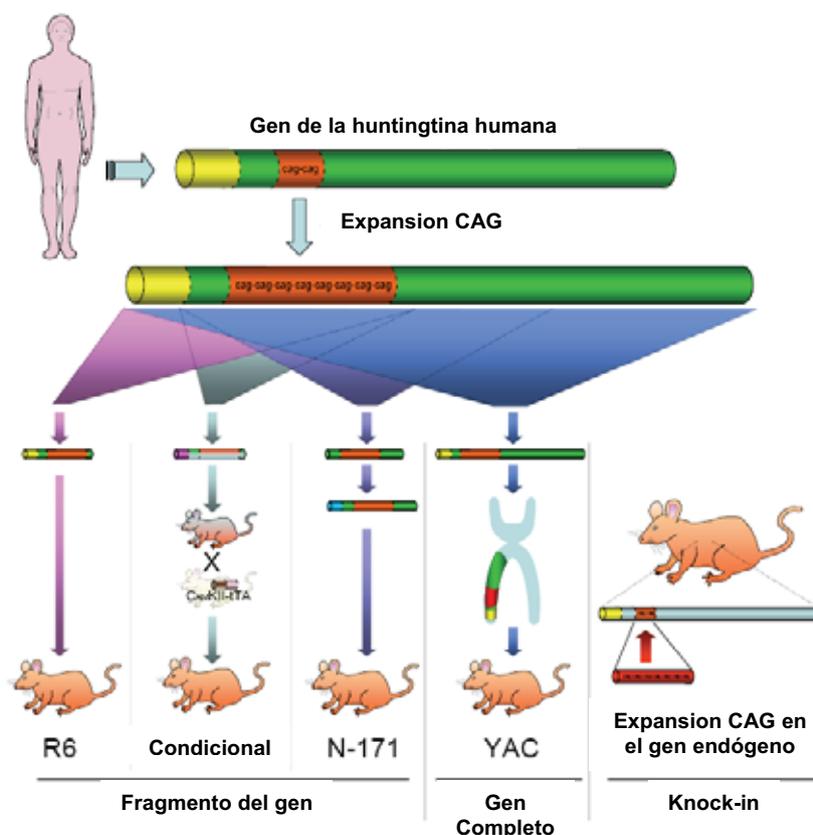


Figura 17.- Modelos genéticos de la EH
(fig. adaptada de Alberch y col., 2007)

Entre los modelos desarrollados podemos encontrar ratones transgénicos y ratones *knock-in*. Los transgénicos pueden expresar un fragmento del gen de la huntingtina humana, el exon 1, con 115 (R6/1) o 145 (R6/2) repeticiones CAG (Mangiarini y col., 1996), o bien expresar un cromosoma artificial de levadura que contiene el gen de la huntingtina entero con 72 repeticiones CAG (YAC72; Hodgson y col., 1999), desarrollando todos ellos una patología neurológica progresiva. Existe también un modelo transgénico condicional regulado por un sistema *tet* (Yamamoto y col., 2000). Por último, los modelos *knock-in*, tienen insertado distintos números de repeticiones CAG en el gen murino endógeno, presentando anomalías en el comportamiento motor antes de cualquier neuropatología detectable (Menalled y col., 2002).

Junto a la *htt* mutada, otros mecanismos pueden colaborar en el desarrollo del proceso neurodegenerativo, entre ellos podemos destacar la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial y la deficiencia de factores tróficos (Fig. 18; revisado en: Alberch y col., 2004; Perez-Navarro y col., 2006).

