



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica

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

Tesis presentada por Jesús Fernando Torres Peraza

para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

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.

Dr. Jordi Alberch Vié

Dr. Josep María Canals Coll

Jesús Fernando Torres Peraza

Barcelona, Marzo de 2007

AGRADECIMIENTOS

Detrás del aspecto rígido, calculado y preciso del lenguaje científico en el que se expresan los resultados en esta tesis doctoral, existen palabras con todos los matices que resumen una gran aventura personal. Por ello, más que alegrarme al ver el final de este largo camino, doy gracias por haber podido recorrerlo, ya que en éste he compartido con personas que han enriquecido enormemente mi experiencia, convirtiéndola en uno de los episodios más importantes de mi vida.

La realización de esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin el apoyo y la confianza que en mi persona depositaron mis directores de tesis, el Dr. Jordi Alberch y el Dr. Josep María Canals. A ellos agradezco en primer lugar la oportunidad que me han brindado de trabajar en su laboratorio. Su experiencia y sabiduría, las cuales bien han sabido compartir conmigo, han servido para aprender la manera de trabajar en el campo científico y docente, y los han convertido en referentes dignos de seguir y admirar. Pero mi gratitud hacia los Drs. Alberch y Canals se extiende mucho más allá del campo académico, científico y profesional, y alcanza el ámbito personal. Gracias a sus consejos, a su consideración y en definitiva, a su amistad, he podido afrontar las dificultades que implica la realización de esta empresa lejos de mi país de origen. También, quisiera expresar mi gratitud y admiración a la Dra. Esther Pérez, quien aunque no estuviese directamente vinculada con la dirección de esta tesis, se mostró en todo momento dispuesta a colaborar conmigo, siempre con muy buen humor y gran tino científico. En definitiva, ha sido un verdadero lujo trabajar en este gran equipo.

Este trabajo ha sido posible gracias al soporte que he recibido de diferentes instituciones, como la “Fundación Gran Mariscal de Ayacucho”, la “Fundación La

Caixa" y la "Fundación Polar". De esta última agradezco especialmente al Dr. Ricardo Alezones y la Sra. Rodríguez por su apoyo y su gentil atención. Quisiera agradecer también al Dr. José Lucas y al Dr. Miguel Díaz por la oportunidad de participar en uno de sus proyectos, el cual forma parte de esta tesis doctoral. Además quisiera agradecer al Dr. Rafael Bonfante Cabarcas por haber abierto las puertas de su laboratorio donde me inicié en el campo de la investigación.

Afortunadamente, durante la realización de esta tesis he podido coincidir con personas extraordinarias, grandes profesionales e investigadores, y sobre todo excelentes compañeros de trabajo. Gracias a Nuria, Susan, Miquel y "JR" me inicié en el complicado mundo de las "inmunos", los "westerns" y hasta me aventuré (aunque fallidamente) en el linux. Ellos supieron transmitir, entre muchas cosas, su manera de trabajar, la habilidad de leer entre las líneas de un "paper" e incluso, su alegría al compartir en el laboratorio y fuera de éste. También tuve la dicha de compartir y trabajar con personas como Silvia y Xavi, a quienes agradezco el que siempre estuviesen accesibles para compartir protocolos y referencias, o solucionar problemas técnicos y a debatir muchas de las hipótesis que han aparecido durante el desarrollo de este trabajo. Dani, con su insuperable entusiasmo y gran disposición a ayudar a los demás; Noe, Empar y Solène (las "Stem Girls"), Paola y María (las "DOPA-girls") y Ana Saavedra, quienes a pesar de estar trabajando en temas un tanto diferentes al mío han podido soportar mis seminarios y de quienes con su gran dedicación he aprendido mucho sobre temas tan diversos e interesantes. Quisiera agradecer a Edurne y Albert por haberme mostrado lo mucho que se aprende enseñando, por confiar en mi criterio y haber participado activamente en el desarrollo de este trabajo. Por supuesto, quisiera reconocer la gran labor de Maite, Ana López y Cristina (las otras jefas del laboratorio) y de Nuria y Carmen (las maravillosas secretarias del departamento) quienes han

mantenido siempre el “orden” del laboratorio y/o del estabulario, por todos las comandas, las soluciones y los genotipados de última hora y, en definitiva, por su apoyo y su paciencia. Quisiera hacer una mención especial para agradecer a mis compañeros de “promoción”, Raquel y Juanma, por haber compartido muchos de los momentos desde el comienzo hasta el final de esta experiencia. La verdad es que así como mis compañeros de grupo, todos los compañeros de la unidad de histología (“los Gustavos”) han sido realmente especiales. Aunque son muchas las palabras que necesitaría para expresarles lo divertido que ha sido trabajar a vuestro lado, les puedo decir para no extenderme a la niña Inés, Cecilia, Yován, Frank y Javi que echaré de menos los “seminarios” de los jueves por la tarde y los partidos de fútbol. A todos ellos les expreso mi mas sincero agradecimiento por haber hecho del laboratorio un lugar ameno y familiar. De la misma manera, he de reconocer que este trabajo hubiese sido mucho más difícil sin la colaboración de personas como María y Ana de los servicios científico-técnicos de la Facultad de Medicina, o de Mery y todo el personal del estabulario de la facultad de medicina.

