

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA

FACULTAT DE MEDICINA, UNIVERSITAT DE BARCELONA



**IMPLICACIÓ DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS  
EN LA FISIOPATOLOGÍA Y PROTECCIÓN DE LA  
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

**Tesis presentada por José Ramón Pineda Martí**

**para optar al título de Doctor en Biología**



*Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores Jordi Alberch Vié y Josep Maria Canals Coll, en el laboratorio de fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas del Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.*



UNIVERSITAT DE BARCELONA

*Dr. Jordi Alberch Vié*

*Dr. Josep Maria Canals Coll*



*José Ramón Lineda Martí*

*Barcelona, Septiembre del 2006*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer encarecidamente al Dr. Jordi Alberch y al Dr. Josep M. Canals la oportunidad de haberme permitido realizar la presente tesis en su laboratorio. En esta etapa de mi formación, su experiencia, así como su perseverancia hasta la extenuación buscando permanentemente como mejorar día a día y el saber conducir con buen criterio las hipótesis más complicadas, sin duda alguna han sido las mejores lecciones que he podido aprender. Buena prueba de ello queda reflejada en las siguientes páginas que componen este trabajo. Sinceramente, haberlo podido concluir a buen término, y con un nivel tan alto, se lo debo agradecer a ellos.

Sin duda alguna, también quisiera dar las gracias a todos los compañeros con los cuales he compartido mi estancia en el laboratorio, a los Doctores Miquel Bosch, Sussana Pezzi y Núria Gavaldà, por los buenos momentos que hemos compartido juntos desde que llegué... definitivamente, cuando os fuisteis se acabaron las salidas!! (gracias por haberme enseñado a esquiar!!), a Frank por todo lo que he aprendido con su convivencia, las salidas de fiesta Barcelonina y las tertulias después de cenar (cuídate Larry!!). Al Dr. Juanma Duran por sus charlas tan amenas, divertidas e interesantes, en especial las de informática, siempre dispuesto a enseñarme y ayudarme (gracias por haberme “empujado” hacia la luz del final del túnel... con Linux has sido como un padre).

Agradecer, como no, toda la ayuda de la técnica Maite Muñoz, la auténtica jefa del laboratorio, siempre pendiente de que todo funcionase, solucionando todos los destrozos y contratiempos ocasionados por todos los “Gremlins” que habitamos en lab. Mucha suerte y ánimos!! te echaré de menos!! (cuida de la ratita eh...?! ah! y ahora ya podrás tirar todas las piezas de las antiguallas de ordenadores que hay desparramadas). Darle las gracias a Ana López, por habernos cuidado a todos (incluidos los “peques...”) como una madre. A la Paola, Albert, Solene

por su compañía y simpatía (ya echareis de menos el “japo”... je je je y las “cucas”... jua jua jua ^\_^), pero para simpatía la de las “*Stem Girls*”. Yo sí que echaré en falta escuchar las carcajadas de la Raquel por el laboratorio..., no cambies “Rus”, eres un tesoro!! y a “las nenitas de abajo” Empar, Núria... desearos mucha suerte en vuestras empresas.

A los dos “cerebritos” Noe y Dani, deciros que ha sido un placer trabajar con vosotros, gracias por todo lo que me habéis enseñado!!; a ti “Morenita” desearte mucha suerte en tus futuros proyectos, y a ti Dani, ejem, te he enseñado al igual que Juanma me enseñó a mí. Ahora que has cruzado la puerta, te darás cuenta que informática y ciencia son hermanas gemelas. En ambos campos consiste en llegar a una meta (lógica) por un camino que existe pero no se conoce (no tenemos esa preparación, ni somos informáticos por un lado, ni tampoco Dioses por el otro). Éste se forja a base de aprendizaje, intuición y experiencia (y las tres mejoran conjuntamente a lo largo del tiempo). Haz un buen uso de todo lo que te he enseñado (a ver si me sorprendes la próxima vez que nos veamos!!).

Quisiera darle las gracias al respetable Torres-Peraza (je je...!!) por haberme ayudado siempre de manera incondicional y haber reído tanto en los buenos momentos y haberlo tenido al lado en los momentos malos, te deseo todo lo mejor y espero que te vaya muy bien por tu tierra natal!!. También quisiera agradecer al JuanMa García (para mí la otra “alegría” del laboratorio) su ayuda y compañía. Nunca pensé que se podía llegar al laboratorio por la mañana con una sonrisa y que durase hasta la noche. La simpatía y el carácter con que afrontas las cosas es envidiable (de mayor quiero ser como tú... ;P). Muchas gracias por haberme dado ánimos y haberme sabido tranquilizar en los momentos más tensos.

Tampoco querría olvidarme de todos los “Gustavos” que faltan; Inés, Cecilia, Yován... muchísima suerte en vuestros respectivos proyectos. Sin lugar a duda con vuestra simpatía y

desparpajo se han estrechado mucho los lazos entre los dos grupos del laboratorio. Gracias por todos los buenos momentos.

A Xavier Xifró y Sílvia Ginés quisiera agradecerle encarecidamente toda la ayuda y los consejos que me han dado, tanto en el día a día del laboratorio como en las “negociaciones” de mi futura estancia afuera, siempre dispuesto a ayudarme y aconsejarme (moltes gràcies nois!!!!). Luego, a la veterana del grupo Esther Pérez-Navarro también quisiera expresarle mi mas profundo respeto y admiración por su juicio y capacidad crítica y reflexiva (a veces parecía que el “referee” de los artículos lo teníamos dentro del mismo laboratorio), siempre dispuesta ha tratar de mejorar nuestra formación con consejos, ideas, explicaciones... y también por habernos amenizado los ratos de las comidas contándonos “batallitas” de cuando realizó su Tesis a las cuales atendíamos con mucha intriga y curiosidad. Por último, también quiero agradecer encarecidamente al Dr. Egea toda la atención y toda la confianza que me ha dado a lo largo de todos estos años.

Así, aunque ahora sea el momento de defender los frutos de todo un largo trabajo, esta etapa que inicié aquí en el laboratorio del Dr. Jordi Alberch tampoco hubiera sido posible de no ser por mi antigua estancia en el laboratorio del Dr. Carlos López-García, lugar de donde vine y tuve mis inicios en el mundo de la ciencia aprendiendo de primera mano de su experiencia, la meticulosidad y exquisitez necesarias para las técnicas de histología básica (el fruto de las cuales lo veo cada vez que observo algunas de las ilustraciones de la presente tesis). A él y todos los antiguos compañeros de laboratorio; Kiko, Gregori, Emilio, Carmen, Chonchi, Xavi, Joan, Sabina, Jorge... quiero agradecerles la bonita y provechosa experiencia que tuve para encajar en este “mundillo” donde realmente me encuentro a gusto.

Obviamente, por supuesto, también tengo que agradecer a toda mi familia todo el esfuerzo que han realizado para que pueda haber llegado hasta aquí. En definitiva, me gustaría que esta Tesis

fuese una justificación o recompensa para toda la gente que ha creído en mí, y en especial, para el Doctor Antonio Pérez Aytes.

Ah...!, por último no quisiera olvidarme de todos los “pequeñitos” que han dado su vida para que este trabajo se convirtiese en una realidad. Aunque a menudo sean olvidados, y sólo sean considerados como “material”, no dejan de ser vidas sacrificadas por una causa, y como tal, al menos manifestarles desde aquí mi más profundo respeto.





I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	3
1.1.- ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES.....	4
1.1.1.- EL NÚCLEO ESTRIADO.....	7
1.1.2.- LA SUSTANCIA NEGRA.....	9
1.2.- ALTERACIONES CONDUCTUALES Y COGNITIVAS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	11
1.2.1.- NEUROLOGÍA.....	13
1.3.- LA PROTEINA HUNTINGTINA.....	15
1.3.1- MODELOS ANIMALES PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON....	23
1.3.1.1- MODELOS DE ANIMALES TRANSGÉNICOS PARA EL EXÓN I DE LA HUNTINGTINA.....	24
1.3.1.1.1.- MODELOS R6/1.....	26
1.3.1.1.2.- MODELOS R6/2.....	27
1.3.1.2- MODELOS TRANSGÉNICOS CONDICIONALES PARA LA HUNTINGTINA MUTADA.....	29
1.3.1.3- MODELOS “YAC” PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	30
1.3.1.4- MODELOS “KNOCK-IN”S PARA LA HUNTINGTINA.....	31
1.4.- MECANISMOS MOLECULARES DE LA MUERTE NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	31

	<i>Página</i>
1.4.1.- IMPLICACIÓN DE LA EXCITOTOXICIDAD.....	33
1.4.2.- IMPLICACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	35
1.4.3.- IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES TRÓFICOS.....	37
1.4.3.1.-DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS FACTORES NEUROTROFICOS.....	39
1.4.3.1.1.- <i>El factor de crecimiento nervioso (NGF)</i> .....	39
1.4.3.1.2.- <i>El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)</i> .....	40
1.4.3.1.3.- <i>La neurotrofina-3 (NT-3)</i> .....	41
1.4.3.1.4.- <i>El factor neurotrófico ciliar (CNTF)</i> .....	42
1.4.3.1.5.- <i>El factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF)</i> .....	44
1.4.3.2.- PROTECCIÓN MEDIANTE <i>BDNF</i> .....	46
1.4.3.2.1.- <i>BDNF Y EL NÚCLEO ESTRIADO</i> .....	46
1.4.3.2.2.- <i>BDNF Y LA SUSTANCIA NEGRA</i> .....	47
1.4.3.2.3.- <i>BDNF Y LA HUNTINGTINA</i> .....	48
1.4.3.3.- PROTECCIÓN MEDIANTE <i>GDNF</i> EN LOS GANGLIOS BASALES.....	49
2.- TERAPIA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	50
2.1- TERAPIA FARMACOLÓGICA.....	50

2.1.1.- <i>Compuestos que disminuyen la estimulación excitatoria</i> .....	51
2.1.2.- <i>Aproximaciones neuroprotectoras usando el coenzima Q10</i> .....	52
2.1.3.- <i>Compuestos que previenen la agregación de la huntingtina</i> .....	52
2.1.4.- <i>Inhibidores de proteasas</i> .....	53
2.1.5.- <i>Fármacos inhibidores de las deacetilasas de histonas</i> .....	53
2.1.6.- <i>Fármacos inhibidores de las transglutaminasas</i> .....	54
2.2- TERAPIA CELULAR.....	55
2.2.1.- TERAPIA DE NEUROPROTECCIÓN.....	55
2.2.2.- TERAPIA DE SUSTITUCIÓN CELULAR.....	59
II.- OBJETIVOS.....	65
III.- RESULTADOS.....	69
Primer trabajo: “Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington’s disease.” .....	71
Segundo trabajo: “BDNF modulates dopaminergic deficits in a transgenic mouse model of Huntington’s disease.”.....	87

Tercer trabajo: “Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington’s disease through HSP1b and transglutaminase” .....	101
Cuarto trabajo: “Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington’s disease model: non-invasive optical neuroimage tracking of brain implanted cells” .....	119
Quinto trabajo: “Induction of GABAergic phenotype in a neural stem cell line for transplantation in an excitotoxic model of Huntington’s disease.” .....	133
IV.- DISCUSIÓN .....	153
V.- CONCLUSIONES .....	179
VI.- BIBLIOGRAFIA .....	183

Lista de abreviaturas empleadas en la presente tesis:

3-NP	<i>3-Nitropropionic acid</i> . Ácido 3-nitropropiónico.
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i> . Factor inductor de la apoptosis.
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> . Factor neurotrófico derivado del cerebro.
CAG	<i>Cytosin-Adenin-Guanin</i> . Triplete de nucleótidos Citosina Adenina Guanina que codifica para el aminoácido glutamina.
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> . Factor neurotrófico ciliar.
DARPP-32	<i>Dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein with molecular weight 32 kDa</i> . Fosfoproteína regulada por AMP cíclico y dopamina con peso molecular de 32kDa.
EH	Enfermedad de Huntington.
GABA	<i>Gamma-Amino Butyric Acid</i> . Ácido $\gamma$ -aminobutírico.
GDNF	<i>Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor</i> . Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial.
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> . Proteína fluorescente verde.
Hdh	<i>Huntington disease Homologue</i> . Gen de ratón homólogo al humano que codifica para la proteína huntingtina.
Hip-1	<i>Huntingtin interacting protein 1</i> . Proteína “1” que interacciona con la huntingtina.
Hippi	<i>Protein interactor of Huntingtin-interacting protein 1</i> . Proteína que interacciona con la proteína “1” que interacciona con la huntingtina.
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> . Factor de crecimiento con secuencia similar a la insulina.
NMDA	<i>N-metyl-D-aspartic acid</i> . Ácido N-metyl-D-aspártico.
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> . Proteína de choque térmico.

## *Abreviaturas*

---

NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> . Factor de crecimiento nervioso.
NT-3	<i>Neurotrophine-3</i> . Neurotrofina-3.
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
RA	<i>Retinoic acid</i> . Ácido retinoico.
SN	Sustancia negra
TH	Tirosina hidroxilasa
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i> . Cromosoma artificial de levadura

# INTRODUCCIÓN



## I.- INTRODUCCIÓN

### 1.- ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La Corea de Huntington también conocida como enfermedad de Huntington (a menudo abreviada como EH), es una enfermedad hereditaria caracterizada principalmente por un grave trastorno motor. En algunas regiones, a los enfermos que la padecían se les decía que tenían “el baile de San Vito”<sup>1</sup> en referencia a los movimientos alterados que impedían que se estuviesen quietos. De hecho, la palabra “Corea” viene del latín “chorēa” y ésta a su vez del griego “χορεία” y la etimología de ambas significan baile o danza. Es una enfermedad que afecta tanto a hombres como a mujeres. La enfermedad de Huntington se podría definir como una disfunción motora con declive cognitivo y trastornos psicológicos con una evolución de unos 10 a 15 años desde su manifestación hasta el momento de la muerte. Sus síntomas suelen aparecer normalmente entre los 30 y 50 años de edad, aunque una pequeña proporción de pacientes (10%) presentan los primeros síntomas antes de los 20 años. Esta variación de la enfermedad se denomina “forma juvenil” y se caracteriza por la edad de aparición, y por la rapidez y “voracidad” de la degeneración (Byers, R.K. y col., 1973; Gonzalez-Alegre, P. y Afifi, A. K., 2006; Myers, R.H. y col., 1988; Papapetropoulos, S. y Mash, D. C., 2005). En todos los casos la enfermedad no tiene cura ni tratamiento posible hasta el momento.

Para poder entender cómo ocurre la disfunción motora es preciso conocer que zonas del cerebro interactúan en la ejecución de los movimientos.

---

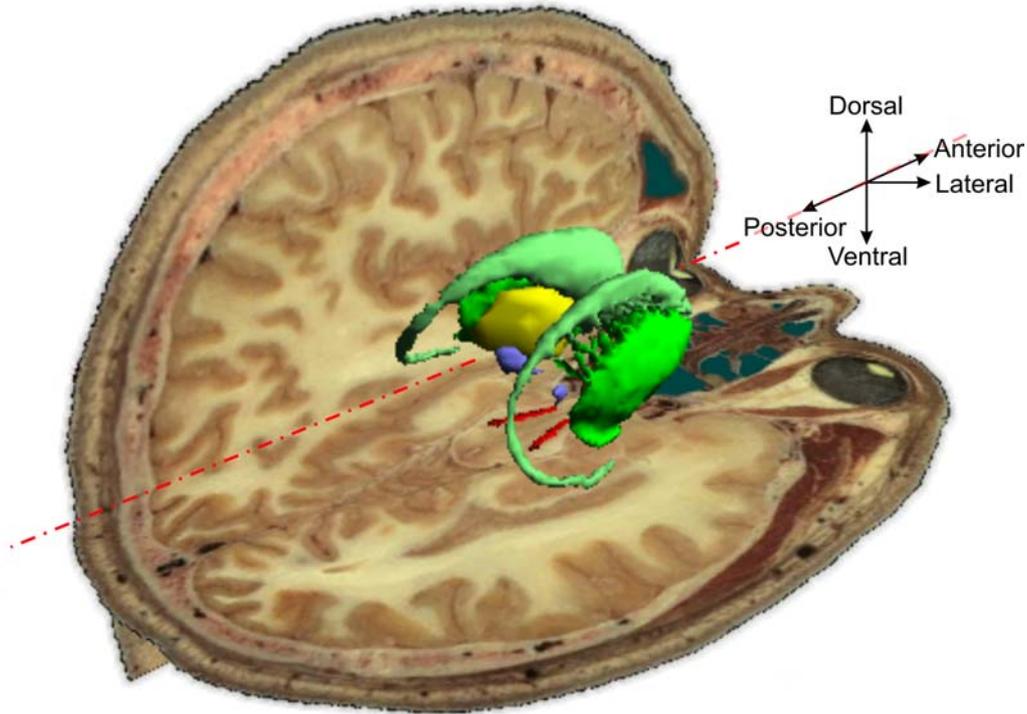
<sup>1</sup> Mártir siciliano que vivió en el siglo IV y del que se supone que murió en medio de grandes convulsiones, provocadas por la tortura a la que estaba siendo sometido.

### 1.1.- ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES

Si preguntásemos a cualquier ciudadano de a pié, éste podría definir el cerebro como una masa amorfa gelatinosa. Con estas palabras definirían lo que muy probablemente sea la estructura más compleja de todo el universo. Para poder explicar la organización dentro del cerebro, podríamos decir que se divide en capas, núcleos, y vías de proyección de neuronas que se interconectan. Centrándonos en las estructuras que nos interesan, el principal conjunto de núcleos y circuitos que participan en la regulación de los movimientos son los **ganglios basales**.

Los principales núcleos que integran los ganglios basales son los siguientes: el **núcleo caudado**, el **putamen**, el **globus palidus**, el **núcleo subtalámico** y la **sustancia nigra**. El núcleo caudado y el putamen constituyen una unidad funcional y anatómica conocida en los roedores como **núcleo estriado**.

Para poder explicar cómo se interconectan estos núcleos debemos pensar que forman un complejo circuito que básicamente se inicia en la corteza cerebral, pasa a través del núcleo estriado, globo pálido, sustancia negra y termina en el tálamo (donde este último proyecta de vuelta hacia la corteza cerebral de nuevo). Además debemos tener presente que a pesar de estar involucrados con la actividad motora no se conectan directamente con las neuronas motoras espinales. La complejidad del sistema hace necesario dar una breve descripción de la circuitería neuronal que tienen establecida.



**Ilustración 1 Reconstrucción tridimensional de los Ganglios Basales en el cerebro humano.** Se muestra el conjunto de núcleos que los forman. El color verde marca los Núcleos Caudados (describiendo la forma arqueada) y Núcleos Putámenes, en la zona interior y de color amarillo quedarían identificados los Globos Pálidos. Bajo el Globo Pálido y con una forma lenticular estarían coloreados de azul los Núcleos Subtalámicos. Por último las Sustancias Negras quedarían en la base coloreadas con color rojo. El Núcleo Putamen junto al núcleo Caudado (los verdes) forman el denominado Núcleo Estriado. Fuente: UB-Brain v1.0.

