

Estudio de las vías de supervivencia y muerte neuronal en modelos de la enfermedad de Huntington

Paola Paoletti Rubia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departamento de
Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
Facultad de Medicina

ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SUPERVIVENCIA Y MUERTE NEURONAL EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

**Tesis presentada por Paola Paoletti Rubia
para optar al título de Doctora por la Universidad de Barcelona**

Programa de Doctorado en Biomedicina

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Silvia Ginés, en el Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Dra. Silvia Ginés Padrós

Paola Paoletti Rubia

Barcelona, Julio de 2010

El verdadero buscador crece y aprende, y descubre que siempre es el principal responsable de lo que sucede.

Jorge Bucay

*A mis padres
A mi hermano
A Juan*

AGRADECIMIENTOS

Resulta complicado sentarse delante de una hoja en blanco para escribir los agradecimientos de esta Tesis, no porque no haya gente a la que agradecer sino todo lo contrario, porque en estos cuatro años son muchas las personas que habéis estado ahí, ayudándome, apoyándome y enseñándome, compartiendo conmigo buenos y no tan buenos momentos, por lo que resulta inevitable sentir que todas las palabras que aquí os pueda dedicar son pocas.

En primer lugar y ante todo, me gustaría agradecer a Jordi por haberme permitido la oportunidad de unirme a su grupo de investigación y desarrollar la Tesis doctoral en su laboratorio. De la misma manera, quiero agradecer a Silvia por haber confiado en mí para ser su primera estudiante pre-doctoral y sobre todo por haberme enseñado tantísimas cosas, tanto a nivel teórico como por supuesto a nivel práctico, de lo que supone trabajar en el mundo de la ciencia. Además, me has contagiado tu interés por el sorprendente mundo de las vías de señalización y los westerns... De todos tus consejos creo que nunca olvidaré que “un blot s’ha de mirar sempre amb molt d’amor i de carinyu”. Muchísimas gracias.

Asimismo, también quiero agradecer a Pep y a Esther, que aunque no hemos trabajado juntos directamente, vuestros comentarios y sugerencias, especialmente en los seminarios, han sido siempre de gran ayuda para aprender y para mejorar mi trabajo. Y hablando de ayuda... qué hubiera sido de estos cuatro años sin la ayuda de las “secres”, siempre disponibles para echarnos una mano con los pedidos y con todos los trámites y papeleos... Núria, Carme, gracias por ayudarnos a que las cosas parezcan más fáciles. Igualmente, quiero agradecer a Maite su gran labor en el laboratorio, por conseguir que éste funcione y mantenernos a raya... Sin ti, trabajar en el laboratorio sería realmente complicado.

En cuanto a los compañeros del “lab”... qué decir que ya no sepáis. Somos muchos, muchísimos, pero entre todos hemos conseguido que el día a día en el laboratorio sea más agradable y ameno, y eso se merece un GRACIAS en mayúsculas. Para aquellos que estabais aquí cuando llegué y que ahora ya hay que llamaros Doctores, JR, JuanMa, Jesús, Raquel, mil gracias por hacer más fácil mi entrada en el

laboratorio y por haber estado ahí siempre que surgía alguna duda. Y a los Doctores más recientes, Noe, agradecerte también tu alegría y tu espíritu científico, y Dani, gracias por tu ayuda siempre disponible y por saber tanto de tantas cosas diferentes. Muchas gracias a todos. Y no me olvido de María, “compi” de poyata, gracias por compartir conmigo tu experiencia y por los buenos momentos que pasamos rascando placas y placas...; y de Bego, tan alegre y con un espíritu de lucha increíble. Me habéis enseñado mucho, suerte a las dos.