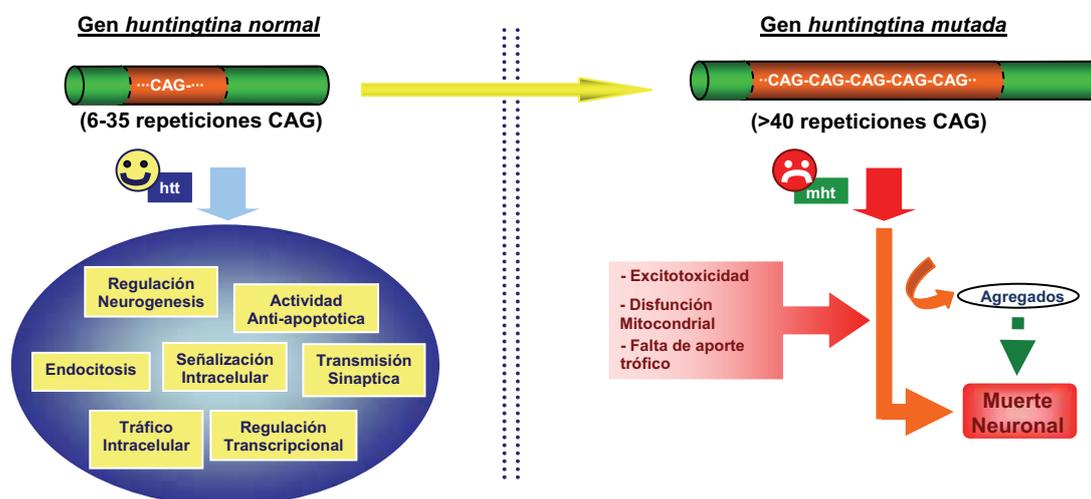


Figura 18.-Funciones de la *htt* normal y mecanismos implicados en la muerte celular mediada por la *htt* mutada.
(fig. adaptada de Perez-Navarro y col., 2006)

4.1.- EXCITOTOXICIDAD EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

El núcleo estriado recibe un elevado número de proyecciones glutamatérgicas excitadoras principalmente de la corteza cerebral (Calabresi y col., 1996). Esto lo convierte en una estructura vulnerable a una lesión excitotóxica, dado que, además de su función fisiológica, una hiperactividad en los receptores de glutamato puede inducir la muerte celular por excitotoxicidad (Choi, 1988), fenómeno debido a una excesiva entrada de calcio.

El glutamato ejerce su acción a través de varios tipos de receptores: los ionotrópicos, ligados a canales iónicos, y que se dividen en NMDA, AMPA (del inglés α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) y kainato (KA); y los metabotrópicos, los cuales están unidos a un sistema de segundo mensajero vía proteínas G (Hollmann y Heinemann, 1994). En principio, los receptores ionotrópicos son los que dan lugar a los efectos neurotóxicos más pronunciados, aunque los metabotrópicos podrían también contribuir a dicho efecto. La excitotoxicidad comenzó a considerarse como un fenómeno relacionado con la enfermedad de Huntington cuando se observó que la administración de agonistas del glutamato en el núcleo estriado reproducía algunas de las características bioquímicas descritas en la

enfermedad (Coyle y Schwarcz, 1976; Schwarcz y Kholer, 1983; Beal y col., 1986). Entre los diferentes agonistas, la inyección intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN), un agonista de los receptores NMDA, es la que mejor reproduce la neuropatología observada en la enfermedad de Huntington, tanto en modelos de rata (Beal y col., 1986, 1989) como en primates no humanos (Ferrante y col., 1993). En este sentido, las inyecciones intraestriatales de QUIN (Beal y col., 1986) junto con las de KA (Coyle y Schwarcz, 1976) han sido ampliamente utilizadas como modelo animal de la enfermedad.