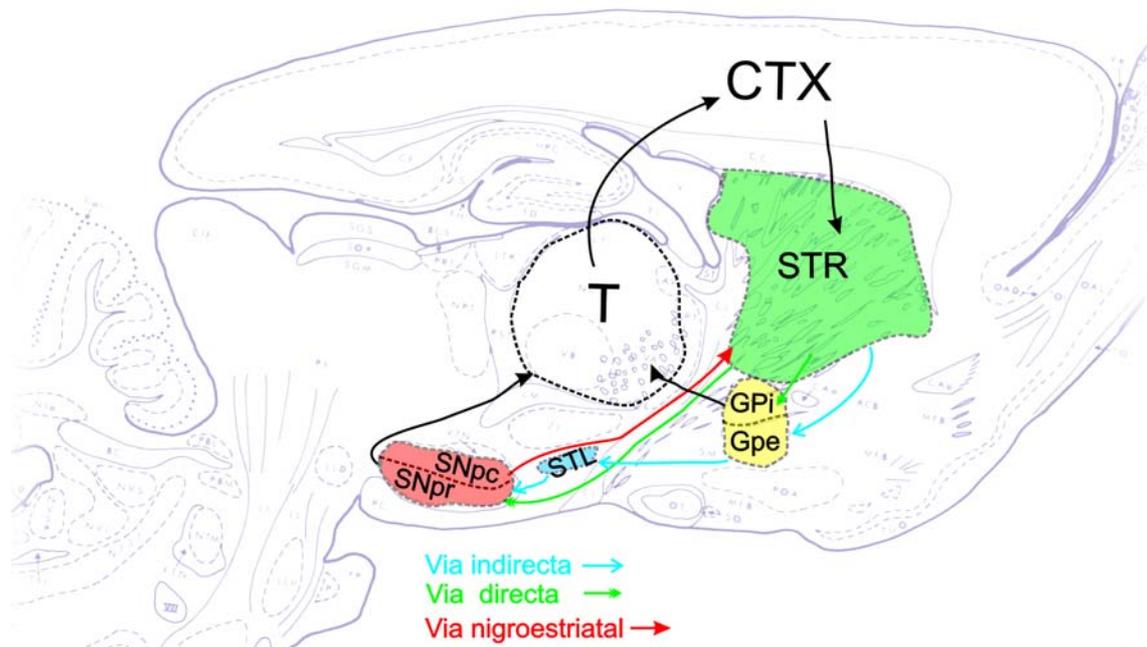
El núcleo estriado se considera la entrada al circuito de los ganglios basales y recibe aferencias desde diferentes regiones de la corteza cerebral (glutamatérgicas), también desde el núcleo intralaminar del tálamo (glutamatérgicas), desde la *pars compacta* de la sustancia negra (dopaminérgicas) y desde otros núcleos del tronco encefálico como el *locus coeruleus* (noradrenérgicas) y el rafe (serotoninérgicas). Regiones específicas de la corteza y tálamo proyectan a regiones específicas del núcleo estriado; por ejemplo, la corteza motora proyecta al núcleo putamen que participa en la regulación de los movimientos. En cambio, el núcleo caudado recibe aferencias que tienen que ver con el control de los movimientos oculares y con algunas funciones cognitivas (Bolam, J.P. y col., 2000; Parent, A. y Hazrati, L. N., 1995).

## ***Introducción***

---

Las neuronas del núcleo estriado emiten axones formando principalmente dos vías de conexión: la *vía directa*; que se dirige hacia el globo pálido interno (o medial) y a la sustancia negra *pars reticulata*, y la *vía indirecta*, cuyas proyecciones se dirigen al globo pálido externo y de éste hacia el núcleo subtalámico para luego converger hacia la sustancia negra *pars reticulata* (Bolam, J.P. y col., 2000; Gerfen, C.R., 1992; Smith, Y. y col., 1998).

Vemos así que una de las “zona diana” de las conexiones de las neuronas del núcleo estriado es la sustancia negra. Ésta emite axones dopaminérgicos hacia dos zonas, el núcleo estriado (vía nigro-estriatal) y el colículo superior. Para completar el circuito que interconecta los núcleos de los ganglios basales queda mencionar las eferencias de la sustancia negra y del globo pálido, de los cuales salen axones hacia el tálamo, y de este hacia el córtex cerebral.



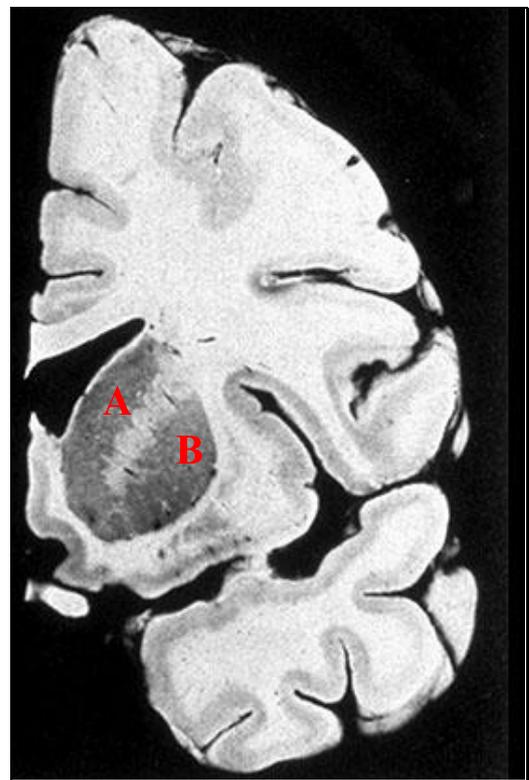
**Ilustración 2 Principales vías de conexión entre núcleos que comprenden los ganglios basales en el cerebro de rata.** Se puede observar como la vía directa sale del núcleo estriado hacia el tálamo a través del globo pálido interno o la sustancia negra *pars reticulata*, mientras que la vía indirecta conecta con los núcleos descritos a través del globo pálido externo y del núcleo subtalámico. Abreviaturas: CTX córtex, STR núcleo estriado, GPI globo pálido interno (o medial), GPe globo pálido externo (o lateral), STL núcleo subtalámico, SNpc sustancia negra pars compacta, SNpr sustancia negra pars reticulata, T tálamo.

Dentro de esta intrincada trama de conexiones, en las enfermedades neurodegenerativas aparecerá un patrón de alteración motora u otro dependiendo del núcleo concreto de los ganglios basales que degenera. De todo el conjunto que engloban los ganglios basales, los núcleos que estudiaremos con más detalle son el núcleo estriado y la sustancia negra.

### 1.1.1.- EL NÚCLEO ESTRIADO

Siendo tan importante para lo que concierne a esta tesis, es de obligada medida tener que dedicarle unas líneas y profundizar un poco en su organización estructural. Aunque pueda parecer una estructura “homogénea” que recibe masivamente conexiones de la corteza, este núcleo realmente está compartimentalizado en diferentes tipos de estructuras que se pueden dividir en base a su neuroquímica:

- Los Estriosomas, también llamados islotes intraestriatales: Están formados por poblaciones neuronales que reciben los axones de la corteza prefrontal y límbica. Son regiones ricas en receptores  $\mu$ -opíáceos y pobres en acetilcolinesterasa (Graybiel, A.M. y Ragsdale, C. W., Jr., 1978; Herkenham, M. y Pert, C. B., 1981).



*Ilustración 3 Sección de un cerebro humano donde se puede observar el núcleo estriado formado por A el núcleo Caudado, y B el núcleo Putamen.*

## ***Introducción***

---

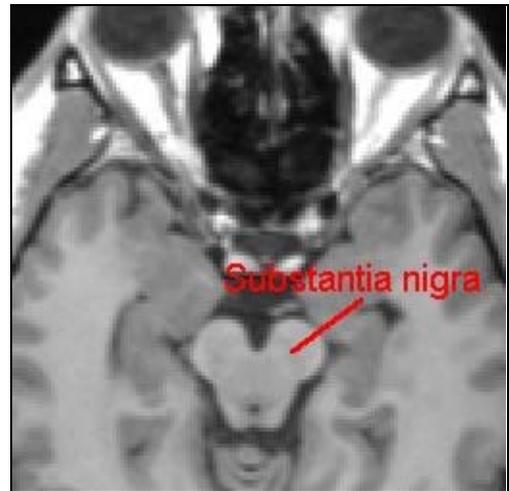
- La Matriz extra-estriosomal: La forman las neuronas estriatales calbindina positivas y plexos de fibras inmunoreactivas para la somatostatina (Gerfen, C.R., 1992). Estas neuronas reciben aferencias sensorimotoras desde la corteza frontal, parietal y occipital. Constituyen otro sistema más de convergencia y procesamiento de información de los que nos podemos encontrar en el cerebro.

Las neuronas de los estrisomas se generan durante el desarrollo en una etapa diferente a la matriz extra-estriosomal (van der Kooy D. y Fishell, G., 1987). Inicialmente estas poblaciones se pueden localizar mezcladas, pero a medida que el núcleo estriado madura postnatalmente la diseminación disminuye y se van reagregando formando propiamente los compartimentos estriosomales y matriz extra-estriosomal (Krushel, L.A. y col., 1989). Esta organización del núcleo estriado es crucial en el procesamiento correcto de la información dentro del conjunto de los ganglios basales (Parent, A. y Hazrati, L. N., 1995).

Respecto a los diferentes tipos neuronales que nos podemos encontrar en el núcleo estriado, la mayor población de neuronas que comprende un 95% del total, corresponde a las neuronas de tamaño medio con espinas dendríticas y son las que degeneran en la enfermedad de Huntington. Estas neuronas contienen el neurotransmisor GABA y son las que sus axones proyectan fuera del núcleo estriado. Con inmunotinciones frente a la proteína DARPP-32 pueden localizarse fácilmente. Estas neuronas de proyección pueden subdividirse a su vez, en dos poblaciones neuronales: Por una parte, existe la población de neuronas encefalinérgicas que proyectan al globo pálido externo (vía indirecta), y por otra las neuronas que contienen sustancia P y proyectan al globo pálido interno y a la sustancia negra (vía directa). El 5% de las neuronas restantes corresponden a interneuronas que contienen acetilcolina, somatostatina, óxido nítrico sintasa o parvalbúmina (Ferrante, R.J. y col., 1987), que curiosamente no degeneran, o apenas muy poco, a lo largo de la enfermedad de Huntington.

### 1.1.2.- LA SUSTANCIA NEGRA

La sustancia negra es otra región cerebral dentro del conjunto de ganglios basales que está muy interconectada con el núcleo estriado. Se divide en dos regiones, una muy poblada de neuronas principalmente dopaminérgicas, la *pars compacta* y la otra muy rica en arborizaciones dopaminérgicas y neuronas GABAérgicas, la *pars reticulata*.



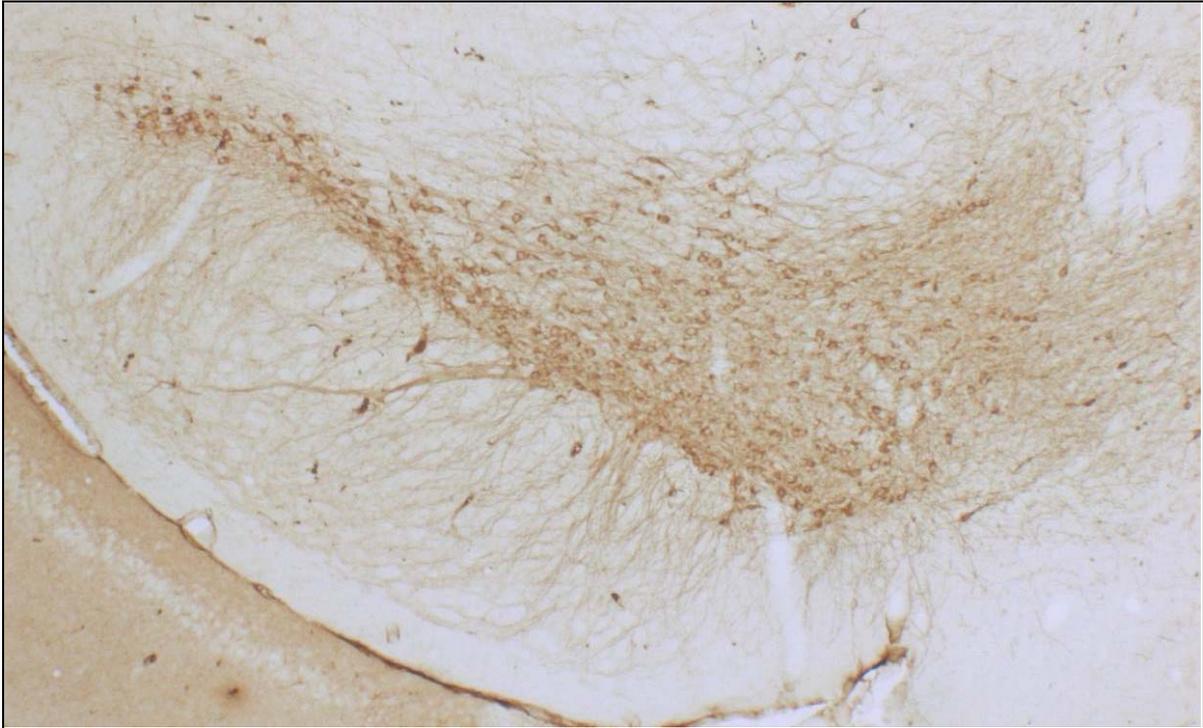
*Ilustración 4 Imagen por resonancia magnética donde se observa la sustancia negra.*

En la *pars compacta*, la población neuronal predominante está constituida por neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el núcleo estriado. Por ello, se usa como marcador de estas neuronas, un enzima específico de la síntesis de la dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH) (Dahlstrom, A. y Fuxe, K., 1964). Entre un 50 y 75% de las neuronas TH positivas también contienen una proteína queladora de calcio llamada calretinina, y un tercio de éstas contienen también calbindina (Gerfen, C.R., 1985; Isaacs, K.R. y Jacobowitz, D. M., 1994; Liang, C.L. y col., 1996; Resibois, A. y Rogers, J. H., 1992; Rogers, J.H., 1992).

En la *pars reticulata*, las neuronas que encontramos son principalmente GABAérgicas (Oertel, W.H. y col., 1982), que expresan además una proteína queladora de calcio, la parvalbúmina (Celio, M.R., 1990; Gerfen, C.R., 1985; Hontanilla, B. y col., 1997). No obstante, también podemos encontrar algunas neuronas dopaminérgicas en la parte ventral, aunque en mucha menor proporción que en la *pars compacta* (Beckstead, R.M. y col., 1979; Deutch, A.Y. y col., 1986; Faull, R.L. y Mehler, W. R., 1978).

## ***Introducción***

---



*Ilustración 5 Sustancia negra de ratón. Inmunotinción para la tirosina hidroxilasa (TH), se observa el marcaje para las neuronas dopaminérgicas de la SNpars compacta. En la pars reticulata (zona inferior) pueden verse alguna neurona dopaminérgica, y se aprecian muchas arborizaciones dendríticas. (Aumento 40x).*

Una vez vista la composición neuronal de la sustancia negra podemos entrar en detalle en las proyecciones que recibe (aférentes) y que surgen de ella (eferentes). Una gran cantidad de las conexiones que recibe la sustancia negra provienen del núcleo estriado. La mayoría de éstas llegan a la la *pars reticulata*. Estas aferencias pueden influenciar además de manera directa o indirecta a algunas neuronas de la *pars compacta*, ya que las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta poseen largas dendritas que se extienden hacia la *pars reticulata* (como se observa en la ilustración 5). Cabe mencionar que las fibras estriatonigrales tienen como principal neurotransmisor el GABA, aunque como se ha mencionado anteriormente, también expresan el neurotransmisor conocido como sustancia P. Otras conexiones aferentes que inervan la sustancia negra provienen del *globus pallidus*, que a través del núcleo subtalámico constituye parte de la mencionada vía indirecta, del *locus coeruleus* (noradrenérgicas) y de los núcleos del rafe (serotoninérgicas).

Las conexiones que emite la sustancia negra, se dividen entre las neuronas dopaminérgicas, que salen de la *pars compacta* y se dirigen hacia el núcleo estriado formando la vía nigro-estriatal, y las GABAérgicas, que emiten desde la *pars reticulata* y van hacia el tálamo, formando la vía nigrotalámica. Por último, hay una tercera vía de salida que envía axones al colículo superior, pero no tiene una localización definida, ya que los somas de las neuronas de esta vía se encuentran en zonas dispersas de la sustancia negra.

### 1.2.- ALTERACIONES CONDUCTUALES Y COGNITIVAS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

No hay ningún diagnóstico que pueda determinar con exactitud la edad de inicio de la enfermedad. En sus estadios iniciales se desarrollan anomalías motoras menores, temblor general, movimientos anormales de los ojos, movimiento excesivo e inapropiado de dedos, manos y pies durante estrés emocional, etc. que normalmente preceden a los signos obvios de la disfunción del circuito de los ganglios basales en un periodo de tiempo de unos 3 años (de Boo, G.M. y col., 1997). Recientemente se ha propuesto examinar la función oculomotora como biomarcador preclínico de la enfermedad (Blekher, T. y col., 2006; Golding, C.V. y col., 2006). En fases avanzadas de la enfermedad, el examen neurológico por técnicas de neuroimagen determina un cambio en el metabolismo de la glucosa en el núcleo estriado que se detecta mediante la tomografía de emisión de positrones (PET) (Holthoff, V.A. y col., 1993; Kuwert, T. y col., 1993). Los síntomas de la enfermedad principalmente sobrevienen por la degeneración del núcleo estriado. La disfunción del sistema motor comprende tres grandes afecciones motoras:

- Corea
- Rigidez y distonía (Berardelli, A. y col., 1999).

## ***Introducción***

---

- Disfunción oculomotora y de los movimientos voluntarios (van Vugt, J.P. y col., 2001), anormalidades en el habla y disfagia o dificultad para tragar (Leopold, N.A. y Kagel, M. C., 1985).

Como ya hemos dicho, el núcleo estriado se considera la entrada del circuito del control motor, aunque también interviene en algunas funciones cognitivas, así las conexiones que se establecen entre el núcleo estriado, la sustancia negra, el colículo superior y el tálamo conforma el circuito básico subcortical de la atención. Estudios recientes demuestran que los enfermos de Huntington tienen problemas en la comprensión y entendimiento (Ho, A.K. y col., 2006). También la planificación y secuenciación de movimientos se encuentra afectada, ya que las conexiones entre la región cortical dorsolateral y el núcleo caudado parecen tener una implicación en las funciones ejecutivas y otros déficits neuropsicológicos, mientras que lesiones en las conexiones del núcleo caudado con regiones corticales orbitofrontales y límbica originan alteraciones del comportamiento como memoria, desinhibición e irritabilidad (Montoya, A. y col., 2006).

Las primeras alteraciones psicológicas que se detectan en un enfermo de Huntington son la falta de concentración y los fallos en la memoria a corto plazo, depresión y cambios de humor, llegando a veces a un comportamiento agresivo y antisocial. De hecho, estos inesperados arrebatos de ira generan una gran tensión en las relaciones personales y familiares. Este periodo que precede al diagnóstico puede generar gran confusión y temor, porque no se entiende qué está pasando y por qué. La demencia de la enfermedad de Huntington es una demencia subcortical, y por tanto caracterizada en líneas generales por una bradifrenia o bradisiquia (enlentecimiento de las funciones mentales). Los defectos de memoria son precoces y afectan sobre todo a las estrategias de recuperación de la información previamente codificada. Cuando progresa la enfermedad se afectan más las funciones motoras implicadas en la manipulación de objetos, también aparecen conductas de perseveración.

Cabe mencionar que la mayoría de pacientes tienen pérdida de peso durante el curso de la enfermedad a pesar de tener una dieta adecuada (Pratley, R.E. y col., 2000). Entre los trastornos cognitivos que acontecen cuando la enfermedad ya se ha manifestado destacan la demencia subcortical que hemos mencionado junto a cambios afectivos y de la personalidad. Estos pacientes además presentan una dificultad para el aprendizaje, siendo sumamente difícil integrar nuevos conocimientos. Los cambios de humor y afectivos van desde una ansiedad e irritabilidad claramente definidas, hasta prolongados periodos de depresión. Además los pacientes sufren procesos maníacos y alucinaciones (Haddad, M.S. y Cummings, J. L., 1997; Rosenblatt, A. y Leroi, I., 2000).