Quiero agradecer también a Xavi, por su gran ayuda y paciencia conmigo, echándome una mano con las células y los tratamientos cuando entré en el laboratorio... en fin, de ferrarista a ferrarista, muchas gracias. Y a Albert, vecino de poyata, compañero de menú, también muchas gracias por tus sabios consejos y por tu gran ayuda, así como por las risas y buenos momentos que hemos compartido durante estos años. De la misma manera, guardo un recuerdo muy especial de las personas que os habéis ido incorporando al grupo detrás de mí. Muchas gracias a Ana, por tu perseverancia y paciencia por hacer las cosas bien hechas; a Laura, por tu optimismo y por estar siempre dispuesta a ayudar; a Marta “Parras”, gracias por aguantar los momentos de crispación de estos últimos meses de escritura; y Vero, por tu ayuda y tus consejos. Gracias también a las chicas de la 3ª planta, Ana, Cris, Miriam, Olga, por enseñarnos los entresijos del desarrollo embrionario y las células madre.

Del mismo modo, quiero agradecer a todos los “Gustavo’s”, tanto a los que seguís por el laboratorio como a los que ya no estais, y por supuesto también al propio Gustavo. Yován, Cecilia, Frank, Inés, Emma, Susana’s, mucha suerte a todos. A Bet, Enric, Laia y Carla, gracias por vuestra compañía. Javi, “compi” de máster y de papeleos, gracias por los buenos momentos que hemos compartido y mucha suerte en la aventura de papi. Y Adrià, gracias por las risas y las cervecitas, y por no haber creado de momento el grupo de facebook “Señoras concentradas que escriben la tesis” (jejeje).

Me gustaría agradecer de forma muy especial a las tres chicas que, cada una a su manera y a su tiempo, habéis compartido conmigo esta aventura y me habéis ayudado tantísimo. Empar, mi Emparito, empezamos prácticamente juntas este camino y has sido

mi gran compañera de aventura... tanto dentro del laboratorio: máster, comisiones de doctorado, presentaciones y trabajos; como fuera: cenas, cervecitas y muchas, muchas risas. Simplemente, muchísimas gracias por haber estado SIEMPRE ahí. Ingrid, compañera de laboratorio pero sobretodo amiga, mil gracias por haberme ayudado con los experimentos y... entre otras cosas, motivado para sacarme el carnet de conducir!! Aportaste una alegría "musical" al laboratorio y conseguiste poner algo de orden, que a veces resulta complicado. Muchas gracias. Y por último, Mar, "compi" de mesa y heredera del proyecto Cdk5 y del teléfono (jejeje), mucha suerte pero también, muchas gracias por tu simpatía y tu forma optimista y positiva de ver las cosas.

Y como durante estos cuatro años no todo ha sido trabajar, me gustaría dar las gracias a David y Sara, que con tanta cenita y fiesta, cine y poker, habeis conseguido que los fines de semana fueran realmente desestresantes. Además, agradeceros vuestro interés por querer saber exactamente qué se cuece en un laboratorio y qué es eso "del Huntington". Espero haveros convencido de que no somos tan "friquis" como pensais!

Y por último pero no por eso menos importante, quiero dar las gracias a mi familia. Agradecer en primer lugar a mis padres, por haber hecho todo lo que estaba en sus manos para que yo esté donde estoy ahora, por su apoyo incondicional y sus palabras de ánimo en TUDO momento. Asimismo, dar las gracias a mi hermano, Adrián, por su interés y su curiosidad por querer saber en qué consiste exactamente el trabajo de laboratorio y qué era eso que le hacía a las células. Muchas gracias a los tres. Y las últimas palabras son para Juan. Muchísimas gracias por alegrarme día a día, por confiar en mí y por "aguantarme" durante estos años. Sin tu ayuda y tu paciencia este camino hubiera sido muy diferente. Gracias por compartirlo a mi lado. Ah, y a Blasito, por su "silenciosa" compañía, horas y horas tumbado a mi lado, delante del ordenador.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