Este reto no lo hubiese podido afrontar sin el apoyo y el cariño de mi familia. Mis padres, quienes han inculcado en mis hermanos y en mí la importancia de los estudios y por incentivarnos a “volar lejos de casa” para lograr los objetivos que nos propongamos. Ellos han sido y siempre serán el mejor ejemplo a seguir. Mis hermanos quienes han estado siempre tan pendientes de nosotros y de quienes me siento enormemente orgulloso. De la misma manera quiero agradecer el apoyo y el cariño que he recibido de mis suegros, la Sra. Carmen y el Sr. Mario, así como de María del Rosario (mi cuñi bella), Tany Rafael, Luís Enrique y Roberto; y especialmente a Julián, Adriana y Julián (hijo), por todas las alegrías que vivimos en Barcelona y con quienes logré desconectar después de que me preguntaran: “...y todavía con la tesis ?”.

Además, quisiera agradecer el apoyo de todos mis tíos y mis primos, y de manera muy especial a mi tío David y a mi tía Gladys por su respaldo y su confianza.

Quisiera culminar expresándole mi más profundo agradecimiento a mi esposa Carmen Julia por su apoyo incondicional, por contagiarme de su espíritu alegre y de su optimismo y por haberme demostrado día a día su amor. Ella conoce mejor que nadie todos los detalles de este largo proceso y ha sido mi compañera y la co-protagonista en esta hermosa aventura desde que se mostró apenas como una remota posibilidad. Gracias.

A Carmen Julia

A mi madre

A mi padre

A mis hermanos

ABREVIACIONES

BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CaMKII	Quinasa dependiente de Calcio/Calmodulina alfa
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CREB	Proteínas de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMP cíclico de 32 KDa
DYN	Dinorfina
ENK	Encefalina
ERK	Quinasa regulada por la señal extracelular de Ras/proteína quinasa activada por mitógeno
GABA	Ácido γ -amino butírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de una línea celular glial
GPe	Globo pálido, segmento externo
GPi	Globo pálido, segmento interno
HAP	Proteína asociada a la huntingtina
HIP	Proteína de interacción con la huntingtina
Htt	Huntingtina
LMF	<i>Light membrane fraction</i>
NMDA	N-metil-D-aspartado
NMDAR	Receptores para NMDA
nNOS	Sintetasa de óxido nítrico
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4/5	Neurotrofina-4/5
ON	Óxido nítrico
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PSD	<i>Postsynaptic density</i>
QUIN	Quinolinato
SAP	<i>Synapsis associated protein</i>
SNC	Sistema nervioso central
SynGAP	<i>Synaptic RAS GTP-ase associated protein</i>
SP	Sustancia P
SPM	<i>Synaptic plasma membrane</i>

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.-La enfermedad de Huntington	4
2.-Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Huntington	4
3.-Anatomía patológica de la enfermedad de Huntington	5
3.1.-Los ganglios basales	6
3.2.-Histología del núcleo estriado	8
3.3.-Histopatología de la enfermedad de Huntington	10
4.-Etiología de la enfermedad de Huntington	15
4.1.-La huntingtina: Estructura, expresión y posibles funciones	16
4.2.-Teorías de la ganancia de función y de la pérdida de función de la huntingtina mutada.	19
4.3.-Modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington	21
4.3.1.-Ratones transgénicos que expresan el segmento N-terminal de la huntingtina mutada	22
4.3.2.-Ratones transgénicos que expresan la huntingtina mutada completa	25
5.-Fisiopatología de la enfermedad de Huntington	28
5.1.-Implicación de la excitotoxicidad en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington	29
5.1.1.-Receptores de glutamato: tipos de receptores y expresión en el núcleo estriado	30
5.1.2.-La excitotoxicidad en la enfermedad de Huntington	33
5.1.3.-La excitotoxicidad en modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington	36
5.1.4.-Proteínas de andamiaje y de señalización intracelular de los receptores NMDA: Las MAGUKS y la α CaMKII	39
5.1.5.-Implicación de las MAGUKS y la α CaMKII en la señalización neurotóxica de los receptores NMDA	43

5.1.6.-Las MAGUKS en la enfermedad de Huntington	45
5.2.-Implicación de las neurotrofinas en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington	47
5.2.1.-Factores neurotróficos	47
5.2.2.-Las neurotrofinas y sus receptores	49
5.2.3.-El BDNF y la NT-3: Expresión y funciones en el núcleo estriado	51
5.2.4.-Las neurotrofinas en modelos de la enfermedad de Huntington	54
II. OBJETIVOS	59
III. RESULTADOS	63
Trabajo 1: "BDNF Regulates the Onset and Severity of Motor Dysfunction Associated to Enkephalinergic Neuronal Loss in Huntington's Disease"	64
Trabajo 2: "Mice Heterozygous for the Neurotrophin-3 Display Enhanced Vulnerability to Excitotoxicity in the Striatum Through Increased Expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptors"	78
Trabajo 3: "Disruption of Striatal Glutamatergic Transmission Induced by Mutant Huntingtin involves remodeling of both Postsynaptic Density and NMDA Receptor Signalling"	89
Trabajo 4: "Full Motor Recovery Despite Striatal Neuron Loss and Formation of Irreversible Amyloid-like Inclusions in a Conditional Mouse Model of Huntington's Disease"	121
IV. DISCUSIÓN	131
1.-Implicación de las neurotrofinas en la neurodegeneración estriatal en modelos murinos de la enfermedad de Huntington	133
2.-Implicación de los receptores NMDA y de sus proteínas de señalización intracelular en la neurodegeneración estriatal en la enfermedad de Huntington	140

3.-Papel de los agregados intraneuronales de htt en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington	150
4.-Reversión de la neuropatología estriatal en modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington: Aproximaciones terapéuticas	156
V. CONCLUSIONES	165
VI. REFERENCIAS	169