### 1.2.1.- NEUROPATHOLOGIA

Aunque macroscópicamente todo el cerebro a menudo se presente atrofiado en las fases terminales de la enfermedad (Vonsattel, J.P. y col., 1985) o en los casos tempranos de enfermedad de Huntington (Henley, S.M. y col., 2006), la neuropatología como ya hemos dicho anteriormente se restringe inicialmente a una atrofia del núcleo estriado (ocurre primero en el núcleo caudado y luego en el putamen) llegando a una reducción de tamaño del 50-60%, aunque también se ha observado una menor degeneración en la corteza cerebral y en la sustancia negra (Mann, D.M. y col., 1993).

La organización matriz-estriosomas se mantiene hasta llegar a los estadios tardíos cuando la degeneración ya es muy severa. Cronológicamente, en las primeras etapas de la degeneración, la pérdida neuronal inicial se localiza en los estriosomas, y a medida que progresa la enfermedad llega a ser más severa en las matrices extra-estriosomales (Graveland, G.A. y col., 1985).

La *vía indirecta* queda afectada por la enfermedad antes que la *vía directa*. Es detectable debido a que sus neuronas expresan pro-enkefalinas/enkefalinas, lo que explica que los primeros

## ***Introducción***

---

síntomas manifestados sean hiperkinéticos. Estas neuronas son ricas en receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>. En cambio, la *vía directa* es diferenciable porque sus neuronas coexpresan preprotaquiquinas, sustancia P y receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> (Albin, R.L. y col., 1991; Reiner, A. y col., 1988). Obviamente si las neuronas degeneran, también tienen que perderse o alterarse los circuitos que ellas mismas forman (Richfield, E.K. y col., 1995; Sapp, E. y col., 1995). Recordando la “circuitaría” de los ganglios basales, tenemos en primer lugar la vía de proyección *cortico-estriatal*. Al degenerar el núcleo estriado, tenemos que una población de neuronas de la corteza, las piramidales de las capas III, V y VI se quedan sin un objetivo que inervar ocurriendo consecuentemente una pérdida neuronal selectiva de estas capas (MacDonald, V. y Halliday, G., 2002) llegando a producirse hasta un 30% de pérdida en toda la corteza (Cudkowiec, M. y Kowall, N. W., 1990; Hedreen, J.C. y col., 1991; Heinsen, H. y col., 1994; Sotrel, A. y col., 1991). En segundo lugar tenemos que a la pérdida de receptores dopaminérgicos se le suma una menor recaptación de la dopamina (Antonini, A. y col., 1996; Ginovart, N. y col., 1997; Sedvall, G. y col., 1994), éstos son rasgos característicos en pacientes asintomáticos de la enfermedad de Huntington que indican una alteración funcional de las células estriatales (Antonini, A. y col., 1996; Weeks, R.A. y col., 1996). Debido a esta menor recaptación de la dopamina puede observarse un incremento de los niveles de dopamina para mantener la función, que son detectables en el líquido cefalorraquídeo (Garrett, M.C. y Soares-da-Silva, P., 1992).

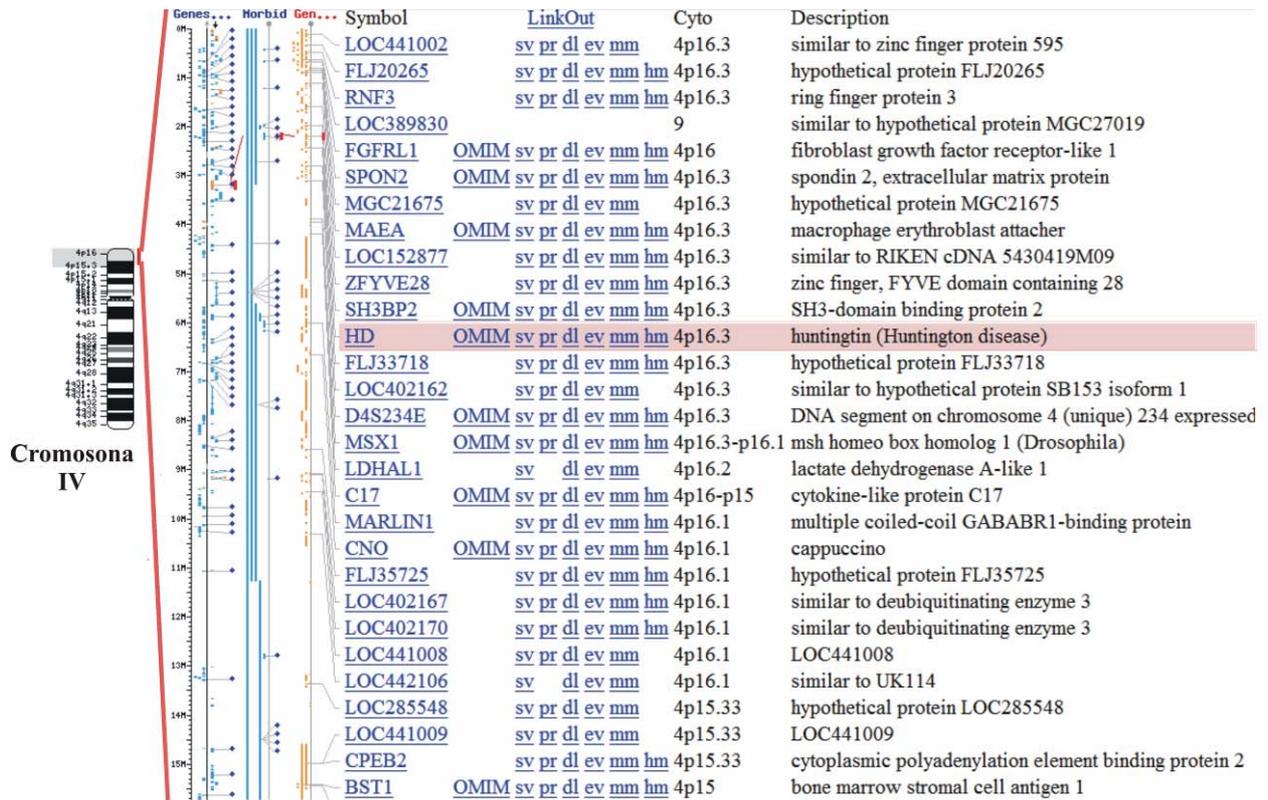
Después de ver las degeneraciones de todas estas vías, si efectuamos las técnicas inmunohistoquímica adecuadas, con cortes histológicos de cerebros provenientes de pacientes, podremos observar un patrón de agregados e inclusiones en una gran cantidad/proporción de células que no se detectan en individuos sanos. Estos son acúmulos de una proteína en un estado anómalo cuya modificación es el producto causante de la enfermedad. Esta proteína se la bautizó como huntingtina.

### 1.3.- LA PROTEINA HUNTINGTINA

Deliberadamente y hasta este punto he tratado de omitir al lector cuál es la alteración causante de la enfermedad de Huntington en pos de intentar exponer los datos como si hubiésemos hecho una recapitulación de la historia. Hace escasamente poco más de 20 años, un grupo de investigadores liderado por el Dr. Gusella detectaron un marcador polimórfico de DNA localizado en el cromosoma 4 humano para la enfermedad de Huntington (Gusella, J.F. y col., 1983). Diez años más tarde, en 1993 se localizó el gen responsable en ese cromosoma (The Huntington's Disease Collaborative Research Group., 1993) (aunque en animales, concretamente en los ratones este gen se encuentra situado en el cromosoma 5 (Altherr, M.R. y col., 1992; Grosson, C.L. y col., 1994)). El gen codifica la proteína huntingtina, y en individuos normales este gen presenta entre 9 y 34 repeticiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG, abreviada también como “q”). La anomalía o mutación consiste en una expansión del triplete CAG en el gen de la huntingtina (Lin, B. y col., 1995).

El gen es autosómico dominante, por lo cual, cualquier persona que herede el gen defectuoso acabará por desarrollar la enfermedad. La traducción de este gen mutado conlleva que la proteína tenga en el extremo N-terminal una cola de glutaminas (conocida como poliglutaminas o abreviadamente polyQ) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group., 1993). Los siguientes estudios se encaminaron hacia la caracterización del efecto que tenía el incremento de tripletes CAG en la enfermedad (Andrew, S.E. y col., 1993; Snell, R.G. y col., 1993) observando una correlación inversa entre el número de repeticiones y la edad de inicio de la enfermedad.

# Introducción



*Ilustración 6 Detalle de la región del cromosoma 4 humano donde se encuentra el gen que codifica para la huntingtina. En la actualidad los avances en genética molecular han permitido determinar su localización con gran precisión.*

## ORIGIN

```

1 matleklmka feslksfqqq qqqqqqqqqq qqqqqqqqqq ppppppppppp pqlpqqppqa
61 qpllpqpqp pppppppppp avaeplhrp kkelsatkkd rvnhclice nivaqsvrns
121 pefqkllgia melfllcsdd aesdvrnvad eclnkvikal mdsnlprlql elykeikkng
181 aprslraalw rfaelahlvr pqkcrpylvn llpcltrtsk rpeesvqetl aaavpkimas
241 fgnfandnei kvllkafian lksssptirr taagsavsic qhsrrtqyfy swllnvlgl
301 lvpvedehst llilgvlltl rylvpllqqq vkdtslkgsf gvtrkemevs psaeqlvqvy
361 eltlhhtqhq dhnvvtgale llqqflrtp pelltltav ggigqltaak eesggrsrsg
421 siveliaggg sscspvlsrk qkgkvllgee ealeddesr sdvsssalta svkdeisgel
481 aassgvstpg saghdiiteq prsqhtlqad svdlascldt ssatdgdeed ilshsssqs
541 avpsdpamd ndgtqasspi sdssqtteq pdsavtpps seivldgtdn qylglqigqp
601 qdedeatgi lpdeaseafr nssmalqqah llknmshcrq psdssvdkfv lrdeatepgd
661 qenkpcrikq digqstddd aplvhcvrll sasflitggk nvlvpdrdvr vskcalalsc

```

*Ilustración 7 Fragmento de la secuencia aminoacídica de la proteína huntingtina humana. Puede observarse la cadena de poliglutaminas identificada como "q", abreviatura de Glutamina. (Fuente DB: P42858 07-FEB-2006).*

La función de esta proteína no está claramente establecida, pero se sabe que es esencial durante el desarrollo embrionario y durante la neurogénesis (White, J.K. y col., 1997). Se ha observado que los ratones *knock-outs* para la huntingtina normal mueren en estado embrionario temprano, antes de E7.5 (Duyao, M.P. y col., 1995; Nasir, J. y col., 1995; Zeitlin, S. y col., 1995).

Estudios en ratones con una reducción del 50% de los niveles de huntingtina normal han evidenciado un desarrollo anormal del cerebro (Auerbach, W. y col., 2001; White, J.K. y col., 1997). También se ha detectado una muerte neuronal y disfunciones neurológicas en ratones heterocigotos para el gen homólogo de la huntingtina (Dragatsis, I. y col., 2000; Nasir, J. y col., 1995). Si efectuando una reducción drástica de la huntingtina normal en animales YAC128 (modelos con huntingtina mutada), se puede observar que acarrea un empeoramiento de la coordinación motora y un incremento de muerte por apoptosis (Van Raamsdonk, J.M. y col., 2005). Además, si tratamos de ir más allá, y en lugar de reducirla, conseguimos abolirla (generando para esto ratones “knock-out” condicionales de huntingtina normal) y efectuamos la depleción de la proteína justo después del nacimiento en estos animales, se observa un fenotipo de neurodegeneración progresiva similar a la enfermedad de Huntington (Dragatsis, I. y col., 1998). Todo esto nos muestra numerosas evidencias de la relación entre la degeneración (y muerte celular) que conlleva la enfermedad y la alteración de la huntingtina.

En células madre de ratones *knock-outs* para la huntingtina, cultivadas *in vitro* se obtienen un menor número de progenitores neuronales y hematopoyéticos (Metzler, M. y col., 1999; Metzler, M. y col., 2000). Así mismo, incrementando la expresión de la huntingtina normal se ha conseguido reducir la apoptosis después de estímulos tóxicos en ratones *in vivo* (Leavitt, B.R. y col., 2001; Zhang, Y. y col., 2003).

## Introducción

HUNTINGTINA NORMAL	PÉRDIDA DE FUNCIÓN O GANANCIA DE FUNCIÓN TOXICA DE LA HUNTINGTINA MUTADA
Participación en la transcripción de genes <sup>I</sup>	Alteración de la expresión génica <sup>II</sup>
Participación en el tráfico intracelular y reciclaje de membranas <sup>III</sup>	Alteraciones en la distribución y el tráfico celular de vesículas y endocitosis <sup>IV</sup>
Neuroprotección frente a la excitotoxicidad <sup>V</sup>	Alteraciones mitocondriales <sup>VI</sup>
Protección frente a la muerte apoptótica <sup>VII</sup>	Activación de caspasas y incremento de muerte apoptótica <sup>VIII</sup>
	Alteraciones sinápticas <sup>IX</sup>
	Empeoramiento de la conducta motora en modelos YAC 128 <sup>X</sup>
	Desarrollo anormal del cerebro <sup>XI</sup>
	Disfunciones neurológicas y muerte neuronal <sup>XII</sup>

I (Zuccato, C. y col., 2003)

II (Cha, J.H., 2000)

III (Gusella, J.F. y MacDonald, M. E., 1998)

IV (Gauthier, L.R. y col., 2004) (Hilditch-Maguire, P. y col., 2000)

V (Zhang, Y. y col., 2003) (Sun, Y. y col., 2001)

VI (Browne, S.E. y col., 1997; Gu, M. y col., 1996; Tabrizi, S.J. y col., 1999)

VII (Hackam, A.S. y col., 2000; Rigamonti, D. y col., 2000; Rigamonti, D. y col., 2001)

VIII (Leavitt, B.R. y col., 2001)

IX (Li, J.Y. y col., 2003)

X (Van Raamsdonk, J.M. y col., 2005)

XI (Auerbach, W. y col., 2001; White, J.K. y col., 1997)

XII (Nasir, J. y col., 1995; Zeitlin, S. y col., 1995)

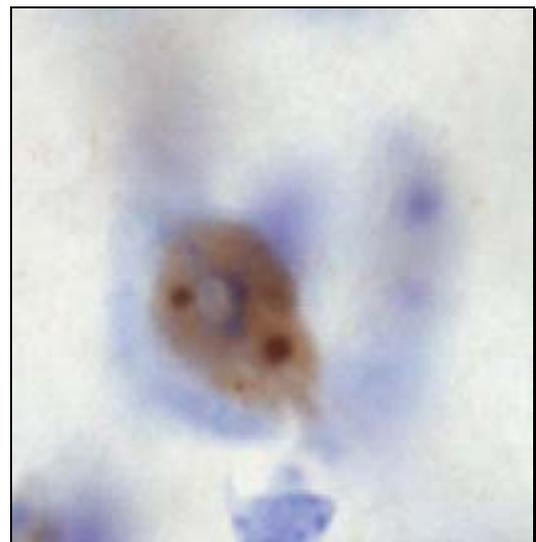
**Tabla 1** Comparación del papel que ejercen la huntingtina normal y la mutada. Las alteraciones que se dan en el contexto de la huntingtina mutada sobrevienen tanto por la pérdida de su correcta función como por la ganancia de nuevas funciones tóxicas.

La acumulación de fragmentos de caspasas escindidos (y por lo tanto activos) representa una alteración en el cerebro de los enfermos de Huntington. La escisión y por lo tanto, “liberación” de los fragmentos tóxicos de la huntingtina mutada debido a la acción de las caspasas es una posibilidad que hoy en día sigue cobrando fuerza, y se ha de tener en cuenta su participación conjunta dentro de los mecanismos bioquímicos que intervienen en la degeneración y muerte neuronal. Recientemente se ha demostrado que la participación de la caspasa-6 en la escisión de la huntingtina es importante para que se de la degeneración y disfunción neuronal en la enfermedad de Huntington (Graham, R.K. y col., 2006). Además dentro de las proteínas que interactúan con la

huntingtina está la proteína Hip1. La Hip1 es una proteína proapoptótica que ejerce su función a través de un mecanismo que incluye la activación de la caspasa 3 (Hackam, A.S. y col., 2000). La huntingtina normal se une a la Hip1 e inhibe su efecto apoptótico. Cuando la huntingtina se halla mutada se observa una menor interacción con Hip1 (Kalchman, M.A. y col., 1997), esto permite que se produzca una mayor heterodimerización de Hip1 con la proteína Hippi. El incremento de los heterodímeros Hip1-Hippi a su vez recluta a las procaspasas-8 que se activan e inician a su vez la cascada de muerte celular (Gervais, F.G. y col., 2002; Mattson, M.P., 2002; Sanchez, I. y col., 1999). Estudios recientes sobreexpresando Hippi en líneas celulares ha desvelado un incremento de la fragmentación nuclear y activaciones de las caspasa-1, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-6 y caspasa-3 así como una liberación del citocromo-c y del factor inductor de apoptosis (AIF) mitocondriales (Majumder, P. y col., 2006).

Asimismo, dentro de diferentes modelos celulares, cuando se incrementan los niveles de huntingtina normal, esta ejerce una protección frente a la muerte neuronal apoptótica en respuesta a estímulos tóxicos (Cattaneo, E. y col., 2001; Gervais, F.G. y col., 2002) actuando a un nivel superior de la caspasa 3 e inhibiendo el procesamiento de la procaspasa 9 (Hackam, A.S. y col., 2000; Rigamonti, D. y col., 2000; Rigamonti, D. y col., 2001).

La reducción de los niveles de huntingtina afectan la morfología y distribución de las organelas celulares (Hilditch-Maguire, P. y col., 2000). La proteína huntingtina se ha detectado asociada a microtúbulos y vesículas sinápticas, lo que sugiere que desempeña un papel en el tráfico intracelular de



*Ilustración 8 Agregados de huntingtina intranucleares. Inmunotinción Nissl-EM48. 1000x*

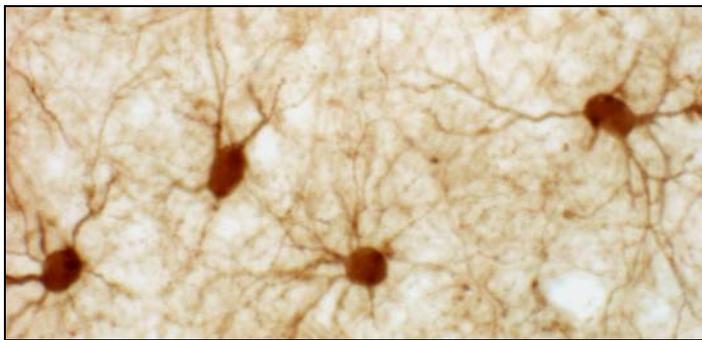
## ***Introducción***

---

vesículas (Charrin, B.C. y col., 2005; Sapp, E. y col., 1997; Takamoto, T. y col., 1997), en el tráfico axonal (Block-Galarza, J. y col., 1997; Lee, W.C. y col., 2004; Trushina, E. y col., 2004) o bien en el tráfico de membranas, tanto por la interacción con proteínas involucradas en la endocitosis y exocitosis (Suopanki, J. y col., 2006) como por la interacción electrostática con fosfolípidos ácidos (Kegel, K.B. y col., 2005). Estudios recientes han demostrado que las propiedades antiapoptóticas de la huntingtina están ligadas, al menos en parte, a la capacidad de promover el transporte vesicular intracelular del factor neuroprotector BDNF (Gauthier, L.R. y col., 2004; Humbert, S. y Saudou, F., 2004) y al desplazamiento mitocondrial tanto en modelos de *Drosophila melanogaster* como en ratones *knock-out* para la huntingtina (Gunawardena, S. y col., 2003; Trushina, E. y col., 2004) y que éste se ve severamente afectado cuando se forman agregados citoplasmáticos de huntingtina mutada (Chang, D.T. y col., 2006). Sin embargo, la huntingtina también puede localizarse en el núcleo (De Rooij, K.E. y col., 1996; Kegel, K.B. y col., 2002) y esta translocación del citoplasma hacia el núcleo ocurre vía formación de complejos ternarios con GAPDH (enzima que tiene un papel crítico en el metabolismo de la glucosa, y recuerdo que ésta es casi la única fuente de energía de las neuronas) (Bae, B.I. y col., 2006). La GAPDH también actúa como mensajero intracelular de la muerte mediada por apoptosis (Hara, M.R. y Snyder, S. H., 2006), con lo cual, su unión con la huntingtina puede promover una mayor vulnerabilidad celular hacia las respuestas pro-apoptóticas. También se ha observado que la huntingtina puede regular el control de determinados genes en ratones, como por ejemplo el RE1/NRSE (Zuccato, C. y col., 2003) y factores de transcripción (Petersen, A. y Brundin, P., 1999; Reddy, P.H. y col., 1999) de entre ellos, el que controla la expresión del factor neuroprotector BDNF (Zuccato, C. y col., 2001).