3-NP	3-nitropropiónico
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AGC	Del inglés, <i>cAMP-dependent protein kinases A, cGMP-dependent protein kinases G and phospholipid-dependent protein kinases C</i>
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATF2	Del inglés, <i>Activating transcription factor-2</i>
Bad	Del inglés, <i>Bcl-2-associated death promoter protein</i>
Bax	Del inglés, <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	Del inglés, <i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	Del inglés, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
Cdc42	Del inglés, <i>Cell division cycle-42 protein</i>
CDK	Del inglés, <i>Cyclin dependent kinase</i>
CREB	Del inglés, <i>c-AMP response element-binding</i>
Crmp2	Del inglés, <i>Collapsin response mediator protein-2</i>
DARPP-32	Del inglés, <i>Dopamine- and cyclic-AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa</i>
DNA	Del inglés, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOPAC	Del inglés, <i>3,4-dihydroxyphenylacetic acid</i>
DUSP	Del inglés, <i>Dual specificity phosphatase</i>
EGF	Del inglés, <i>Epidermal growth factor</i>
ERK	Del inglés, <i>Extracellular regulated kinase</i>
FAK	Del inglés, <i>Focal adhesion kinase</i>
Fox	Del inglés, <i>Forkhead box</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDNF	Del inglés, <i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GDP	Del inglés, <i>Guanosine diphosphate</i>
Grb2	Del inglés, <i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>
GSK-3	Del inglés, <i>Glycogen synthase kinase-3</i>
GTP	Del inglés, <i>Guanosine triphosphate</i>
HD	Del inglés, <i>Huntington's disease</i>
Hdh	Del inglés, <i>Huntington's disease gene homolog</i>
Htt	Proteína Huntingtina
ILK	Del inglés, <i>Integrin-linked kinase</i>
IP3	Del inglés, <i>Inositol trisphosphate</i>
IRS-1	Del inglés, <i>Insulin receptor substrate-1</i>
KA	Kainato
KO	Del inglés, <i>Knock-out</i>
L-DOPA	Del inglés, <i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>
MAGUK	Del inglés, <i>Membrane-associated guanylate kinase</i>
MAO	Monoamina oxidasa

MAPK	Del inglés, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAP-2	Del inglés, <i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein-2</i>
Mdm2	Del inglés, <i>Murine double minute 2</i>
MEK	Del inglés, <i>MAPK/ERK kinase</i>
MEF2	Del inglés, <i>Myocyte enhancer factor-2</i>
mGluR	Del inglés, <i>Metabotropic glutamate receptor</i>
mTOR	Del inglés, <i>Mammalian target of rapamycin</i>
MNK	Del inglés, <i>Menkes kinase</i>
MPTP	Del inglés, <i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>
MSK1,2	Del inglés, <i>Mitogen- and stress-activated protein kinase-1,2</i>
Munc18	Del inglés, <i>Mammalian uncoordinated-18 protein</i>
NCK5a	Del inglés, <i>Neuronal CDK5 activator</i>
NCK5ai	Del inglés, <i>Neuronal CDK5 activator isoform</i>
NF-κB	Del inglés, <i>Nuclear factor-κB</i>
NGF	Del inglés, <i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NR1/NR2	Del inglés, <i>NMDA receptor subunits</i>
NT-3 o 4/5	Neurotrofina-3 o Neurotrofina-4/5
P75NTR	Del inglés, <i>p75 neurotrophin receptor</i>
PDGF	Del inglés, <i>Plateled-derived growth factor</i>
PDK	Del inglés, <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PHLPP1	Del inglés, <i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase-1</i>
PI3K	Del inglés, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP3	Del inglés, <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PKA/B/C	Del inglés, <i>Protein kinase A/B/C</i>
PLC-γ	Del inglés, <i>Phospholipase C-γ</i>
PMA	Del inglés, <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PP1/2	Del inglés, <i>Protein phosphatase-1,2</i>
PSD-95	Del inglés, <i>Post-synaptic density of 95 kDa protein</i>
PSP	Del inglés, <i>Protein serine/threonine phosphatase</i>
PTEN	Del inglés, <i>Phosphatase on tensin homologue</i>
PTP	Del inglés, <i>Protein tyrosine phosphatase</i>
Rb	Proteína del Retinoblastoma
RSK	Del inglés, <i>Ribosomal s6 kinase</i>
SAPK/JNK	Del inglés, <i>Stress-activated protein kinase / c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
SEK1	Del inglés, <i>SAPK/ERK kinase-1</i>
Shc	Del inglés, <i>SRC homology 2 domain containing</i>
SM	Del inglés, <i>Sec1-Munc18 protein</i>
SNARE	Del inglés, <i>SNAP receptor</i>
SOS	Del inglés, <i>Son of sevenless protein</i>