A pesar de una primera hipótesis que proponía que las neuronas con mayor expresión de receptores NMDA eran las más vulnerables (Young y col., 1988; Albin y Gilman, 1990), el hecho de que tanto las neuronas estriatales de proyección como las interneuronas expresaran los receptores de manera abundante (Standaert y col., 1994; Landwehmer y col., 1995), sugirió que la muerte selectiva en la enfermedad de Huntington debería estar controlada por otros mecanismos. Actualmente, se piensa que las diferentes subunidades que componen a los receptores NMDA pueden tener un papel importante en la neurodegeneración (revisado en: Perez-Navarro y col., 2006). Los receptores NMDA se componen de una subunidad NR1 y de diferentes combinaciones de subunidades NR2A-D (Hollmann y Heinemann, 1994). La subunidad NR1 es esencial para la funcionalidad del receptor, mientras que las subunidades NR2 le confieren importantes propiedades que afectan a la permeabilidad y al tiempo de activación (Schoepfer y col., 1994). Todas las neuronas estriatales expresan niveles similares de NR1 (Chen y Reiner, 1996; Chen y col., 1996; Ghasemzadeh y col., 1996). En cambio, mientras que las neuronas estriatales de proyección expresan mayoritariamente la subunidad NR2B junto a pequeñas cantidades de NR2A, las interneuronas expresan mayoritariamente NR2D junto a pequeñas cantidades de NR2A y NR2C (Standaert y col., 1994; Landwehmer y col., 1995; Chen y col., 1999). Estas observaciones, junto al hecho de que la htt mutada aumenta de manera selectiva las corrientes mediadas por receptores NR1/NR2B (Chen y col., 1999; Zeron y col., 2001, 2002), sugieren que los niveles relativos de la subunidad NR2B en comparación con las otras subunidades NR2, podrían estar contribuyendo a la neurodegeneración específica de las neuronas estriatales de proyección.

El resultado de la activación patológica de los receptores NMDA es una entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) que rompe el equilibrio intracelular. La mitocondria tiene un papel muy importante en la ejecución del proceso excitotóxico (Nicholls y Budd, 2000).

El tipo de muerte celular inducida, apoptosis o necrosis, dependerá de la intensidad de la señal y del estado funcional de la mitocondria (Ankarcrona y col., 1995; Cheung y col., 1998). El exceso de Ca^{2+} intracelular es inicialmente asumido por la mitocondria, pero ante un estímulo intenso, una gran entrada de Ca^{2+} hacia la mitocondria deriva en un proceso necrótico. El mecanismo de esta muerte excitotóxica incluye la producción de especies reactivas de oxígeno que causan daños irreversibles tanto en el proceso respiratorio mitocondrial como en la capacidad de las membranas de regular los niveles de Ca^{2+} intracelular (Nicholls y Budd, 2000; Ward y col., 2000).

La muerte apoptótica mediada por receptores NMDA se relaciona con una entrada de Ca^{2+} menos severa que induce una despolarización incompleta o transitoria de la mitocondria (Ankarcrona y col., 1995; Cheung y col., 1998). Se han propuesto diferentes mecanismos ejecutores dependientes de Ca^{2+} que pueden actuar de manera conjunta llevando a la célula hacia la muerte apoptótica. Entre ellos podemos destacar, la activación de vías intracelulares de estrés, como la vía de p38 y la vía de SAPK/JNK (Kawasaki y col., 1997; Schwarzschild y col., 1997; Yang y col., 1997); la activación de fosfatasa como la calcineurina (Springer y col., 2000; Erin y col., 2003), la regulación de las proteínas de la familia de Bcl-2 (Perez-Navarro y col., 2005) y la liberación de factores apoptogénicos desde la mitocondria (Andreyev y col., 1998).

4.2.- DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Además de la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial también ha sido implicada en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington (Beal, 2000; Rego y Olivera, 2003). Estudios realizados utilizando la resonancia magnética muestran un defecto del metabolismo oxidativo localizado en los ganglios basales en pacientes con enfermedad de Huntington (Jenkins y col., 1993, 1998; Browne y col., 1997). Diferentes estudios bioquímicos han demostrado también que las mitocondrias de células que expresan la htt mutada presentan deficiencias en la actividad del complejo II/III (Gu y col., 1996; Browne y col., 1997; Tabrizi y col., 1999), y son más sensibles frente a inhibidores mitocondriales y entradas de Ca^{2+} que aquellas que expresan la forma fisiológica de la proteína (Panov y col., 2002).