Cuando en el gen de la huntingtina el número de repeticiones del triplete CAG se eleva a más de 35, se considera que la proteína codificada pasa a ser anómala y se cataloga como mutante (Alberch, J. y col., 2004; McMurray, C.T., 2001; Petersen, A. y Brundin, P., 1999). La cadena de poliglutaminas es tóxica y su escisión de la proteína o incluso su expresión ectópica en modelos

animales normales causa la formación de inclusiones y posteriormente muerte neuronal (Ordway, J.M. y col., 1997). Numerosos estudios se han llevado a cabo mostrando evidencias de que los fragmentos cortos de la expansión de poliglutaminas expresados tanto en animales transgénicos como en líneas celulares, son más tóxicos que la proteína huntingtina entera (o el agregado de huntingtina) con las mismas repeticiones de poliglutaminas (Davies, S.W. y col., 1997; Hackam,



*Ilustración 9 Las interneuronas estriatales no mueren en el transcurso de la enfermedad. Immunotinción de interneuronas parvalbúmina positivas, núcleo estriado de ratón mutante (400x).*

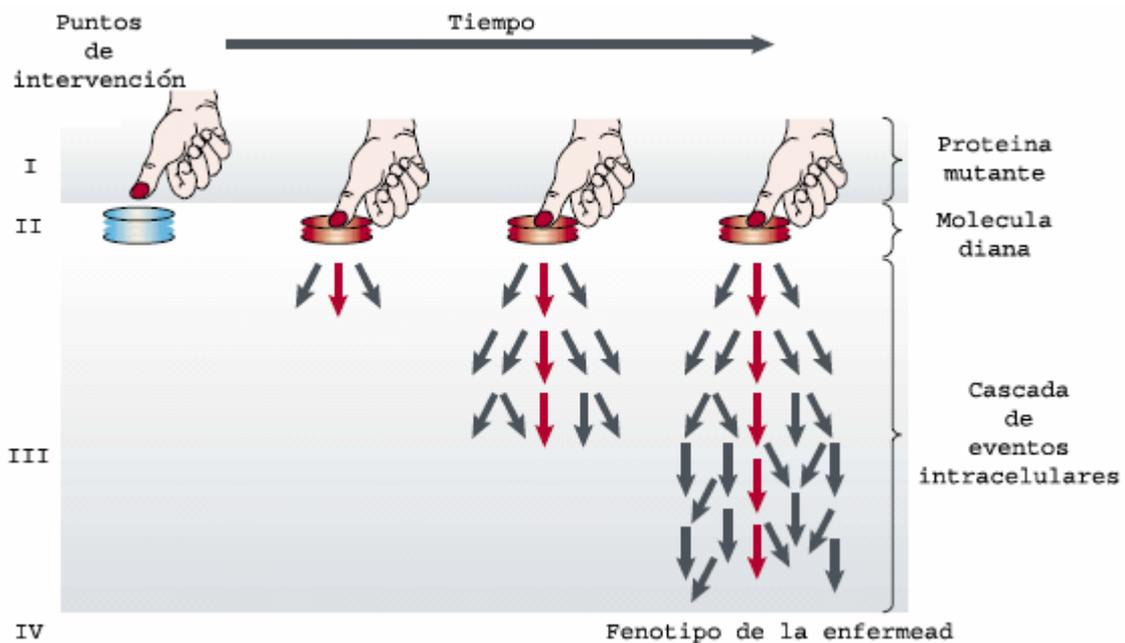
A.S. y col., 1998; Hodgson, J.G. y col., 1999; Lunkes, A. y Mandel, J. L., 1998; Reddy, P.H. y col., 1998; Schilling, G. y col., 1999; Slow, E.J. y col., 2006). Aun así, cabe mencionar que no todas las neuronas que tienen inclusiones acaban degenerando, ya que las interneuronas estriatales no mueren

(Kosinski, C.M. y col., 1999; Meade, C.A. y col., 2002). Entonces, con la proteína mutada entran en escena las siguientes variaciones críticas que alteran el sistema apartándolo de su estado normal:

- 1.- La Huntingtina mutada pierde las funciones beneficiosas propias para la cuál fue sintetizada.
- 2.- La cadena de poliglutaminas le confiere ganancia de unas nuevas funciones tóxicas para la propia célula.

## Introducción

Usando vectores lentivirales que codifican para el fragmento mutante de la huntingtina en cultivos primarios se ha observado una degeneración progresiva (Zala, D. y col., 2005), así la mutación en la huntingtina es el punto de origen de una cascada de eventos que conducen a la degeneración y muerte de estas poblaciones neuronales. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a la muerte selectiva de las neuronas estriatales son aún desconocidos. La huntingtina se encuentra de forma ubicua en todas las neuronas del cerebro y en otros tejidos no neuronales, y su expresión no correlaciona especialmente con el patrón de degeneración neuronal (Fusco, F.R. y col., 1999), por ejemplo, la huntingtina mutada se encuentra tanto en las neuronas estriatales como en las del hipocampo, sin embargo, avanzada la enfermedad, en el primero es donde se observa una mayor degeneración y muerte. También se han realizado estudios para caracterizar el patrón de poliglutaminas observado en diferentes tejidos fuera del sistema nervioso central observando que



**Ilustración 10** Esquema del proceso patológico en la enfermedad de Huntington, donde se observa la evolución temporal de acontecimientos intracelulares en diversos estadios secuenciales. La mano representa la proteína huntingtina. El dedo rojo es la mutación. El primer objetivo de la proteína mutada se ha representado como un botón azul, cuando interaccionan ("se activa") pasa a color rojo. Entonces se desarrollan toda una serie de eventos que causan cambios en la neurona (flechas grises) de entre los cuales algunos (flechas rojas) contribuyen a la muerte de las neuronas más susceptibles. Fuente: (Gusella, J.F. y MacDonald, M. E., 2000).

también se hallan presentes en el músculo esquelético y el hígado mayoritariamente (Sathasivam, K. y col., 1999). Para tratar de esclarecer como sobreviene la disfunción y la muerte específica en la población neuronal estriatal debemos de conocer los mecanismos moleculares que operan en la enfermedad a través de los cuales sobreviene la muerte neuronal.

### 1.3.1.- MODELOS ANIMALES PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Los modelos experimentales abarcan desde líneas de cultivos celulares hasta los primates pasando por los organismos menores como las moscas del vinagre *Drosophila melanogaster* (Gunawardena, S. y col., 2003), gusanos *Caenorhabditis elegans* (Segalat, L. y Neri, C., 2003), peces Zebrafish *Danio rerio* (Karlovič, C.A. y col., 1998; Miller, V.M. y col., 2005), mamíferos, de entre ellos ratas *Rattus sp.* (Kantor, O. y col., 2006; von Horsten, S. y col., 2003) y ratones *Mus musculus* (Hodgson, J.G. y col., 1999; Mangiarini, L. y col., 1996). Dentro de estos últimos, los ratones son los mamíferos que más ventajas ofrecen debido a que tienen un ciclo reproductivo muy corto y el tamaño de sus camadas son muy grandes. Los avances científicos de esta última década han logrado crear y establecer una gran variedad de ratones mutantes para tratar de reproducir el patrón de alteraciones para enfermedades neurodegenerativas, así se establecen como el mejor modelo de la enfermedad de Huntington.

Dentro de los animales modificados genéticamente se pueden subdividir en dos grandes grupos: Los animales transgénicos y los animales “Knock-in”.

## ***Introducción***

---

### 1.3.1.1.- MODELOS DE ANIMALES TRANSGÉNICOS PARA EL EXÓN I DE LA HUNTINGTINA MUTADA

A los animales transgénicos se les añade el fragmento de ADN exógeno mutante a su genoma (puede codificar para toda la proteína, o sólo para la región anómala). Usando una construcción con el plásmido de ADN con la secuencia del gen que queremos introducir, mediante técnicas de ADN recombinante y micromanipulación o transfección se introduce este nuevo gen al azar en la célula diana para que se inserte en el genoma celular. Entre estos modelos de animales transgénicos destacamos los ratones “R6”, el modelo condicional y los ratones “YAC”.

Los modelos “R6” (R6/2 y R6/1) son los animales transgénicos para la enfermedad de Huntington más estudiados y mejor caracterizados hoy en día. Introduciendo así la secuencia que contienen la expansión de repeticiones CAG propia de individuos enfermos (Davies, S.W. y col., 1997; Mangiarini, L. y col., 1996; Martindale, D. y col., 1998) se ha logrado que los ratones que normalmente no tenían variaciones en el número de repeticiones CAG en el gen huntingtina, recibieran la porción de gen expandida anómala bajo el promotor endógeno de la huntingtina. Se ha observado que en estos ratones mutantes con más de 100 repeticiones, el gen y la proteína se expresan con patrones normales (Davies, S.W. y col., 1997; Mangiarini, L. y col., 1996), sin embargo a medida que avanza la edad de los animales estos muestran movimientos coreicos, temblor y estereotipias involuntarias. Además muestran un fenotipo característico denominado “clasping” que lo efectúan nada más cojerlos por la cola y levantarlos, enseguida los animales enfermos juntan las cuatro extremidades sobre el vientre y ya no se liberan de esa postura hasta que no los depositemos de nuevo sobre una superficie (Mangiarini, L. y col., 1996). Aunque se desconozcan los mecanismos que median la fisiopatología de este movimiento, el “clasping” es utilizado como comprobación del fenotipo del ratón debido en parte a que es fácil y rápido de efectuar. Otra de las alteraciones que expresan los ratones R6/1 y R6/2 es la propensión a sufrir

ataques con espasmos musculares provocados por fuertes ruidos imprevistos o, ocasionalmente provocados por la ansiedad al ser cogidos y levantados por la cola (Mangiarini, L. y col., 1996). Se



*Ilustración 11 Observamos el fenotipo “clasping” en los ratones mutantes (derecha). Nótese que cualquier ratón normal (izq.) tiene como acto reflejo intentar localizar una zona donde posarse.*

ha descrito que en algunos casos los ratones han llegado a morir como resultado de este estado de *myoclonus* o shock epiléptico (Mangiarini, L. y col., 1996), pero todavía no se conoce el mecanismo que subyace a ese tipo de muerte.

Aunque los modelos R6/2 y R6/1 sean diferentes en cuanto al número de tripletes CAG y el nivel de expresión de éstos, analizando los datos conjuntamente observamos que ambos tipos de ratones son de tamaño considerablemente menor que sus hermanos normales. Otras alteraciones que presentan es la pérdida de fertilidad. Las hembras R6/2 son estériles, mientras que los machos

## ***Introducción***

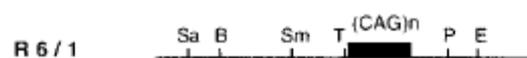
---

R6/2 tienen una ventana fértil más corta de tiempo que los R6/1 antes de quedar estériles. La autopsia efectuada a los ratones de las dos líneas después de morir por la enfermedad revela que los órganos reproductores masculinos quedan atrofiados (Mangiarini, L. y col., 1996). Se ha observado que hay una reducción del número de neuronas hipotalámicas que expresan la hormona liberadora de gonadotropina, se piensa que esto podría causar la progresiva atrofia gonadal (Papalexí, E. y col., 2005). Aparte de estas características comunes entre estos dos modelos, podemos entrar en un poco más de detalle dentro de cada uno.

### 1.3.1.1.1.- MODELOS R6/1

Generados por microinyección de una única célula en embriones CBA/C57BL6, los ratones R6/1 tienen un único fragmento de DNA integrado en el genoma. Este fragmento del exón 1 mutado de la huntingtina humana sólo codifica para 115 repeticiones del triplete CAG (Mangiarini, L. y col.,

1996) y la expresión del transgén es sólo del 31% respecto a la huntingtina endógena (Menalled, L.B. y Chesselet, M. F., 2002). Esto conlleva que la enfermedad no se exprese de manera tan agresiva como ocurre en los R6/2, llegando a retardar el inicio de la enfermedad hacia las 16 semanas de vida, cuando empieza a observarse un deterioro de la coordinación motora sin que se produzcan alteraciones en los niveles de BDNF (Hansson, O. y col., 2001). Junto con estas alteraciones cursa una atrofia específica de las neuronas de tamaño medio con espinas dendríticas que repercute en una masiva disminución del neuropilo, degeneración que queda reflejada en una disminución del 17% del volumen estriatal (Hansson, O. y col., 1999; Klapstein, G.J. y col., 2001). El hecho de que la enfermedad no progrese tan rápidamente como en el R6/2 nos brinda una excelente oportunidad para poder estudiar paulatinamente todos los eventos de la progresión de la

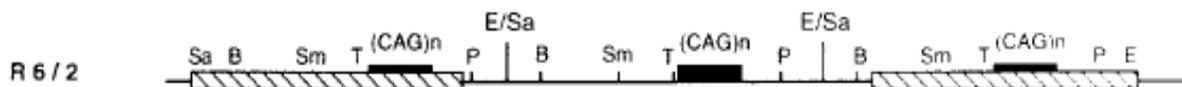


**Ilustración 12** *Organización genómica del emplazamiento del transgen del exón I. A diferencia del R6/2 (ver ilustración 13), el transgen (CAG)<sub>n</sub> en el R6/1 se encuentra integrado sólo una vez en el genoma.*

enfermedad y tratar de efectuar terapias de neuroprotección, dentro de un plazo de tiempo razonable y con mayores esperanzas de éxito.

### 1.3.1.1.2.- MODELOS R6/2

Los ratones R6/2 son los que poseen un número de tripletes CAG del orden de 144 repeticiones. En este modelo, a diferencia del R6/1, se integraron tres copias del transgén dentro del genoma (Mangiarini, L. y col., 1996). La expresión de éstos es alrededor del 75% respecto a la expresión de la huntingtina normal (Menalled, L.B. y Chesselet, M. F., 2002).



**Ilustración 13 Organización genómica de los emplazamientos de los transgenes del exón I.** *Notese como para el R6/2 el transgen (CAG)*n* se repite tres veces consecutivas.*

La enfermedad en estos ratones es muy rápida, empezando la disfunción de la coordinación motora hacia las 5 semanas (tan solo unos pocos días después del destete) con una velocidad de progresión vertiginosa, falleciendo a las 10-13 semanas de edad. Los síntomas iniciales en el R6/2 empiezan hacia las 3 semanas de vida, donde se puede observar que los ratoncitos muestran una hiperactividad motora anormal (Luesse, H.G. y col., 2001). A partir de este punto, empiezan a mostrar las dificultades en el aprendizaje y la memoria, observable a lo largo del tiempo en el test “Morris water maze”. Estas dificultades gradualmente van empeorando hasta la séptima semana de vida, a partir de la cual ya es muy difícil llevar a cabo el test debido a los severos déficits motores (Lione, L.A. y col., 1999; Luesse, H.G. y col., 2001; Murphy, K.P. y col., 2000). Aunque el R6/2 inicialmente sea hiperactivo, a lo largo del tiempo va reduciendo su actividad motora hasta el punto que a las 8 semanas pasa a ser hipoactivo (Carter, R.J. y col., 1999). A su vez, a medida que reduce

## ***Introducción***

---

su actividad motora empieza a mostrar el fenotipo “clasping”. Otros fenotipos que también muestran se basan en el cambio en la conducta, como lo es el rascarse de manera estereotipada las vibrisas con las patitas delanteras (*hindlimb grooming*), cambiar la forma de andar (observable mediante la técnica del “*foot-printing*”), o incluso empiezan a aflorar algunos movimientos esporádicos involuntarios.

La disfunción motora acompaña otros síntomas conductuales como temblores, ataques epilépticos seguidos de movimientos abruptos e incontinencia urinaria (Davies, S.W. y col., 1997; Lione, L.A. y col., 1999). El peso del animal disminuye progresivamente a partir de las 8 semanas de vida con una celeridad tal que a las 12 semanas de vida tienen una reducción del 40% del peso de un ratón normal. La coordinación motora también se deteriora progresivamente, y puede detectarse mediante la prueba del Rota-Rod, llegando a ser muy patente entre las 8 y 12 semanas de vida (Carter, R.J. y col., 1999; Luesse, H.G. y col., 2001). A nivel del patológico, aunque hasta estadios tardíos no evidencian una pérdida neuronal del núcleo estriado ni de otras regiones (Turmaine, M. y col., 2000), los cerebros de estos animales pesan un 20% menos a las 12 semanas de vida cursando una aparente densidad neuronal normal (Davies, S.W. y col., 1997). En la última etapa de vida de los animales se observa una reducción del número de células tanto en el núcleo estriado dorsal como en el córtex frontal y en la capa de células de Purkinje del cerebelo (Rubinsztein, D.C., 2002). Centrándonos en los agregados de poliglutaminas, cabe reseñar que no se han observado en astrocitos, oligodendrocitos, ni en células microgliales, localizándose principalmente en las neuronas estriatales y corticales formando inclusiones tanto citoplasmáticas como nucleares (Davies, S.W. y col., 1997) acorde con el patrón de inclusiones observado en humanos (DiFiglia, M. y col., 1997; Gutekunst, C.A. y col., 1999). Las neuronas presentan un menor número de espinas dendríticas (Klapstein, G.J. y col., 2001). Esto conlleva que la aparición de agregados de huntingtina y ubiquitina intranucleares observados en los ratones, están

directamente relacionados con el subsecuente desarrollo de las alteraciones neurológicas (Davies, S.W. y col., 1997).

Los ratones R6/2 también han sido utilizados para realizar estudios con ácido kaínico evidenciando así el papel que juega la excitotoxicidad en estos ratones modelo de la enfermedad de Huntington (Morton, A.J. y Leavens, W., 2000). No obstante, para estudios de neuroprotección han resultado ser claramente inviables muy probablemente debido a la rápida progresión de la enfermedad (Popovic, N. y col., 2005), que se podría equiparar a la forma juvenil de la enfermedad en humanos (Maat-Schieman, M.L. y col., 1999).