STAT3	Del inglés, <i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
Syk	Del inglés, <i>Spleen tyrosine kinase</i>
TLN	Proteína Talina
Trk	Del inglés, <i>Tropomyosin-receptor kinase</i>
WAVE1	Del inglés, <i>WASP family verprolin-homologous protein-1</i>
YAC	Del inglés, <i>Yeast artificial chromosome</i>

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	3
1. 1.- EXCITOTOXICIDAD EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	9
1. 2.- TOXICIDAD POR DOPAMINA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	12
1. 3.- FACTORES NEUROTÓFICOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	16
2.- LA QUINASA CDK5	19
2.1.- CDK5: LA ENZIMA, MECANISMOS ACTIVADORES Y SUSTRATOS	20
2.1.1.- Activación y regulación de la quinasa Cdk5	21
2.1.2.- Funciones y sustratos de Cdk5	23
2.2.- PAPEL DE CDK5 EN LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS	25
2.2.1.- Cdk5 y la enfermedad de Huntington	27
3.- PRINCIPALES VÍAS INTRACELULARES DE SUPERVIVENCIA CELULAR	28
3.1.- LA VÍA DE LAS MAPK	28
3.1.1.- La vía de ERK1/2	29
3.1.2.- Papel de la vía de ERK1/2 en el sistema nervioso central	32
3.2.- LA VÍA DE LAS PI3K	33
3.2.1.- La vía de Akt/PKB	34
3.2.2.- Papel anti-apoptótico de la vía de la PI3K/Akt	36
3.3.- IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE LAS MAPK Y PI3K/AKT EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	37

II. OBJETIVOS **41**

III. RESULTADOS **45**

PRIMER TRABAJO: “Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington’s disease neurodegeneration: the role of p25/Cyclin-Dependent Kinase 5” 47

SEGUNDO TRABAJO: “Impaired TrkB-mediated ERK1/2 activation in Huntington’s disease knock-in striatal cells involves reduced p52/p46 Shc expression” 61

IV. DISCUSIÓN **89**

1.- POTENCIACIÓN DE VÍAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN PROCESOS DE MUERTE NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON 92

1.1.- IMPLICACIÓN DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y DOPAMINÉRGICO EN LA VULNERABILIDAD ESTRIATAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON 92

1.2.- ABERRANTE ACTIVACIÓN DE LA QUINASA CDK5 EN RESPUESTA A UNA ESTIMULACIÓN GLUTAMATÉRGICA Y DOPAMINÉRGICA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON 96

1.2.1.- Mecanismos moleculares que desregulan la actividad de Cdk5 100

1.2.2.- Dianas intracelulares de Cdk5 que desencadenan muerte celular 101

2.- DEFICIENTE ACTIVACIÓN DE VÍAS INTRACELULARES INVOLUCRADAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA SUPERVIVENCIA NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON 103

2.1.- ANÓMALA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE TRKB-ERK1/2 EN
RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON BDNF EN LA ENFERMEDAD
DE HUNTINGTON..... 103

V. CONCLUSIONES **109**

VI. BIBLIOGRAFÍA **113**

I. INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo muy conservado a nivel evolutivo, esencial para el correcto desarrollo y maduración de sistemas altamente diferenciados como el sistema nervioso. Este mecanismo es fundamental para la correcta formación de los circuitos neuronales que definen nuestras funciones sensoriales, motoras y cognitivas. La desregulación de estos procesos de muerte celular programada en el sistema nervioso puede alterar las poblaciones neuronales y/o causar malformaciones cerebrales (Kuida y col., 1996, 1998; Zheng y col., 1999).