En apoyo de esta hipótesis, un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la enfermedad de Huntington es la administración de 3-NP que inhibe la actividad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial mediante su unión irreversible a la enzima succinato deshidrogenasa (Beal y col., 1993; Brouillet y col., 1995). Su

administración crónica en ratas y primates no humanos reproduce los síntomas descritos en la enfermedad de Huntington tanto a nivel histológico como patológico. En estos modelos animales se han descrito diferentes disfunciones locomotoras tales como corea, distonia y disquinesia que derivan de una degeneración específica de las neuronas estriatales (Beal y col., 1993; Brouillet y col., 1995; Palfi y col., 1996).

El mecanismo específico por el cual la htt mutada podría estar interviniendo en la función del complejo II de la mitocondria no se conoce. Estudios *in vitro* han demostrado que el fragmento polyQ por sí mismo podría promover un comportamiento anormal de la mitocondria frente a diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Panov y col., 2003). Además la htt mutada puede asociarse con la membrana mitocondrial externa y facilitar la apertura del poro de transición (Choo y col., 2004). Por último, también existe la hipótesis de que la htt mutada podría disminuir la transcripción de genes específicos que codifican proteínas metabólicas de la mitocondria (Luthi-Carter y col., 2000, 2002; Chan y col., 2002).

Dado el papel protagonista del Ca^{2+} , también se ha sugerido la relación de los defectos crónicos de la mitocondria con la excitotoxicidad. En este sentido, se ha demostrado que antagonistas de los receptores NMDA pueden bloquear el efecto producido por la inhibición mitocondrial (Henshaw y col., 1994; Greene y Grenamyre, 1995). Además, los inhibidores de la succinato deshidrogenasa pueden a su vez reforzar de manera específica la excitación de neuronas estriatales mediada por los receptores NMDA (Calabresi y col., 2001). Estos dos fenómenos provocarían una desregulación en los niveles de Ca^{2+} intracelulares que, conjuntamente con una mayor sensibilidad de las mitocondrias de neuronas estriatales a la permeabilización inducida por Ca^{2+} (Brustovetsky y col., 2003), podría estar contribuyendo a la neurodegeneración selectiva característica de la enfermedad de Huntington.

4.3.- FACTORES TRÓFICOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Los factores tróficos se proponen como buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas dado el efecto neuroprotector que ejercen sobre diferentes poblaciones neuronales (Alexi y col., 2000; Aebischer y Ridet, 2001; Thoenen y Sendtner, 2002). Entre las diferentes familias de factores tróficos, destacaremos a las neurotrofinas y a la familia del GDNF entre las más estudiadas en relación con la enfermedad de Huntington.

Las neurotrofinas, los miembros de la familia de GDNF y sus receptores se regulan de manera específica por la inyección intraestriatal de agonistas de receptores

de glutamato en ratas adultas (Canals y col., 1998, 1999; Marco y col., 2002b) o a diferentes edades postnatales (Checa y col., 2000, 2001). Esta regulación endógena tras la lesión excitotóxica sugiere una posible contribución de los factores tróficos al mantenimiento de la supervivencia de las neuronas estriatales.

El efecto neuroprotector de los miembros de la familia de GDNF y de las neurotrofinas ante la excitotoxicidad también ha sido ampliamente descrito. Estos factores, presentan un efecto protector contra la degeneración de las interneuronas y de las neuronas de proyección estriatales. GDNF y neurturina protegen a estas neuronas de la degeneración inducida por la inyección de QUIN (Perez-Navarro y col., 1996, 2000b; Kells y col., 2004) y de KA (Gratacos y col., 2001b). Sin embargo, estos factores presentan una gran especificidad en sus acciones, y, mientras que el GDNF actúa sólo sobre las neuronas que envían sus axones hacia la sustancia negra (Perez-Navarro y col., 1999a), la protección mediada por neurturina es específica para las neuronas estriato-palidales (Marco y col., 2002a).