### 1.3.1.2.- MODELOS TRANSGÉNICOS CONDICIONALES PARA LA HUNTINGTINA

Aunque técnicamente sean también modelos transgénicos, la peculiaridad de ser un modelo en que se puede expresar la enfermedad de Huntington a voluntad del investigador ha merecido hacerles un apartado particular. En estos animales, la expresión del transgén es inducible y dependiente de la actividad de un activador transcripcional. Así por ejemplo, en los ratones HD94, la expresión del transgén está regulada condicionalmente por la tetraciclina y consiste en el exón 1 con 94 glutaminas. El sistema Tet-Off (Yamamoto, A. y col., 2000) permite explorar la posible reversión de la neuropatología y sintomatología administrando a estos animales transgénicos tetraciclina o sus derivados como la doxiciclina (Díaz-Hernandez, M. y col., 2005; Martin-Aparicio, E. y col., 2001; Martin-Aparicio, E. y col., 2002).

En el modelo transgénico para la huntingtina mutada la expresión continuada del transgén ocurre en ausencia de tetraciclina (modelo Tet-Off), logrando que a las 18 semanas de vida presenten una clara atrofia estriatal con disfunción motora y reducción de receptores estriatales dopaminérgicos D<sub>1</sub>. Administrando tetraciclina o doxiciclina, un análogo que cruza mejor la barrera

## ***Introducción***

---

hematoencefálica, se inhibe la transcripción del gen. Con una administración continuada durante 16 semanas de doxiciclina se ha demostrado que es suficiente para recuperar la atrofia estriatal y lograr hacer desaparecer la formación de agregados de poliglutaminas (Martín-Aparicio, E. y col., 2001). Este tipo de ratones también ha permitido profundizar en el propio estudio de los filamentos de huntingtina demostrando que en estados avanzados, con el debido tiempo pueden ser eliminados de las células observándose así una reversión del fenotipo esperable (Díaz-Hernández, M. y col., 2004). Se ha observado una recuperación motora junto a la desaparición de los agregados de huntingtina, resultado de suma importancia porque abre nuevas esperanzas hacia el estudio de fármacos o compuestos cuya acción terapéutica se enfoque hacia la degradación de éstos pudiendo tener también una especial relevancia en la mejora de los trastornos motores en los pacientes humanos.

### 1.3.1.3.- MODELOS “YAC” PARA LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

El término “YAC” hace referencia al cromosoma artificial de levadura (Yeast Artificial Chromosome) que se emplea como vector de clonación de grandes fragmentos de ADN, que en nuestro caso contendría el ADN para codificar la proteína huntingtina. Los ratones YAC expresan la forma completa de la huntingtina mutada, bajo el control del promotor de la huntingtina endógena. A nivel tisular y dentro del desarrollo del animal se expresa de manera idéntica a la proteína endógena del animal (Hodgson, J.G. y col., 1996; Hodgson, J.G. y col., 1999). Con 18 repeticiones CAG se genera un animal control. A partir de las 46 repeticiones CAG logramos tener animales “mutantes” para la huntingtina, longitud de poliglutaminas que se equipara bastante a las que nos encontramos en humanos. Estos ratones también tienen una disminución de la producción de BDNF (Zuccato, C. y col., 2001). No obstante tienen la contrapartida de sufrir la degeneración neuronal hacia los 12 meses de vida, con lo cual tenemos las mismas desventajas para su uso que los modelos “Knock-in” (Hodgson, J.G. y col., 1999).

**1.3.1.4.- MODELOS DE ANIMALES “KNOCK-IN” PARA LA HUNTINGTINA**

Los animales “knock-in” a diferencia de los transgénicos, se caracterizan por la sustitución del gen normal de interés por otro mutante, logrando así mimetizar la alteración genética producida por la enfermedad. La precisión de la sustitución genética, permite que se reproduzca más fielmente la anomalía causante de la aparición de la enfermedad. Así, al igual que en humanos, los ratones manifiestan la enfermedad en estadios medianos y tardíos de la vida del animal necesitando esperar largo tiempo para tener la neuropatología y muerte neuronal. Aunque como modelo presente sus diferencias, ya que estos ratones, a diferencia de los pacientes con enfermedad de Huntington, no presentan déficits motores robustos.

Modelo de ratón “knock-in”	Número de tripletes CAG	Edad fenotipo patológico
<i>hdh<sup>(CAG)150</sup> I</i>	150	2 meses
CAG94 II	94	9 meses
<i>hdh140Q</i> III	140	12 meses
<i>hdhQ92/hdhQ92</i> IV	92	14 meses y medio
<i>hdhQ111</i> V	111	24 meses

I (Lin, C.H. y col., 2001)      II (Levine, M.S. y col., 1999)      III (Menalled, L.B. y col., 2003)  
IV (Wheeler, V.C. y col., 2000)      V(Wheeler, V.C. y col., 2002)

*Tabla 2. Tabla comparativa donde se muestra el tiempo que ha de transcurrir para la aparición del fenotipo claramente patológico de diferentes ratones “knock-in” como modelo de enfermedad de Huntington.*

**1.4.- MECANISMOS MOLECULARES DE LA MUERTE NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

Clásicamente, el estudio de la implicación de los mecanismos moleculares en la muerte neuronal se ha llevado a cabo alterando las condiciones celulares normales forzando a que el

## ***Introducción***

---

sistema se desborde debido a: 1) Un exceso del neurotransmisor glutamato, acarreado una excitotoxicidad por despolarizaciones sucesivas de la membrana neuronal; 2) La disminución del metabolismo energético de las neuronas alterando la ruta metabólica de la cadena respiratoria mitocondrial y provocando así una depleción de energía dentro de la célula; 3) disminución trófica alterando los niveles de factores neuroprotectores como las neurotrofinas y el GDNF, ésta disminución conjuntamente con las dos anteriores causas podría acelerar el fatal desenlace. Así, no queda descartado que estas tres causas puedan interactuar conjuntamente facilitando la muerte neuronal estriatal selectiva que se observa en la enfermedad de Huntington. Por tanto pasemos a detallar cada una de estas alteraciones.

### **Mutación de la huntingtina**



*Ilustración 14 Hipótesis de los mecanismos tóxicos de la huntingtina mutada.*

#### 1.4.1.- IMPLICACIÓN DE LA EXCITOTOXICIDAD

El principal aminoácido neurotransmisor excitador en el cerebro es el glutamato. Éste regula la vía corticoestriatal y por tanto el núcleo estriado tiene una elevada cantidad de receptores localizados principalmente en las neuronas de proyección. Se han identificado diferentes clases de receptores que podemos dividirlos entre receptores *ionotrópicos* y receptores *metabotrópicos* ligados a proteína G.

- Receptores ionotrópicos: Son complejos moleculares que contienen tres dominios transmembrana denominados M1, M3, M4 y una porción reentrante en la membrana denominada M2 que confiere distintas selectividades iónicas de los canales. Así hay tres tipos de receptores ionotrópicos y se clasifican en dos subclases (Hollmann, M. y Heinemann, S., 1994; Watkins, J.C. y Evans, R. H., 1981):

1.- NMDA (N-metil-D-aspartato): Los agonistas son el NMDA y también el ácido quinolínico.

2.- No NMDA:

2.1.- *AMPA* (Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato):  
con agonistas selectivos AMPA.

2.2.- *KAINATO*: con el ácido kaínico como agonista (Doble, A., 1995;  
Lipton, S.A. y Rosenberg, P. A., 1994).

Cuando los receptores ionotrópicos se activan, se vuelven permeables a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Na}^+$ , y éstos entran a través del canal alterándose así la carga o el potencial de membrana efectuándose una despolarización. Así estos receptores modulan respuestas rápidas de las neuronas cuando reciben el glutamato.

## ***Introducción***

---

- Receptores metabotrópicos: Son receptores acoplados a proteína G modulando la producción de segundos mensajeros intracelulares. Por ejemplo, los subtipos de receptores metabotrópicos mGluR1 y mGluR5, activan a fosfolipasa C, mientras que los subtipos de receptores mGluR6 está acoplado a la activación de la GMPc fosfodiesterasa. (Schoepp, D.D. y Sacaan, A. I., 1994). Los receptores metabotrópicos modularían respuestas más lentas cuando se les une el glutamato.

Por ello, destruir las neuronas del núcleo estriado inyectando aminoácidos excitadores (DiFiglia, M., 1990; Olney, J.W., 1969) fue uno de los primeros métodos para poder reproducir los síntomas de la enfermedad en animales con la finalidad de usarlos como modelo de estudio. Así se acuñó el término como “modelo excitotóxico”. En 1976 Coyle y Schwarcz observaron que la inyección intraestriatal de ácido kaínico, el agonista del receptor kainato, podía producir lesiones similares a las observadas en la enfermedad. Estas fueron las primeras observaciones que vincularon la excitotoxicidad a la patogénesis concreta de la enfermedad de Huntington (Coyle, J.T. y Schwarcz, R., 1976; McGeer, P.L. y McGeer, E. G., 1978). Posteriormente se ha demostrado que el agonista del receptor de glutamato NMDA que mejor reproduce la neuroquímica de la enfermedad es el ácido quinolínico (Beal, M.F. y col., 1991).

Cuando se efectúa una inyección de aminoácidos excitadores se puede observar como en el punto de inyección las neuronas están lesionadas mientras que las fibras aferentes, los componentes no neuronales y las interneuronas estriatales no se encuentran afectadas. Esto llevó a sugerir el posible papel del glutamato en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. La inyección intraestriatal de ácido quinolínico, agonista del receptor NMDA, produce una lesión similar a la neuropatología de la enfermedad de Huntington, afectando selectivamente a las neuronas estriatales que proyectan desde el núcleo estriado al globo pálido y a la sustancia negra ya que éstas contienen muchas espinas dendríticas con receptores NMDA lo que las hace quizá más susceptibles (Beal,

M.F. y col., 1986; Beal, M.F. y col., 1989; Huang, Q. y col., 1995). A diferencia del ácido kaínico, el ácido quinolínico es un metabolito endógeno del cerebro. La lesión que produce el ácido quinolínico no afecta a la interneuronas estriatales que contienen la somatostatina, el neuropéptido Y (Beal, M.F. y col., 1989) y la NADPH diaforasa (Koh, J.Y. y col., 1986). Los receptores NMDA están disminuidos en el núcleo estriado de pacientes con la enfermedad de Huntington (Young, A.B. y col., 1988), además recientemente se ha demostrado que los genes que codifican para las distintas subunidades de los receptores NMDA, las NR2A y NR2B pueden influir en la variabilidad del inicio de la enfermedad (Arning, L. y col., 2005). Estos resultados sugieren que la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA juegan un importante papel en la enfermedad de Huntington y que las lesiones experimentales con ácido quinolínico en animales eran y son, un modelo válido para esta enfermedad. Hoy en día se ha observado que en algunos modelos transgénicos de animales para la enfermedad de Huntington tienen una hipersensibilidad mayor a la sobreactivación de los receptores NMDA y se ha podido relacionar la mutación de la huntingtina con la excitotoxicidad (Gines, S. y col., 2003; Li, L. y col., 2004; Zeron, M.M. y col., 2002; Zeron, M.M. y col., 2004), hecho que reafirma todas las premisas iniciales respecto a la existencia de un componente excitotóxico responsable, en parte, de las alteraciones observadas en la enfermedad. No obstante, no podría finalizar este apartado sin mencionar la controversia en cuanto al patrón de excitotoxicidad en los diferentes modelos de transgénicos, ya que opuestamente a lo que anteriormente he descrito, también se ha observado en los ratones transgénicos R6/1, R6/2 y N171-82Q una fuerte protección frente a lesiones excitotóxicas estriatales agudas. Las inyecciones de ácido quinolínico, que causan una muerte neuronal estriatal masiva en los ratones normales, no dañan a estos ratones trasgénicos (Hansson, O. y col., 1999; Jarabek, B.R. y col., 2004) debido principalmente a la tolerancia frente al exceso de calcio intracelular que desarrollan acorde con la progresión de la enfermedad (Hansson, O. y col., 2001), aunque aparte, también se haya postulado

## ***Introducción***

---

que pueda deberse a las interacciones de la huntingtina con otras proteínas o procesos transcripcionales (MacGibbon, G.A. y col., 2002).

### 1.4.2.- IMPLICACIÓN DE LA DISMINUCIÓN METABOLISMO ENERGÉTICO

La mitocondria es el mayor orgánulo celular productor de energía que existe dentro de la célula, se estima que más del 90% del ATP generado proviene de ésta (Kidd, P.M., 2005). Así cualquier depleción de energía a nivel celular muy probablemente se deba a una disfunción mitocondrial. La disrupción de la función mitocondrial y el metabolismo de la glucosa se han propuesto como alteraciones que median la muerte neuronal y que son comunes a muchas neuropatologías (Tarnopolsky, M.A. y Beal, M. F., 2001). En pacientes con enfermedad de Huntington se han detectado alteraciones del metabolismo energético fruto de la disfunción mitocondrial (Beal, M.F., 1995; Beal, M.F., 2000). En modelos celulares, el fragmento N-terminal de la huntingtina interfiere con el complejo II mitocondrial a nivel post-transcripcional y esto acarrea una disfunción mitocondrial (Benchoua, A. y col., 2006). La proteína huntingtina también incrementa la susceptibilidad de la mitocondria a la permeabilidad inducida por calcio con la consecuente salida de citocromo C, inductor de la activación de caspasas (Choo, Y.S. y col., 2004). Incluso los primeros fallos mitocondriales son debidos a un efecto directo de las poliglutaminas (Panov, A.V. y col., 2002) y se ha relacionado la muerte de neuronas corticales y estriatales con defectos mitocondriales (Galas, M.C. y col., 2004). También las sustancias tóxicas mitocondriales por ende nos conducen a un patrón de atrofia similar al observado en la enfermedad de Huntington (Alexi, T. y col., 1998). Las neuronas estriatales son especialmente sensibles a las toxinas de acción mitocondrial. El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y el malonato son toxinas mitocondriales que interfieren en la síntesis de ATP inhibiendo de manera irreversible la enzima succinato deshidrogenasa, que es una proteína integrante del complejo II de la cadena respiratoria

mitocondrial. Se conoce la existencia de una vulnerabilidad neuronal debida a la inhibición del complejo II mitocondrial que podría estar relacionada con la muerte selectiva estriatal, ya fuera por la alteración indirecta de la expresión de genes involucrados en la señalización glutamatérgica y dopaminérgica (Napolitano, M. y col., 2004), o bien por alteraciones de gradientes iónicos (Saulle, E. y col., 2004). Incluso se ha propuesto como medida de neuroprotección el poder modular la transición de permeabilidad mitocondrial (Kristal, B.S. y col., 2004). Así una lesión con 3-NP o malonato proporciona un modelo neuroquímico para la enfermedad de Huntington que reproduce algunos de los aspectos de la enfermedad en humanos, en términos de patología y sintomatología (Beal, M.F. y col., 1991; Borlongan, C.V. y col., 1997; Brouillet, E. y col., 1999), causando una degeneración selectiva de las neuronas de proyección GABAérgica con una preservación relativa de las neuronas NADPHd (Beal, M.F. y col., 1993; Brouillet, E. y col., 1995; Guyot, M.C. y col., 1997). Además con el 3-NP se ha conseguido reproducir patrones de coreas y disquinesias amén de otras disfunciones locomotoras en primates (Brouillet, E. y col., 1995; Palfi, S. y col., 1996).

### 1.4.3.- IMPLICACIÓN DE LOS FACTORES TRÓFICOS

Para poder entender como puede estar involucrada la regulación de los factores tróficos en las enfermedades neurodegenerativas debemos explicar qué son y cómo funcionan, ya que en sí, sus disminuciones no son la causa de las enfermedades pero sí pueden estar relacionados estrechamente con la severidad de la patología.

Los factores tróficos son proteínas endógenas solubles que regulan la supervivencia, el crecimiento, la plasticidad o la síntesis de proteínas para funciones de las neuronas y promueven la supervivencia neuronal durante el desarrollo (Oppenheim, R.W., 1991; Poo, M.M., 2001; Thoenen, H., 1991). Se ha propuesto que los axones compiten por cantidades limitantes de factores

## ***Introducción***

---

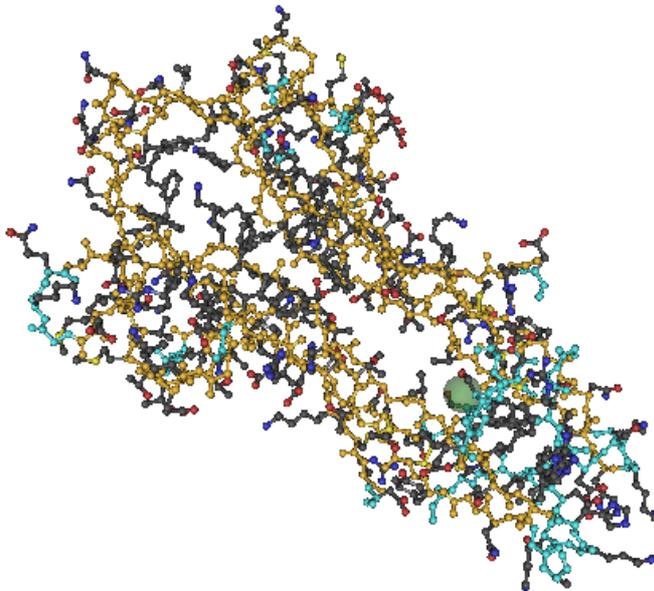
neurotróficos producidos por los tejidos diana (Grimes, M.L. y col., 1996; Yuen, E.C. y Mobley, W. C., 1996), así las neuronas que no consiguen obtener una cantidad suficiente de factor neurotrófico necesario mueren por apoptosis (Connor, B. y Dragunow, M., 1998; Thoenen, H. y col., 1987). Este proceso regula el número de neuronas y las conexiones durante el desarrollo del sistema nervioso central (Ghosh, A. y col., 1994; Huang, E.J. y Reichardt, L. F., 2001). Además, en el adulto, los factores neurotróficos son necesarios para mantener las funciones y los fenotipos neuronales específicos (Conner, J.M. y Varon, S., 1996; Sofroniew, M.V. y col., 1990), con lo cual, las funciones que desempeñan no son nada desdeñables. Así no sólo promueven la diferenciación y el crecimiento de las neuronas en el desarrollo, el mantenimiento fenotípico y la supervivencia de neuronas maduras adultas, sino que también representan un medio potencial para modificar la función neuronal. Realizando estudios *in vitro* se ha observado que las neurotrofinas son capaces de formar heterodímeros estables (Jungbluth, S. y col., 1994) aunque se desconoce qué papel puede ejercer la heterodimerización *in vivo*. No obstante, cada vez cobra más fuerza la hipótesis de que los niveles de factores neurotróficos pueden estar implicados en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, como son la enfermedad de Parkinson, o Huntington (Alberch, J., 1997; Alberch, J. y col., 2004; Connor, B. y Dragunow, M., 1998) ya que son neuroprotectores frente a las lesiones que afectan a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y a las neuronas GABAérgicas estriatales (Alberch, J., 1997; Alberch, J. y col., 2002; Canals, J.M. y col., 1998; Canudas, A.M. y col., 2005; Perez-Navarro, E. y col., 1999a; Perez-Navarro, E. y col., 2000b; Perez-Navarro, E. y col., 2005). Las neurotrofinas pueden atenuar la acumulación de peróxidos ejerciendo así un papel antioxidante, también pueden modular el incremento de calcio intracelular inducidos por la respuesta al glutamato, ejerciendo un papel protector frente la neurotoxicidad de este neurotransmisor (Mattson, M.P. y col., 1995). Además, se ha observado que posteriormente a un estímulo excitotóxico, acaece una regulación de la actividad trófica como mecanismo

neuroprotector (Alexi, T. y col., 2000; Canals, J.M. y col., 1998; Canals, J.M. y col., 1999; Canals, J.M. y col., 2001; Checa, N. y col., 2000; Lindvall, O. y col., 1994).