Una característica común de múltiples trastornos neurodegenerativos es la pérdida irreversible de neuronas en el sistema nervioso central. Dado que los factores implicados en el programa de muerte celular están presentes de forma constitutiva en todas las células, no es extraño pensar que la misma maquinaria apoptótica que desempeña un papel relevante durante el desarrollo pueda reactivarse, bajo determinadas circunstancias, en el sistema nervioso adulto. Así, ante determinados procesos patológicos, la pérdida de equilibrio entre las vías de señalización pro-apoptóticas y pro-supervivencia puede traducirse en muerte neuronal (Weishaupt y col., 2003). Es por esto que resulta crucial identificar los mecanismos moleculares que selectivamente participan en la muerte neuronal con el fin de identificar posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos de señalización intracelular involucrados en la selectiva muerte estriatal en la enfermedad de Huntington con el objetivo de aportar nuevos datos para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas.

1.- LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Esta enfermedad, también conocida como Corea de Huntington, es la más común y más estudiada dentro del grupo de enfermedades neurodegenerativas de tipo poliglutamina (poli-Q), y presenta una prevalencia de 3-10 afectados por cada 100.000 individuos en Europa occidental y América del Norte (Vonsattel y DiFiglia, 1998). Esta enfermedad neurológica progresiva se caracteriza por la disfunción y muerte neuronal de áreas específicas del cerebro. La zona principalmente afectada es el estriado (núcleos caudado y putamen), aunque en etapas avanzadas de la enfermedad también se ha descrito una atrofia y pérdida neuronal de la corteza cerebral (de la

INTRODUCCIÓN

Monte y col., 1988; Mann y col., 1993). Como resultado de esta degeneración neuronal, los pacientes de Huntington presentan alteraciones motoras, asociadas a la atrofia estriatal, así como alteraciones cognitivas y del comportamiento, debido a la afectación cortical e hipocampal. La progresión de la enfermedad lleva a la muerte de los pacientes tras 15-20 años desde la aparición de los primeros síntomas (Martin y Gusella, 1986; Bates, 2003).

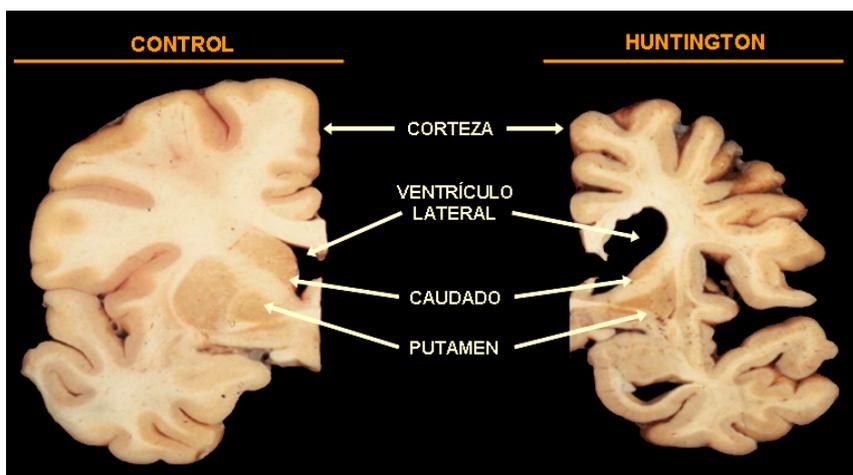


Figura 1. Patología de la enfermedad de Huntington. Secciones coronales en las que se aprecia atrofia cortical así como degeneración de los núcleos caudado y putamen, con el consecuente incremento de volumen del ventrículo lateral, en el cerebro afectado por la enfermedad de Huntington. Imagen adaptada de la página <http://hdroster.iu.edu>.