En cuanto a las neurotrofinas, a nivel estriatal, todas presentan un efecto neuroprotector de las neuronas GABAérgicas de proyección y de las interneuronas frente a la atrofia y la muerte inducida por la inyección intraestriatal de QUIN (Schumacher y col., 1991; Altar y col., 1992; Davies y Beardsall, 1992; Perez-Navarro y col., 1994, 1999b, 2000a; Venero y col., 1994; Martínez-Serrano y Bjorklund, 1996; Alexi y col., 1997; Araujo y Hilt, 1997; Bemelmans y col., 1999; Kells y col., 2004) y de KA (Gratacos y col., 2001). De todas la neurotrofinas, es el BDNF el que produce una mayor protección frente a la muerte excitotóxica de neuronas estriatales (Perez-Navarro y col., 2000a; Gratacos y col., 2001b), mientras que la NT-3 es el más eficiente regulando los cambios fenotípicos inducidos por la inyección intraestriatal de QUIN (Perez-Navarro y col., 1999b).

Tras el descubrimiento de la implicación de la htt en la regulación transcripcional del BDNF, se está dedicando mucho trabajo al estudio de esta neurotrofina y de su papel en la neurodegeneración específica de la enfermedad de Huntington. La transcripción del BDNF en neuronas corticales está regulada de manera positiva por la htt, mientras que la proteína mutada disminuye su expresión (Zuccato y col., 2001, 2003). En este sentido, se ha demostrado una menor expresión y unos niveles de BDNF disminuidos en muestras de tejido estriatal procedente de pacientes de enfermedad de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001), y en diferentes modelos transgénicos (Zuccato y col., 2001; Duan y col., 2003; Gines y col., 2003a; Zhang y col., 2003a). Además de afectar a su expresión, la htt también

aumenta el transporte vesicular de BDNF a través de los microtúbulos, fenómeno que también se encuentra afectado en el contexto de la enfermedad o tras la reducción de los niveles de htt normal (Gauthier y col., 2004). Recientemente, se ha descrito que la htt mutada también puede afectar a los niveles del receptor del BDNF, TrkB (Gines y col., 2006), lo que estaría induciendo un efecto sumatorio en la disminución de la señalización mediada por BDNF. Dado el papel predominante del BDNF como promotor de la supervivencia de las neuronas estriatales en modelos *in vitro* (Ventimiglia y col., 1995; Gavalda y col., 2004) e *in vivo* (Perez-Navarro y col., 1999b, 2000a, 2005; Gratacos y col., 2001b), se piensa que esta disminución en la señalización efectiva de BDNF podría estar contribuyendo a la degeneración selectiva observada durante el transcurso de la enfermedad de Huntington. Esta hipótesis ha sido recientemente reforzada con el desarrollo de un modelo doble mutante, R6/1:BDNF+/- (Canals y col., 2004), que expresa la htt mutada junto con unos niveles disminuidos de BDNF. Estos animales presentan un inicio más temprano de los síntomas motores y una falta de coordinación más severa que la observada en los animales R6/1. El empeoramiento de los síntomas se corresponde con la pérdida específica de neuronas estriatales de proyección, hecho que no ocurre en el modelo R6/1, y que puede ser prevenido mediante el tratamiento con BDNF (Canals y col., 2004).

Dada esta gran influencia de los factores neurotróficos en el contexto de la enfermedad de Huntington, en el desarrollo de esta tesis hemos estudiado el efecto de dos de estos factores, GDNF y BDNF, sobre las neuronas estriatales. La caracterización de los procesos de maduración y muerte, y la modulación por parte de los distintos factores neurotróficos, pueden constituir herramientas de gran utilidad para desarrollar nuevos tratamientos neuroprotectores para la enfermedad.