La jerarquía de los factores tróficos está establecida en familias. Nosotros nos centraremos en las que tienen una mayor relevancia en los ganglios basales. Así, estas se dividen por un lado en: la familia de las neurotrofinas, dentro de las cuales podemos destacar el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4 (NT-4). Los ligandos de la familia del GDNF, dentro de la cual podemos destacar el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), la persefina y la artemina, y por último, dentro de las citoquinas tenemos el factor neurotrófico ciliar (CNTF).

### 1.4.3.1.- DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS

#### 1.4.3.1.1.- El factor de crecimiento nervioso NGF



*Ilustración 15 Reconstrucción tridimensional del NGF  
(MMDB 27823).*

El NGF fue uno de los primeros factores neurotróficos que se descubrieron (Levi-Montalcini, R., 1964; Levi-Montalcini, R. y Hamburger, V., 1951) y se consiguieron aislar (Ohen, S. y Levi-Montalcini, R., 1956; Varon, S. y col., 1967). Se observó que tenía la capacidad de promover el crecimiento de neuritas de las neuronas de pollo (Levi-Montalcini, R. y Ohen, S., 1956). Se ha descrito

## ***Introducción***

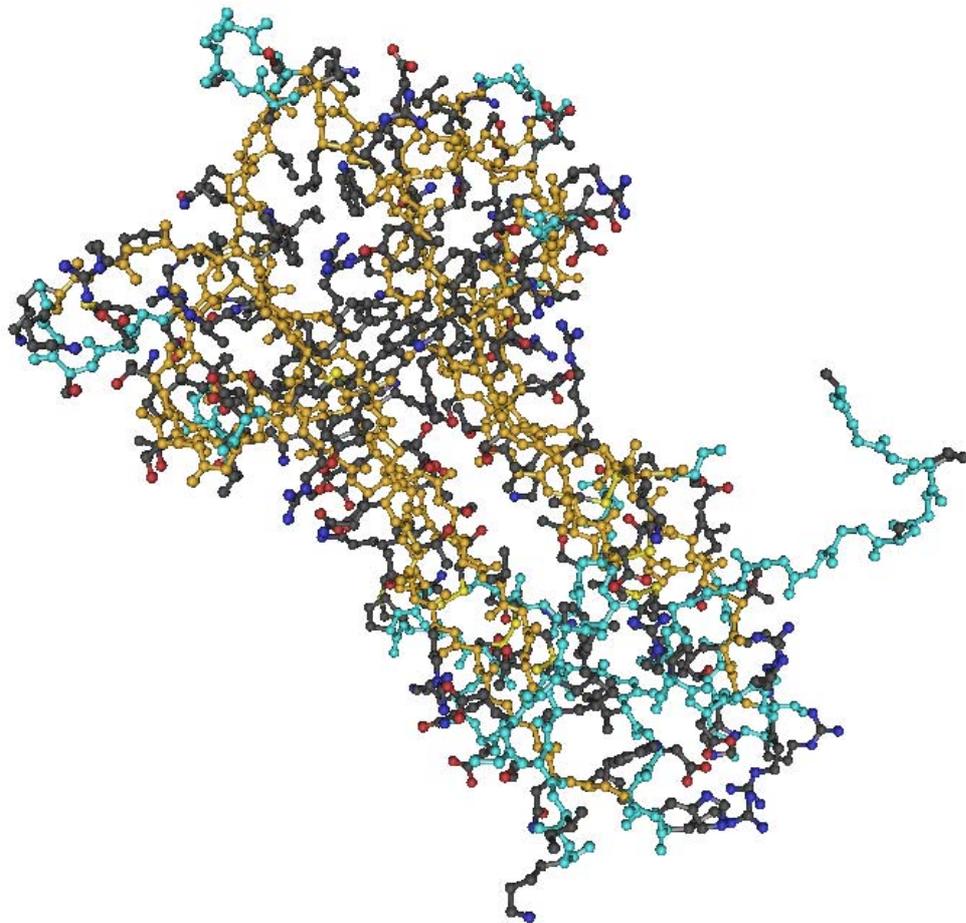
---

que el NGF pueda ejercer una acción protectora ya que previene la muerte neuronal causada por la 6-hidroxidopamina (Levi-Montalcini, R. y col., 1975), y también se ha demostrado que incrementa su expresión en el núcleo estriado frente a lesiones excitotóxicas (Canals, J.M. y col., 1998; Menei, P. y col., 2000; Perez-Navarro, E. y Alberch, J., 1995) y su administración diaria durante una semana es suficiente para prevenir la reducción de acetilcolintransferasa (Venero, J.L. y col., 1994) en animales lesionados con ácido quinolínico.

### ***1.4.3.1.2.- El factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF***

El BDNF fue descubierto accidentalmente a partir de un medio de cultivo condicionado por una línea de células gliales (Barde, Y.A. y col., 1978). No obstante tuvieron que pasar unos años hasta que se comprobara su existencia en extractos de cerebro de cerdo y se consiguiera aislar (Barde, Y.A. y col., 1982) y clonar (Leibrock, J. y col., 1989). Actúa sobre poblaciones neuronales que no responden al NGF (Barde, Y.A. y col., 1982). Es una proteína de 12,3 kDa de peso molecular con un 55% de grado de homología respecto a su composición aminoacídica respecto al NGF (Leibrock, J. y col., 1989).

Dentro de las acciones más características que ejerce, son la estimulación de la diferenciación de las células de la cresta neural hacia un fenotipo sensorial (Sieber-Blum, M., 1991) y la potente acción neuroprotectora sobre las neuronas estriadales (a la cual dedicamos un apartado en la presente tesis) ya que después de lesiones excitotóxicas se ha observado un incremento en su expresión en la corteza cerebral (Canals, J.M. y col., 2001) y en el núcleo estriado en modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington, tanto postnatales (Checa, N. y col., 2000) como adultos (Canals, J.M. y col., 1998). Además se ha observado una sobreexpresión en las poblaciones dopaminérgicas nigrales frente a la degeneración transneuronal inducida por lesiones excitotóxicas nigrales en adultos (Canudas, A.M. y col., 2005; Rite, I. y col., 2003).



*Ilustración 16 Reconstrucción tridimensional del BDNF (MMDB 9670).*

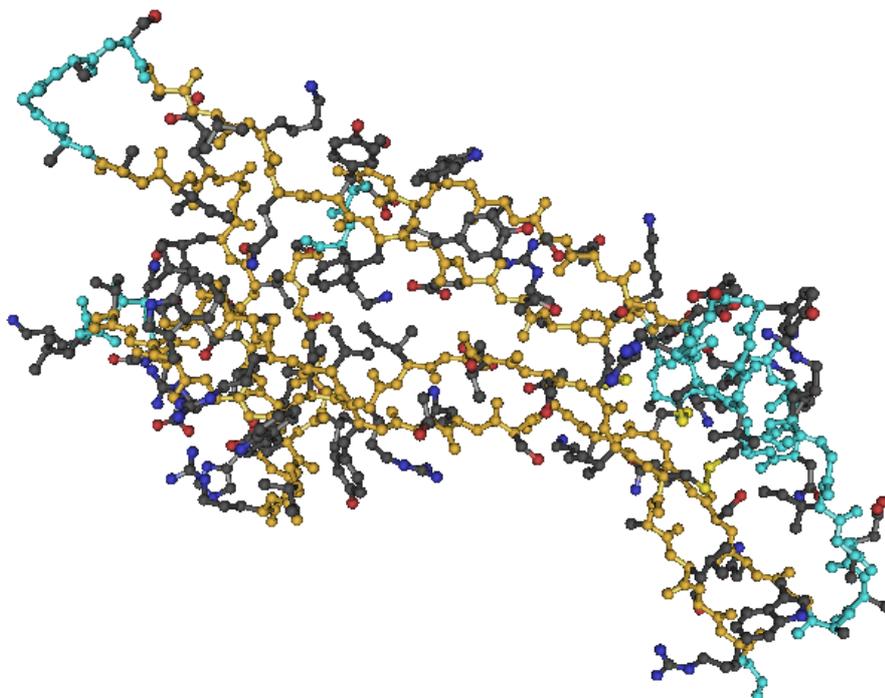
#### 1.4.3.1.3.- La neurotrofina-3 NT-3

La homología estructural entre el BDNF y el NGF sugirió la existencia de otras moléculas relacionadas. Con estudios de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y otras técnicas de clonaje, se identificaron nuevos miembros de la familia, moléculas relacionadas con el NGF como la NT-3 (Hohn, A. y col., 1990; Maisonpierre, P.C. y col., 1990). Esta molécula NT-3, junto a sus homólogas NT-4/5 también ejercen efectos neuroprotectores, ya que previene la muerte de neuronas estriatales en ratas modelo excitotóxico de enfermedad de Huntington (Perez-Navarro, E. y col., 2000b). Son muy eficientes frente a la atrofia y reducción de niveles de expresión de encefalinas y

## ***Introducción***

---

sustancia P provocadas en las neuronas de proyección estriatales cuando se lesionan con ácido quinolínico (Perez-Navarro, E. y col., 1999a).

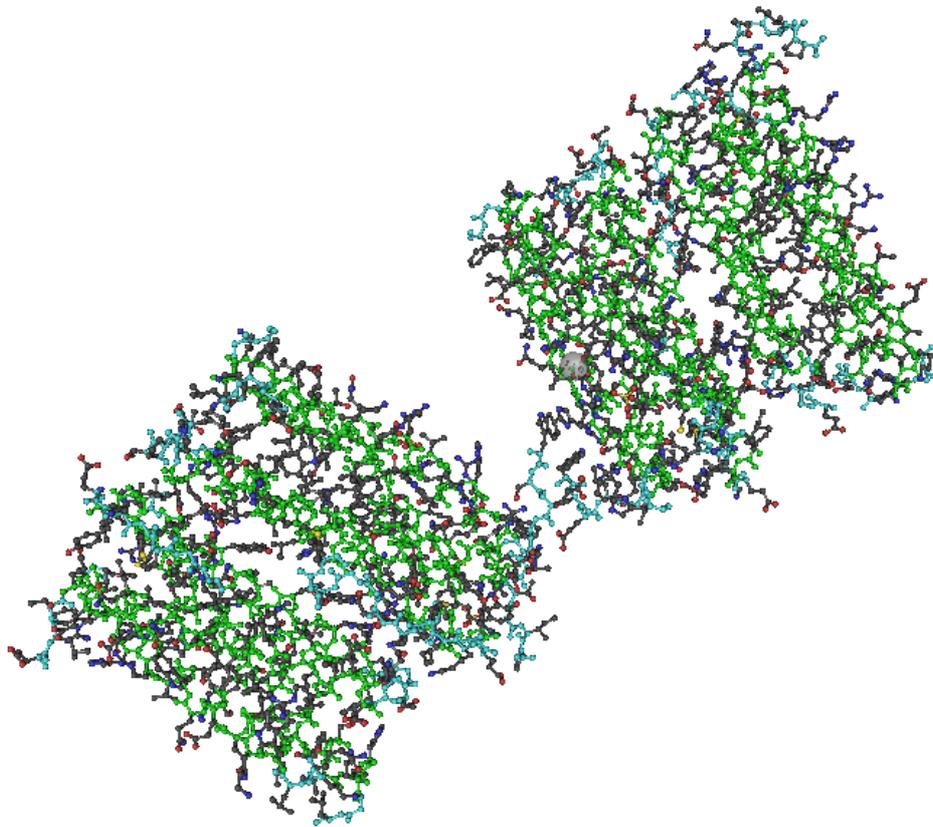


*Ilustración 17 Reconstrucción tridimensional de la Neurotrofina-3 (NT-3) (MMDB 10558).*

### 1.4.3.1.4.- El factor neurotrófico ciliar CNTF

El factor neurotrófico ciliar (CNTF) fue descubierto como un componente de los ojos de embriones de pollo que confería una supervivencia a las neuronas ciliares en cultivo (Adler, R. y col., 1979; Barbin, G. y col., 1984; Lin, L.F. y col., 1989; Nishi, R. y Berg, D. K., 1981; Stockli, K.A. y col., 1989). El CNTF se expresa en células gliales tanto dentro del sistema nervioso central como en el periférico (Lisovoski, F. y col., 1997). Está estructuralmente relacionado con las citoquinas, como la interleukina-6 y la interleukina-11 (Sariola, H. y col., 1994).

Este factor estimula la expresión génica, la supervivencia celular y la diferenciación en toda una variedad de diferentes tipos neuronales (Ip, N.Y. y Yancopoulos, G. D., 1996), aunque las motoneuronas espinales son las más sensibles para este factor (Arakawa, Y. y col., 1990; Oppenheim, R.W. y col., 1991). Hay algunas evidencias que indican que el CNTF pueda jugar un papel clave en la respuesta a las lesiones en el sistema nervioso, ya que se observan cambios dramáticos en sus niveles de expresión después de un trauma o una isquemia (Asada, H. y col., 1995; Ip, N.Y. y col., 1993; Park, C.K. y col., 2000), o simplemente a nivel neuroprotector en respuesta a la lesión con ácido quinolínico (Emerich, D.F. y col., 1998; Haas, S.J. y col., 2004). pero lo más notable son los efectos positivos sobre el músculo esquelético normal y denervado (Helgren, M.E. y col., 1994; Martin, D. y col., 1996; Ramirez, B.U. y col., 2003) lo que la hace una molécula muy interesante para el tratamiento de patologías degenerativas enfocadas al sistema nervioso periférico.



*Ilustración 18 Reconstrucción tridimensional del Factor neurotrófico ciliar (CNTF) (MMDB 5903).*

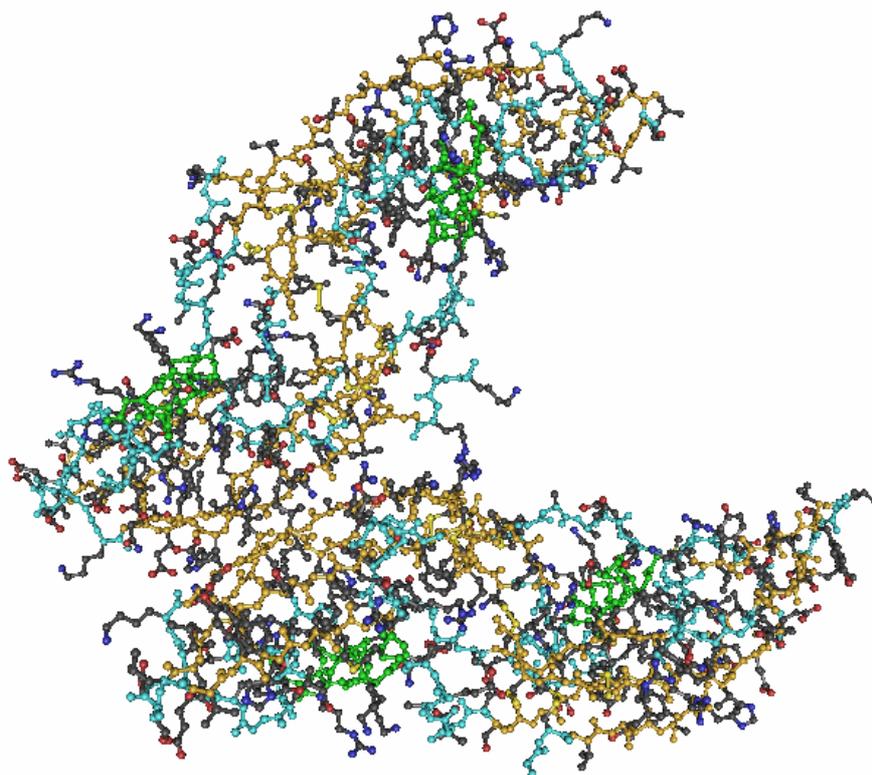
## ***Introducción***

---

### ***1.4.3.1.5.- El factor neurotrófico derivado de la línea celular glial GDNF***

El GDNF fue aislado por primera vez en 1993. Inicialmente lo describieron como una proteína de acción neurotrófica específica para las neuronas dopaminérgicas y la designaron como “factor neurotrófico derivado de la línea celular de la glía”, ya que se obtuvo a partir de la línea celular glial B49. El cDNA del GDNF fue clonado tanto el de humanos como el de ratas mostrando hasta un 93% de homología (Lin, L.F. y col., 1993).

Uno de los efectos más patentes del GDNF es el de incrementar la supervivencia y la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas, activándolas a su vez para que recapten dopamina



***Ilustración 19 Reconstrucción tridimensional del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (MMDB 6212).***

de manera mucho más eficiente. La respuesta es específica este tipo de neuronas ya que no se observó ningún efecto sobre las poblaciones neuronales GABAérgicas o serotoninérgicas ni tampoco sobre los astrocitos (Lin, L.F. y col., 1993). La distribución regional de expresión de

GDNF en el cerebro se localiza principalmente en el núcleo estriado y el prosencéfalo basal (Schaar, D.G. y col., 1993). En estudios más recientes se ha observado que los niveles de GDNF se incrementan después de una lesión estriatal, ya sea mecánica o excitotóxica (Bresjanac, M. y Antauer, G., 2000; Marco, S. y col., 2002a). Dentro de la familia del GDNF también se encuentran la neurturin (Kotzbauer, P.T. y col., 1996), la persefina (Milbrandt, J. y col., 1998) y la artemina (Baloh, R.H. y col., 1998). Todas estas moléculas tienen la capacidad de proteger las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ventrales *in vitro* (Akerud, P. y col., 1999; Akerud, P. y col., 2002; Lin, L.F. y col., 1993), no obstante, tienen cierta especificidad de acción. Se ha observado que la neurturin es más eficiente que el GDNF protegiendo las neuronas calbindina positivas estriatopalidales (Marco, S. y col., 2002b), en cambio, el GDNF ejerce una protección más efectiva frente a la degeneración de las interneuronas y neuronas estriatonigrales (Perez-Navarro, E. y col., 1999b) y previene la degeneración de interneuronas colinérgicas inducida por el ácido quinolínico (Perez-Navarro, E. y col., 2000a). El GDNF también puede actuar como inhibidor de las conductas de adicción al alcohol y las drogas al proteger las neuronas mesolímbicas dopaminérgicas de los cambios estructurales y moleculares que sufren debido a exposiciones crónicas de éstos (Janak, P.H. y col., 2006; Ron, D. y Janak, P. H., 2005), dando a entender que estas moléculas de alguna manera están promoviendo señales de supervivencia en respuesta a la lesión para tratar de proteger a las neuronas.

De todos los factores tróficos aquí expuestos, el que ejerce una mayor protección sobre el principal núcleo que degenera en la enfermedad de Huntington, es sin duda el BDNF. Pasemos a detallar esta acción protectora más específicamente.

## ***Introducción***

---

### 1.4.3.2.- PROTECCIÓN MEDIANTE *BDNF*

#### 1.4.3.2.1.- *BDNF* Y EL NÚCLEO ESTRIADO

En general todas las neurotrofinas tienen un efecto neuroprotector sobre las neuronas espinosas de tamaño medio GABAérgicas (Martinez-Serrano, A. y col., 1996) (Alexi, T. y col., 1997) (Perez-Navarro, E. y col., 1999a; Perez-Navarro, E. y col., 2000b). Particularmente el *BDNF* es un potente factor para inducir supervivencia en las neuronas estriatales (Nakao, N. y col., 1995b; Ventimiglia, R. y col., 1995) y se ha demostrado que previene la activación de la señales proapoptóticas (Perez-Navarro, E. y col., 2005). Además induce la diferenciación hacia el fenotipo GABAérgico (Mizuno, K. y col., 1994), DARPP-32 (Ivkovic, S. y Ehrlich, M. E., 1999; Nakao, N. y col., 1995a) y calbindina positivas (Ivkovic, S. y Ehrlich, M. E., 1999; Ventimiglia, R. y col., 1995). Así el *BDNF* es importante, para el crecimiento de las neuronas estriatales. Se ha demostrado que los ratones “knock-outs” para esta neurotrofina generan menos células calbindina (Jones, K.R. y col., 1994) y DARPP-32 positivas (Ivkovic, S. y col., 1997), poblaciones predominantes en el núcleo estriado.