La enfermedad de Huntington fue descrita inicialmente en 1872 por George Huntington, quien identificó las manifestaciones clínicas y el carácter hereditario autosómico dominante de la enfermedad (Huntington, 1872), pero no fue hasta 1993 cuando se descubrió la mutación genética que causa la enfermedad (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Esta mutación consiste en una expansión inestable del triplete citosina-adenina-guanina (CAG) localizado en la región codificante del gen *HD*. Este gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 4 y codifica para una proteína de 350 kDa llamada huntingtina (htt). La mutación en el gen *HD* se traduce en una proteína htt mutada que contiene en el extremo N-terminal una cola de poliglutaminas (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Perez-Navarro y col., 2006). El número de repeticiones CAG es determinante para la aparición de la enfermedad. De esta manera, las personas no afectadas presentan entre 6 y 35 repeticiones del triplete, mientras que las personas con 40 o más repeticiones desarrollarán la enfermedad. El rango de 35-39 repeticiones está asociado con un mayor riesgo de padecer la enfermedad (Myers y col., 1988). Además, existe una relación directa entre el número de repeticiones CAG y la

gravedad de la enfermedad, siendo ésta mucho más severa y con unos síntomas de aparición más temprana cuanto mayor es el número de repeticiones (Duyao y col., 1993; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

A pesar de que la proteína htt mutada se expresa de manera ubicua tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos, su expresión induce una pérdida neuronal selectiva que afecta a determinadas zonas cerebrales y, dentro de las diferentes áreas, determinados tipos neuronales (Strong y col., 1993; Bhide y col., 1996). Así, la principal zona afectada en la enfermedad de Huntington es el núcleo estriado (caudado-putamen). Dentro del núcleo estriado encontramos las neuronas de proyección y las interneuronas. Mientras que las neuronas de proyección son mucho más numerosas, representando un 90-95% de la población estriatal, utilizando GABA como neurotransmisor, las interneuronas únicamente representan el 5-10% y ejercen un papel importante en el control de la excitabilidad de las neuronas de proyección. Durante el desarrollo de la enfermedad, las neuronas GABAérgicas de proyección sufren un marcado proceso neurodegenerativo (Ferrante y col., 1991) mientras que las interneuronas prácticamente no se ven afectadas (Ferrante y col., 1985, 1987; Vonsattel y col., 1985).

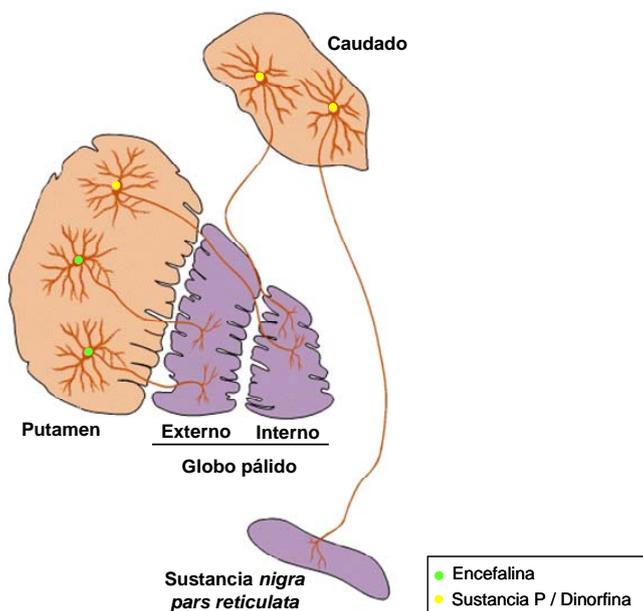


Figura 2. Estructura de los ganglios basales. Representación de las diferentes poblaciones de neuronas GABAérgicas de proyección que componen el núcleo estriado. Imagen modificada de *Neuroscience*, 2nd edition (2001) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

Esta neurodegeneración dependiente de tipo celular es aún más específica, afectando de diferente manera a las distintas subpoblaciones de neuronas de proyección. Así las neuronas estriatales que proyectan sus axones al globo pálido externo y utilizan encefalina como co-transmisor se ven antes afectadas y de forma

más severa que las neuronas estriatales que expresan sustancia P y dinorfina, y proyectan sus axones a la sustancia *nigra pars reticulata* y al globo pálido interno (Reiner y col., 1988; Albin y col., 1992; Richfield y col., 1995; Mitchell y col., 1999; Glass y col., 2000). La degeneración que afecta a las neuronas corticales en etapas más avanzadas de la enfermedad también sigue un patrón específico, dependiente de tipo celular, viéndose principalmente afectadas las neuronas piramidales de proyección de las capas III, V y VI de la corteza motora y asociativa (Cudkowicz y Kowall, 1990; Hedreen y col., 1991; Sotrel y col., 1991; Wagster y col., 1994; MacDonald y Halliday, 2002).