Se ha observado que tras lesiones excitotóxicas en el núcleo estriado, tanto el *BDNF* y otras neurotrofinas, como sus receptores alteran sus niveles basales (Canals, J.M. y col., 1998; Canals, J.M. y col., 1999; Checa, N. y col., 2000; Perez-Navarro, E. y col., 2000b). Además se ha observado que aparece una regulación trófica transneuronal tanto en la corteza como en la sustancia negra particularmente para esta neurotrofina (Aliaga, E. y col., 2000; Canals, J.M. y col., 2001; Canudas, A.M. y col., 2005; Rite, I. y col., 2003; Rite, I. y col., 2005). El *BDNF* estriatal proviene en gran medida proporcionado por las neuronas corticales y en menor medida de las nigrales (Mufson, E.J. y col., 1994; Mufson, E.J. y col., 1996). Consecuentemente, la pérdida del *BDNF* podría contribuir o favorecer de manera indirecta a incrementar la susceptibilidad por la muerte neuronal en estados patológicos. Asimismo se ha descrito una reducción del *BDNF* en los pacientes de Huntington

(Ferrer, I. y col., 2000; Zuccato, C. y col., 2001). Además hay numerosos estudios que demuestran un claro efecto neuroprotector de esta neurotrofina en el núcleo estriado de animales modelo de Huntington (Alberch, J. y col., 2002; Gratacos, E. y col., 2001; Hilditch-Maguire, P. y col., 2000; Kells, A.P. y col., 2004; Perez-Navarro, E. y col., 1999a; Perez-Navarro, E. y col., 2000b; Perez-Navarro, E. y col., 2005; Tuszynski, M.H. y col., 2005).

### 1.4.3.2.2.- BDNF Y LA SUSTANCIA NEGRA

El BDNF mejora la supervivencia y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Hyman, C. y col., 1991). Aún así no es crítico para el desarrollo de este núcleo, ya que los animales knock-out para esta neurotrofina no tienen una reducción de neuronas dopaminérgicas (Jones, K.R. y col., 1994). Sin embargo, se ha observado que la administración de BDNF ejerce efectos neuroprotectores en las neuronas dopaminérgicas nigrales expuestas a agentes neurotóxicos (Altar, C.A. y col., 1994; Hagg, T., 1998). También se han descrito alteraciones en la función dopaminérgica en los ratones que son heterocigotos para el BDNF (Dluzen, D.E. y col., 2001; Dluzen, D.E. y col., 2002), así se ha propuesto que actúa como neuromodulador (Fumagalli, F. y col., 2006a). Estos resultados reafirman estudios anteriores *in vitro* que demostraban que el BDNF incrementa la liberación y captación de dopamina (Blochl, A. y Sirrenberg, C., 1996; Hyman, C. y col., 1994). Esta neurotrofina se postula de gran importancia para la correcta función de estas neuronas (Baquet, Z.C. y col., 2005) en especial durante la etapa de senescencia, ya que la disminución de sus receptores en neuronas dopaminérgicas en ratones viejos cursa paralela a la disminución de enzimas para la síntesis de dopamina y la formación de depósitos de  $\alpha$ -sinucleína (von Bohlen und, H.O. y col., 2005).

Si hablamos de protección de la sustancia negra, también debemos de introducir que pasa cuando ésta degenera. El ejemplo más evidente, sin tener que entrar en detalles, sería la enfermedad de Parkinson. Es interesante saber que en los pacientes de la enfermedad de Parkinson se han

## ***Introducción***

---

efectuado estudios que revelan una marcada disminución de BDNF en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (Howells, D.W. y col., 2000; Mogi, M. y col., 1999; Nagatsu, T. y col., 2000; Parain, K. y col., 1999). Por otra parte, también está descrito que polimorfismos del BDNF pueden representar una mayor vulnerabilidad para desarrollar esa enfermedad (Hong, C.J. y col., 2003; Toda, T. y col., 2003) o agravar sus disfunciones (Foltynie, T. y col., 2005). Por tanto en cualquier estudio llevado a cabo con BDNF también sería prudente, e interesante tener en cuenta los efectos que pueden producirse la sustancia negra.

### 1.4.3.2.3.- BDNF Y LA HUNTINGTINA

En los últimos años se han realizado estudios que demuestran la implicación de la huntingtina en la transcripción del gen del BDNF. Se ha observado que los pacientes con enfermedad de Huntington tienen reducción de los niveles de expresión BDNF (Ferrer, I. y col., 2000). Es un efecto directo porque incrementando los niveles de huntingtina normal se ha logrado incrementar la transcripción de los niveles de esta neurotrofina (Zuccato, C. y col., 2001; Zuccato, C. y col., 2003). Haciendo lo mismo pero dentro del contexto de modelos que expresan huntingtina mutada (como las células knock-in), se ha observado que la mutación de la huntingtina produce una inactivación del silenciador RE1/NRSE para la transcripción del BDNF (Zuccato, C. y col., 2003). Esto nos muestra que la huntingtina ejerce un control de la expresión de la transcripción génica.

Además, la huntingtina tiene una implicación directa en el transporte intracelular de BDNF (Charrin, B.C. y col., 2005; Gauthier, L.R. y col., 2004; Humbert, S. y Saudou, F., 2004). Estudios recientes han logrado disminuir los niveles de huntingtina normal mediante ARN de interferencia y se ha observado que repercute con una reducción del transporte vesicular del BDNF (Van Raamsdonk, J.M. y col., 2005).

#### 1.4.3.3.- PROTECCIÓN MEDIANTE *GDNF* EN LOS GANGLIOS BASALES

El GDNF es un potente neuroprotector en los diferentes núcleos de los ganglios basales, así se ha observado que rescata de la muerte las neuronas estriatales de proyección después de una lesión con ácido quinolínico (Perez-Navarro, E. y col., 1996; Perez-Navarro, E. y col., 1999b), aunque la mejor acción protectora se observa en las neuronas estriatonigrales (Marco, S. y col., 2002a). Tanto los niveles de GDNF como sus receptores se incrementan después de lesiones estriatales con aminoácidos excitadores, quinolinato o kainato (Marco, S. y col., 2002a). Estudios con ratones knock-out para GFAP descubrieron que éstos presentaban unos niveles de GDNF mayores que los animales controles (Hanbury, R. y col., 2003), se vio que estos niveles podían proteger frente a lesiones estriatales con quinolinato o 3-NP. Además todos los miembros de la familia del GDNF protegen las neuronas dopaminérgicas frente a la lesión inducida por el 6-OHDA (Akerud, P. y col., 1999; Barroso-Chinea, P. y col., 2005; Bowenkamp, K.E. y col., 1997; Connor, B., 2001; Georgievska, B. y col., 2002; Hoffer, B.J. y col., 1994; Kearns, C.M. y Gash, D. M., 1995; Lapchak, P.A. y col., 1997; Milbrandt, J. y col., 1998; Rosenblad, C. y col., 2000), y concretamente se ha observado un incremento de sus receptores  $GFR\alpha 1$  y  $GFR\alpha 2$  en la sustancia negra pars compacta en modelos de enfermedad de Parkinson (Marco, S. y col., 2002a). El GDNF también evita la degeneración de esta población neuronal inducida por el MPTP (Beck, K.D. y col., 1995; Tseng, J.L. y col., 1997) y por lesiones mecánicas (Bjorklund, A. y col., 2003; Choi-Lundberg, D.L. y col., 1997; Gill, S.S. y col., 2003; Kordower, J.H., 2003). Este factor trófico está siendo evaluado como un candidato potencial para la enfermedad de Parkinson (Gash, D.M. y col., 1995; Gash, D.M. y col., 1996), ya que además de proteger frente a la muerte neuronal también estimula la liberación y recaptación de la dopamina en las neuronas recuperadas (Hyman, C. y col., 1991; Kirik, D. y col., 2000; Klein, R.L. y col., 1999). En la actualidad ya se están efectuando ensayos clínicos (Barker, R.A., 2006; Kupsch, A. y col., 1995) reportando mejoras tanto de

## ***Introducción***

---

funciones motoras como de calidad de vida de los pacientes (Patel, N.K. y col., 2005; Slevin, J.T. y col., 2006)

Así tanto el GDNF como el BDNF son factores tróficos que protegen las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales tanto en modelos de roedores como de primates (Eslamboli, A. y col., 2005; Sun, M. y col., 2005), aunque el GDNF es más efectivo que el BDNF en la protección de la sustancia negra, ya que los animales muestran mejoras comportamentales y una mayor protección de las neuronas dopaminérgicas (Sun, M. y col., 2005).

## 2.- TERAPIA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

### 2.1.- TERAPIA FARMACOLOGICA

Hasta la presente fecha, existen más de 200 publicaciones en que se describen pruebas realizadas con fármacos susceptibles de tener algún efecto positivo para la enfermedad de Huntington. Las pruebas clínicas de fase-I y fase-II básicamente se han enfocado hacia la paliación de los síntomas motores de la corea (Bonelli, R.M. y Wenning, G. K., 2006). Desafortunadamente, ante todo ese esfuerzo solamente se ha logrado caracterizar algunos pocos compuestos como “posiblemente útiles” o como “candidatos a estudiar con más detalle”. El abordaje farmacológico para esta enfermedad se ha enfocado desde distintas vertientes.

#### 2.1.1.- Compuestos que disminuyen la estimulación excitatoria.

La excitotoxicidad está fuertemente relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Huntington, por eso los compuestos que puedan atenuar la transmisión glutamatérgica podrían ejercer efectos beneficiosos en la enfermedad de Huntington. El Riluzole (Huntington Study Group., 2003; Rosas, H.D. y col., 1999; Schiefer, J. y col., 2002; Seppi, K. y col., 2001) inhibe la

liberación de glutamato (Palfi, S. y col., 1997). Usando este fármaco se observaron mejoras en la viabilidad celular y cambios del patrón de ubiquitinación de los agregados nucleares de modelos murinos R6/2 para esta enfermedad (Schiefer, J. y col., 2002). En pacientes humanos se ha observado una mejora motora y funcional a corto plazo, aunque desafortunadamente decae a lo largo del tiempo (Seppi, K. y col., 2001). No obstante su espectro de acción es mucho más amplio ya que también se usa como anticonvulsivo y para retrasar la intubación en la esclerosis lateral amiotrófica (Bensimon, G. y col., 1994; Lacomblez, L. y col., 1996). Se ha planteado extender su uso para otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Jankovic, J. y Hunter, C., 2002; Larkin, M., 1999), aunque también están descritos casos en que se han producido intoxicaciones (Bodner, T. y col., 2001; Borderias-Clau, L. y col., 2006).

Otro enfoque diferente es utilizando antagonistas del NMDA. De entre todos ellos podemos destacar dos, la amantadina y la remacemida. La amantadina se ha observado que reduce la severidad de las disquinesias coreiformes en algunos pacientes con enfermedad de Huntington (Verhagen, M.L. y col., 2002). La remacemida (concretamente bloquea los canales ionotrópicos NMDA), éste último compuesto se administró a pacientes y se observó una buena tolerabilidad y una ligera tendencia a la mejora de los movimientos coreicos (Kieburz, K. y col., 1996), lo que impulsó a realizar un estudio multi-centro en 1997 llamado “CARE-HD” (Co-enzyme Q10 And Remacemide Evaluation in Huntington's Disease) en que se combinaron los dos agentes (la remacemida y el coenzima-Q10).

### 2.1.2.- Aproximaciones neuroprotectoras con coenzima Q10.

La disfunción mitocondrial es evidente en la enfermedad de Huntington. El Coenzima Q10 es un cofactor esencial en la cadena de transporte electrónico de la respiración mitocondrial que también ejerce su acción como un potente antioxidante. Se ha investigado su tratamiento como posible terapia (Beal, M.F., 1999; Ferrante, R.J. y col., 2002; Koroshetz, W.J. y col., 1997), e

## ***Introducción***

---

incluso relacionado su papel con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Parkinson (Beal, M.F. y Shults, C. W., 2003; Hunter, D.A., 2003; Shults, C.W. y col., 1999). Uno de mayores estudios clínicos efectuados en la enfermedad de Huntington fue el “CARE-HD” dirigido por Kart Kieburtz. En el plantearon el tratamiento de los pacientes efectuando una combinación de agentes, la administraron de la coenzima-Q10 y la remacemida (Huntington Study Group., 2001). Por una parte el primer agente debería prevenir la disfunción mitocondrial, mientras que el segundo protegería de la excitotoxicidad. Técnicamente con el abordaje conjunto también se prevendrían las dos condiciones que facilitan la activación de caspasas (previo paso a la muerte celular por inducción de apoptosis). Desgraciadamente no funcionó (The Huntington's Disease Study Group., 2001). Este resultado negativo fue una evidencia más de la complejidad de la enfermedad, y sin duda, mostraba que los éxitos obtenidos en modelos murinos no tenían porqué ser extrapolables a humanos (Ferrante, R.J. y col., 2002; Schilling, G. y col., 2001).

### 2.1.3.- Compuestos que previenen la agregación de la huntingtina.

En modelos murinos transgénicos condicionales para la expresión de la huntingtina, se ha demostrado que inhibiendo la transcripción del gen se puede recuperar la atrofia estriatal y hacer desaparecer la formación de agregados de poliglutaminas (Martin-Aparicio, E. y col., 2001). Esto sugiere que la formación continuada de agregados representa un problema para su correcta degradación y eliminación en el complejo proteosomal. Así un enfoque para elaborar un tratamiento frente la enfermedad de Huntington sería desarrollar o utilizar compuestos que inhibieran la agregación de la huntingtina. De entre todos ellos podemos destacar el Congo Red, que ha mostrado efectos protectores contra la citotoxicidad de la poliglutamina inhibiendo la oligomerización de los agregados y permitiendo su accesibilidad a la maquinaria celular de degradación proteica. Administrado a R6/2 mostró efectos protectores en cuanto a supervivencia, pérdida de peso, funciones motoras y formación de oligómeros de poliglutaminas (Sanchez, I. y col., 2003). No

obstante también se han descrito complejas curvas dosis-respuesta (Smith, D.L. y col., 2001) que dificultarían su correcta administración en pacientes. Por otra parte, los compuestos benzothiazoles similares al riluzole actúan inhibiendo la fibrillogénesis de la huntingtina y aunque los resultados *in vitro* fuesen esperanzadores, en las pruebas *in vivo* se observó que para llegar a un estado estacionario era necesario llegar a la dosis máxima tolerada (Heiser, V. y col., 2002; Hockly, E. y col., 2006).

### 2.1.4.- Inhibidores de proteasas.

El fragmento N-terminal de poliglutaminas de la huntingtina mutante puede ser cortado por proteasas, incluyendo caspasas (Goldberg, Y.P. y col., 1996; Wellington, C.L. y col., 2000), calpainas (Gafni, J. y col., 2004; Kim, Y.J. y col., 2001) y aspartilo proteasas (Lunkes, A. y col., 2002), lo que favorece su toxicidad celular como fragmentos solubles y luego su agregación nuclear, por eso se planteó que los inhibidores de proteasas como agentes farmacológicos potencialmente terapéuticos. De entre todos ellos podemos destacar la minociclina (Bonelli, R.M. y Kapfhammer, H. P., 2003), ya que se ha demostrado que reduce la agregación de la huntingtina, retarda el progreso de la enfermedad, alarga el periodo de vida en ratones modelo de la enfermedad de Huntington (Chen, M. y col., 2000; Wang, X. y col., 2003) y se ha empezado a hacer estudios piloto (Bonelli, R.M. y col., 2003; Bonelli, R.M. y col., 2004; Huntington Study Group., 2004; Thomas, M. y col., 2004) e incluso enfocado hacia otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Thomas, M. y Le, W. D., 2004), aunque haya investigadores que su eficacia todavía la pongan en duda (Smith, D.L. y col., 2003).

### 2.1.5.- Fármacos inhibidores de las deacetilasas de histonas.

La huntingtina, como anteriormente ya hemos comentado en otro apartado, interacciona con distintos factores de transcripción, esto significa que estas alteraciones transcripcionales son ya

## ***Introducción***

---

eventos tempranos en la patogénesis de la enfermedad. Poder revertir las alteraciones de la transcripción puede ser un mecanismo para retardar la progresión de la enfermedad. Así los inhibidores de las deacetilasas de histonas pueden incrementar la transcripción genética y se han planteado como potencialmente terapéuticos tanto en *Drosophila sp.* (Steffan, J.S. y col., 2001) como en ratones R6/2 (Hockly, E. y col., 2003) ambos modelos de enfermedad de Huntington, pues también se ha observado que estos inhibidores reducen la toxicidad de las poliglutaminas (McCampbell, A. y col., 2001).

### 2.1.6.- Fármacos inhibidores de las transglutaminasas.

Las transglutaminasas catalizan el cambio de residuos de proteínas glutaminil a lisil con la liberación de amonio, y han sido el objetivo a estudiar para diferentes enfermedades neurodegenerativas humanas: Alzheimer, Parkinson, Parálisis supranuclear, Huntington (Gentile, V. y Cooper, A. J., 2004), ya que en todas éstas se presenta una mayor actividad transglutaminasa en los tejidos. Específicamente se ha demostrado *in vitro* que las transglutaminasas pueden usar la huntingtina como sustrato para poder agregarlas entre sí (Kahlem, P. y col., 1998a; Zainelli, G.M. y col., 2005) y además tiene una afinidad preferente por la huntingtina con más de 36 repeticiones de poliglutaminas (Karpuj, M.V. y col., 1999), con lo cual proporciona un mecanismo adicional para la formación de agregados de huntingtina (Kahlem, P. y col., 1998b). Esta actividad transglutaminasa se ha observado incrementada en cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington (Karpuj, M.V. y col., 1999), sugiriendo que pueda jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad.

La Cystamina es uno de los fármacos que más antiguamente se ha estudiado como inhibidor de la actividad transglutaminasa (Lorand, L. y col., 1979) y también se ha observado que puede ejercer una actividad inhibidora de caspasas (Lesort, M. y col., 2003). Administrándolo a ratones modelos de enfermedad de Huntington, YAC128 (Van Raamsdonk, J.M. y col., 2005) y R6/2, este

fármaco ha logrado una neuroprotección significativa (Dedeoglu, A. y col., 2002; Karpuj, M.V. y col., 2002; Wang, X. y col., 2005).

### **2.2.- TERAPIA CELULAR.**

Actualmente ya se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos de terapia celular, con resultados discretos pero esperanzadores, para enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Parkinson (Hagell, P. y col., 2002; Lindvall, O. y Hagell, P., 2000; Piccini, P., 2002; Polgar, S. y col., 2003), la enfermedad de Huntington (Bachoud-Levi, A. y col., 2000; Bjorklund, A. y Lindvall, O., 2000; Freeman, T.B. y col., 2000; Hauser, R.A. y col., 2002; Philpott, L.M. y col., 1997; Rosser, A.E. y col., 2002) o la enfermedad de Alzheimer (Tuszynski, M.H., 2002; Tuszynski, M.H. y col., 2005). La terapia celular en estos casos se ha basado en el trasplante de tejido procedente de fetos humanos para tratar de sustituir las neuronas que están degenerando, y pese a la complejidad, el grado de recuperación mostrado ha sido muy bajo.

Otra alternativa que está emergiendo hoy en día es el uso de las células madre, estas células tienen un enorme potencial de proliferación y diferenciación. Actualmente ya se tienen suficientes conocimientos para poder aislarlas, manipular y empezar a dirigir *in vitro*. Se han propuesto numerosas estrategias de terapia celular, todas ellas se podrían clasificar y resumir básicamente en dos tipos: terapias de neuroprotección y terapias de sustitución celular.

#### **2.2.1.- TERAPIA DE NEUROPROTECCIÓN**

Las primeras terapias de neuroprotección en la enfermedad de Huntington se llevaron a cabo en ratas lesionadas con ácido quinolínico, para reproducir la enfermedad y se enfocaron hacia la

## ***Introducción***

---

implantación de diversos tejidos para que pudiesen liberar factores evaluando su viabilidad en base al éxito de las pruebas de conducta posteriores (Levivier, M. y col., 1991). Los avances en la ciencia han permitido que se depure el proceso, focalizándolo en la administración de moléculas biológicamente activas que impidan o retrasen la degeneración y la muerte de las neuronas (Akerud, P. y col., 2001). En algunos casos es posible administrar sistémicamente fármacos que atraviesen la barrera hematoencefálica. Sin embargo, hoy se conocen factores de naturaleza proteica con potente acción neuroprotectora, cuyo principal, como ya se ha comentado anteriormente problema es la vía de administración. Estas moléculas son principalmente, las neurotrofinas; como el NGF, el BDNF, la NT-3 o ligandos de la familia del GDNF, etc. Para su administración, se están ensayando diferentes estrategias debido a que muchas de ellas no atraviesan la barrera hematoencefálica: desde la infusión directa intracerebral (Yanamoto, H. y col., 2000) hasta la implantación de cápsulas liberadoras y/o microesferas con estos factores tanto en ratas (Clavreul, A. y col., 2006) como en primates (Emerich, D.F. y col., 1994), pasando por la propiamente denominada terapia génica (Alberch, J. y col., 2004; Arenas, E., 2005; Blesch, A. y col., 1998; Chen, K.S. y Gage, F. H., 1995; Grill, R. y col., 1997). En la terapia génica se pueden introducir los genes terapéuticos en el cerebro de diversas formas: mediante la transducción vírica directamente en las células del huésped, o indirectamente mediante el trasplante de células madre modificadas genéticamente que liberarán los factores a su entorno.

En la neuroprotección por administración de CNTF se ha logrado recuperar funciones motoras y cognitivas en primates (Mittoux, V. y col., 2000). No obstante, la implantación de células modificadas genéticamente para la liberación de este factor produjeron un efecto mayor que la infusión del propio factor en modelos animales de la enfermedad de Huntington (ver revisión (Kordower, J.H. y col., 1999)). En los últimos años, se han realizado numerosos ensayos clínicos tratando de administrar CNTF por encapsulación de células modificadas genéticamente para la liberación de este factor neurotrófico sin resultados esperanzadores (Bloch, J. y col., 2004; Emerich,

D.F., 2004). En el núcleo estriado no hay receptores específicos para el CNTF, aunque se ha descrito que puede interactuar con el receptor para interleukina 6 (Schuster, B. y col., 2003). Podría ser posible que este receptor actuase en el núcleo estriado sirviendo de manera específica para el CTNF. Esto plantea efectuar más estudios para conocer el mecanismo de acción antes que seguir con el uso de su potencial terapéutico.

En estos últimos años creció el uso de los implantes celulares, pero los resultados han sido en exceso demasiado variables. Se han usado fibroblastos modificados para sobreexpresar factores neuroprotectores (Perez-Navarro, E. y col., 1996; Perez-Navarro, E. y col., 1999b; Perez-Navarro, E. y col., 2000a; Rosenberg, M.B. y col., 1988), pero también se ha observado que, en ratas, estas células no se integran en el parénquima cerebral y suelen terminar a largo tiempo formando tumores (Hoffman, D. y col., 1993). En cambio, en la administración exógena de NGF en primates usando también fibroblastos (debido a que esta molécula no atraviesa la barrera hematoencefálica), logró desarrollar un extensivo estudio con el cuál pudieron constatar una producción del factor a corto y medio plazo sin observar aparentemente ninguna formación de tumores u otros daños discernibles (Conner, J.M. y col., 2001; Park, K.I. y col., 2002; Tuszynski, M.H. y col., 2005).

Mejor que el uso de los fibroblastos, tenemos el potencial que nos ofrecen las células madre. Aunque hoy por hoy los conocimientos son limitados, las propiedades inherentes de las células madre neurales o líneas de progenitores neuronales las hacen ideales no sólo para terapias de sustitución celular sino también para ser utilizadas como vehículos de liberación de moléculas neuroprotectoras. Numerosos estudios han demostrado que estas células muestran buena supervivencia y buena integración en el cerebro adulto. Migran extensamente y permanecen en estado indiferenciado quiescente, o bien se diferencian hacia fenotipos mayoritariamente gliales, sin formar tumores en ningún caso (Akerud, P. y col., 2001; Arenas, E., 2002; Martinez-Serrano, A. y Bjorklund, A., 1997). Son células manipulables genéticamente, con lo que fácilmente se les puede

## ***Introducción***

---

introducir genes terapéuticos, genes marcadores o genes suicidas (que permitiría eliminar las células una vez transplantadas, si ello fuera necesario).

El trasplante de células madre neurales manipuladas genéticamente se perfila, pues, como una estrategia realista para la administración de factores neuroprotectores (Akerud, P. y col., 2001; Akerud, P. y col., 2002) o para la restitución de proteínas defectuosas de forma local y selectiva en la región cerebral dañada (Snyder, E.Y. y col., 1995), de forma estable o incluso regulable, y en las dosis correctas, evitando así efectos secundarios y ectópicos. Permiten también prescindir de la manipulación genética de las neuronas del huésped, a diferencia de la transducción vírica.

Otra de las propiedades de las células madre neurales que en un futuro podrían ser enormemente útiles para los tratamientos neuroprotectores (y también neuroregeneradores) es su capacidad de migrar selectivamente hacia zonas del cerebro que han sido dañadas o han degenerado (Aboody, K.S. y col., 2000; Snyder, E.Y. y col., 1997). Dependiendo de la extensión del daño cerebral, este tropismo permitiría una liberación de forma local o por el contrario de forma más global en toda la zona afectada (Park, K.I. y col., 2002; Yandava, B.D. y col., 1999).

Algunos ensayos de neuroprotección usando células madre neurales ya han comprobado su eficacia en modelos experimentales. El GDNF tiene importantes efectos neuroprotectores sobre las neuronas dopaminérgicas, y su liberación intraestriatal por medio de células madre modificadas para sobreexpresarlo (bien sea GDNF u otros factores protectores como la neurturin o la persefina) consigue revertir los déficits motores en el modelo de lesión por 6-hidroxidopamina de la enfermedad de Parkinson (Akerud, P. y col., 2001; Akerud, P. y col., 2002). Del mismo modo se ha descrito el efecto protector del NGF y el BDNF secretados por células madre en modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington (Kordower, J.H. y col., 1997; Martinez-Serrano, A. y col., 1996), y se ha planteado e iniciado el estudio en humanos con enfermedad de Alzheimer

(Fumagalli, F. y col., 2006b; Tuszynski, M.H. y col., 2005), o de la NT-3 y otros factores tróficos en trasplantes de NSC en lesiones de la médula espinal (Lu, P. y col., 2003).

### 2.2.2.- TERAPIA DE SUSTITUCIÓN CELULAR

El uso de células, ya sea trasplantes neonatales estriatales (Kendall, A.L. y col., 2000), células madre neurales (Hurelbrink, C.B. y col., 2002; Lee, S.T. y col., 2005; Ryu, M.Y. y col., 2005), provenientes de fetos (Chen, G.J. y col., 2002; Hussain, N. y col., 2004; Rosser, A.E. y col., 2002), precursores neurales (Armstrong, R.J. y col., 2000; Lepore, A.C. y col., 2004), precursores embrionarios de células madre (Dihne, M. y col., 2006; Sanchez-Pernaute, R. y col., 2005) ha sido y está siendo profusamente empleado en la actualidad con resultados esperanzadores en cuanto a recuperación motora y/o funcional en los modelos animales (Brasted, P.J. y col., 2000; Chu, K. y col., 2004; Dunnett, S.B., 1995; Dunnett, S.B. y White, A., 2006; McBride, J.L. y col., 2004; Palfi, S. y col., 1998a; Tulipan, N. y col., 1986) y a la experiencia e información proporcionados (Dobrossy, M.D. y Dunnett, S. B., 2004; Dobrossy, M.D. y Dunnett, S. B., 2005; Lepore, A.C. y col., 2006; Palfi, S. y col., 1998b; Preusser, M. y col., 2006; Shindo, T. y col., 2006; Watts, C. y col., 2000a; Watts, C. y Dunnett, S. B., 2000; Wennersten, A. y col., 2006).

Los primeros estudios de enfermedad de Huntington en que se planteó el reemplazo de las neuronas muertas se remontan hacia el 1985 y se llevó a cabo con roedores lesionados con ácido iboténico a los cuales se les inyectó neuronas estriatales obtenidas de fetos de 14 a 15 días de vida, observándose una recuperación de los marcadores neuronales (Isacson, O. y col., 1985).

Desde entonces, se tienen suficiente información y conocimientos como para efectuar trasplantes celulares (Besret, L. y col., 2000), tanto de trozos de tejido como de suspensiones de células (Watts, C. y col., 2000b). Además se ha demostrado que implantes efectuados con

## ***Introducción***

---

suspensiones celulares disgregadas con tripsina acaban teniendo mejor integración y expresan más marcadores estriatales como DARPP-32 que los implantes de fragmentos de tejido (Watts, C. y Dunnett, S. B., 2000). Se han efectuado implantes de tejido fetal en los cuales se ha observado una mejora de los déficits cognitivos (Palfi, S. y col., 1998a). Los precursores neuronales han sobrevivido después de los trasplantes y un gran número de células se han diferenciado y han expresado marcadores neuronales, incluyendo DARPP-32, indicando que han logrado adoptar un fenotipo estriatal maduro, pero las fibras neuronales se ha visto que proyectan difusamente sin ninguna dirección específica (Armstrong, R.J. y col., 2000). Estos resultados denotan que estas células no pueden generar una circuitería neuronal óptima que pueda dar plena funcionalidad al núcleo regenerado.

Otros estudios trataron de recuperar la vía estriato-talámica con implantes de neostriado de rata, seis meses después se observó con desazón que algunas de las fibras que proyectaron correctamente las conexiones sinápticas eran completamente diferentes de lo esperable en un núcleo estriado normal (Xu, Z.C. y col., 1991).

Trasplantes intra-estriatales de tejido fetal en modelos excitotóxicos de enfermedad de Huntington han conseguido recuperar significativamente la sensibilidad y la respuesta electrofisiológica por la dopamina (Chen, G.J. y col., 2002). También se han efectuado trasplantes en animales transgénicos modelo de enfermedad de Huntington aunque todos ellos sin relevancia clínica (Dunnett, S.B. y col., 1998).

Hoy en día, pensar que implantando células madre se conseguirá que éstas migren, se diferencien y establezcan las conexiones que reemplacen a las células que han degenerado y muerto, es una utopía. Falta mucho para llegar hasta el punto de poder reproducir dentro de un cerebro adulto, enfermo, el patrón de expresión espacial y temporal de los factores que intervienen en la migración y diferenciación celular específica de las neuronas de un embrión en desarrollo.

Aún así se han planteado y efectuado trasplantes neurales en pacientes de Huntington. La primera prueba clínica fue en 1995 efectuada por el Dr. Madrazo (Madrazo, I. y col., 1995). Se transplantaron unilateralmente células estriatales de fetos de 13 semanas en las paredes ventriculares de los núcleos caudados de dos pacientes. Aunque los pacientes se vieron obligados a tomar inmunosupresores para evitar el rechazo a lo largo del tiempo los pacientes mostraron mejoras cognitivas y menor progresión de la enfermedad. Estos resultados sugirieron que los trasplantes fetales estriatales podían mejorar síntomas de la enfermedad de Huntington (Philpott, L.M. y col., 1997) y dieron pie a que años más tarde se efectuaran más intervenciones con resultados esperanzadores, ya que se observó que las células transplantadas podían sobrevivir hasta un año post operatorio, aunque desgraciadamente la mejora de los pacientes fue discreta (Bachoud-Levi, A. y col., 2000). Valorando los resultados y teniendo presentes sus dificultades técnicas como su escasez, heterogeneidad y razones éticas es comprensible que hoy en día se haya enfocado la investigación hacia la obtención de otros tipos celulares viables como pueden ser las células madre.

Por otra parte, las terapias de sustitución celular no deben ser necesariamente enfocadas o restringidas a la vía del trasplante (o implante) de células ajenas al cuerpo del huésped (fibroblastos, células fetales, etc.). Actualmente se sabe que existen fenómenos de neurogénesis y reemplazo neuronal en el sistema nervioso adulto, aunque son totalmente insuficientes para recuperar los daños causados por una enfermedad neurodegenerativa o un traumatismo. Sin embargo, se cree que estos fenómenos podrían ser estimulados de alguna forma para conseguir efectos beneficiosos.

Se sabe que la proliferación, supervivencia y muerte de las células madre neurales o progenitores neuronales endógenos están altamente regulados (Alvarez-Buylla, A. y col., 2002; Rossi, F. y Cattaneo, E., 2002).

Se ha observado como el aprendizaje, el ejercicio y la riqueza de estímulos del entorno incrementan claramente la neurogénesis, plasticidad y el reemplazo neuronal (Kempermann, G. y

## ***Introducción***

---



*Ilustración 20 La riqueza de estímulos proporcionados por el entorno incrementa tanto la neurogénesis como el reemplazo neuronal en el hipocampo (centro encargado de la memoria espacio-temporal).*

col., 1997; Kempermann, G. y col., 2002; Lie, D.C. y col., 2004; Naka, F. y col., 2005; Nottebohm, F., 2002; van, P.H. y col., 2000). El estrés, por el contrario, reduce la neurogénesis (Duman, R.S. y col., 1999), probablemente por la acción negativa de los glucocorticoides (Cameron, H.A. y McKay, R., 1998). Cabe mencionar que aparte del estrés las respuestas inmunitarias se han postulado recientemente que podrían ejercer también algún papel, ya que se ha observado que los linfocitos T interactúan de alguna manera facilitando la memoria, el aprendizaje espacial, y también la expresión del BDNF por parte de las neuronas del giro dentado, asociando así los mecanismos inmunológicos con la plasticidad y renovación neuronal en el hipocampo del cerebro adulto (Ziv, Y. y col., 2006).

Así, estrategias basadas en la estimulación de la proliferación y/o la reducción de la muerte de los progenitores neuronales mediante diversas vías como la administración de moléculas biológicamente activas podrían promover el reemplazo de las neuronas dañadas. En esta línea se está estudiando la acción de diversos factores, tales como el factor de crecimiento epidérmico

(EGF) (Craig, C.G. y col., 1996; Teramoto, T. y col., 2003), el factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF2) (Jin, K. y col., 2002; Kuhn, H.G. y col., 1997; Wagner, J.P. y col., 1999; Yoshimura, S. y col., 2001), el BDNF (Benraiss, A. y col., 2001; Chmielnicki, E. y col., 2004; Gustafsson, E. y col., 2003; Zigova, T. y col., 1998), el factor de crecimiento insulina-1 (IGF-1) (Aberg, M.A. y col., 2000), el factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ) (Fallon, J. y col., 2000), la eritropoyetina (Shingo, T. y col., 2001), inhibidores de caspasas (Ekdahl, C.T. y col., 2002) y antiinflamatorios (Ekdahl, C.T. y col., 2003; Monje, M.L. y col., 2003). La administración de algunos de estos factores incrementa la proliferación de precursores neuronales tanto en la zona subventricular como en el giro dentado. Se ha visto como muchas de estas nuevas células adquieren fenotipos neuronales, migran a otras zonas, como el núcleo estriado o el bulbo olfativo, y pueden integrarse funcionalmente (Lindvall, O. y col., 2004). Se ha postulado que el aumento de neurogénesis observados tras el ejercicio o el aprendizaje pueden estar mediados, de hecho, por el incremento de estos factores tróficos (Goldman, S.A., 1998; van, P.H. y col., 1999).

La neurogénesis también aumenta como consecuencia del daño o degeneración neuronal. Se sabe que ciertas lesiones, como la isquemia global o parcial (Jin, K. y col., 2003; Parent, J.M. y col., 2002; Peterson, D.A., 2002) o enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la enfermedad de Huntington (Curtis, M.A. y col., 2003) estimulan la proliferación de precursores de la zona subventricular, que migran a la zona dañada y adquieren un fenotipo neuronal correcto (Arvidsson, A. y col., 2002; Nakatomi, H. y col., 2002). Sin embargo, sólo se consiguen regenerar un porcentaje pequeñísimo (<0.2%) de las neuronas perdidas. Se han mostrado evidencias reales de la existencia de integración específica y funcional de nuevas neuronas en el hipocampo después de una isquemia global (Nakatomi, H. y col., 2002), lo que demuestra que el cerebro adulto conserva realmente la capacidad de regenerarse. También en regiones no neurogénicas, como el córtex, se ha observado un reemplazo neuronal funcional, después de una muerte fotolítica de las neuronas en la que no se causa un gran daño en la estructura global del tejido (Magavi, S.S. y col., 2000). Esta

## ***Introducción***

---

observación apoya la hipótesis de la existencia de señales gliogénicas e inhibitoras de la neurogénesis en la mayor parte de casos de daño cerebral, señales que podrían ser contrarrestadas farmacológicamente si conociéramos su naturaleza exacta (Rossi, F. y Cattaneo, E., 2002).

Una combinación de las estrategias de neuroprotección junto con el reemplazo celular de las neuronas perdidas ofrecería un máximo aprovechamiento de las propiedades de las células madre, puesto que se ha visto como muchas de ellas sintetizan y secretan una gran variedad de factores tróficos (Alberch, J. y col., 2002; Arenas, E., 2002; Lu, P. y col., 2003; Mattsson, B. y col., 1997).

---

# OBJETIVOS

**II**

Pág. 65



## II.- OBJETIVOS

### **1.- Estudio de la implicación del BDNF en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington.**

Caracterización de las consecuencias de una reducción de los niveles de BDNF endógeno en los animales transgénicos R6/1 como modelo de la enfermedad de Huntington en el núcleo estriado y la sustancia negra.

### **2.- Estudio de la terapia farmacológica por administración oral de la Cisteamina en modelos murinos de la enfermedad de Huntington.** Estudio del efecto neuroprotector de la administración oral de cisteamina: Implicación del BDNF.

### **3.- Estudio de la neuroprotección mediante terapia celular con células madre neurales modificadas para secretar el factor neurotrófico GDNF en modelos excitotóxicos para la enfermedad de Huntington.** Desarrollo de un método *no-invasivo* para detectar células transplantadas intracerebralmente *in-vivo*.

### **4.- Estudio de la terapia celular por sustitución de las neuronas estriatales muertas en modelos excitotóxicos de la enfermedad de Huntington implantando células madre neurales.**

4.1.- Caracterización de los factores que participan en la diferenciación de las células madre neurales ST14A hacia neuronas de proyección estriatales *in vitro*.

4.2.- Caracterización de la integración, supervivencia y fenotipo de estas células madre pre-diferenciadas en ratones usando el modelo excitotóxico de la enfermedad de Huntington.