Aún hoy se desconoce la relación directa entre la presencia de htt mutada y los mecanismos moleculares implicados en la selectiva muerte neuronal en la enfermedad de Huntington. Para poder entender cuál es la actividad patológica inducida por la htt mutada es necesario conocer en primer lugar las funciones fisiológicas que esta proteína desempeña. Diferentes estudios han demostrado un papel esencial de la htt durante el desarrollo embrionario, ya que la delección de esta proteína en ratones KO (*knock-out*) para el gen *Hdh* (gen *HD* en humanos) resulta letal en etapas embrionarias (Duyao y col., 1995; Nasir y col., 1995; Zeitlin y col., 1995). Sin embargo, el papel de la htt durante el desarrollo embrionario es independiente de la longitud de poliglutaminas, ya que la presencia de htt mutada compensa la ausencia de htt endógena y rescata de la muerte embrionaria en los ratones KO para el gen *Hdh* (Leavitt y col., 2001). A nivel celular, la proteína se localiza en el citoplasma, asociada a diferentes orgánulos como el aparato de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas sinápticas, microtúbulos y mitocondria, estando implicada en procesos de transporte de vesículas, endocitosis y señalización post-sináptica, así como a nivel nuclear donde interacciona con proteínas involucradas en transcripción génica (Gutekunst y col., 1998; Harjes y Wanker, 2003; Landles y Bates, 2004; Li y Li, 2004). Además, también se ha demostrado que la htt desempeña una importante función anti-apoptótica. En diferentes estudios *in vitro*, la htt actúa impidiendo la activación de las caspasas 3 y 9 frente a estímulos tóxicos (Rigamonti y col., 2000, 2001; Zhang y col., 2006). Dadas todas estas funciones fisiológicas de la htt, se ha postulado que una pérdida de función debido a la mutación de la proteína podría contribuir a la neuropatología característica de la enfermedad de Huntington (Cattaneo y col., 2005). Sin embargo, también existen evidencias que avalan la hipótesis de que la expansión de poliglutaminas en la htt confiere nuevas funciones tóxicas a esta proteína, siendo la ganancia de función el desencadenante del proceso neurodegenerativo. Así pues, está en debate el saber si la

neurodegeneración en la enfermedad de Huntington es debida a una pérdida o a una ganancia de función de la proteína htt, o a ambos procesos.

Una de las características patológicas de la enfermedad de Huntington es la presencia de agregados intracelulares de htt. Se desconoce el mecanismo exacto por el que se forman estos agregados insolubles de htt, aunque sí existe una clara relación entre la longitud de CAG y la densidad de agregados (Vonsattel y col., 1985; Myers y col., 1988; Becher y col., 1998). Estas evidencias sugirieron que la expansión de glutaminas podría estar distorsionando la estructura de la proteína, facilitando su propia agregación (Ross y Poirier, 2004, 2005). Además, el hecho de que se detecte marcaje de ubiquitina en los agregados sugiere que una alteración en el sistema de degradación ubiquitina-proteasoma podría también estar implicado en la formación de agregados de htt (Hernandez y col., 2004; Ross y Pickart, 2004; Venkatraman y col., 2004; Ortega y col., 2010). Si bien la presencia de agregados de htt es una característica propia de la enfermedad de Huntington, se desconoce el papel exacto que juegan estos agregados en el desarrollo de la patología. Así, teniendo en cuenta los diferentes estudios al respecto, la formación de agregados de htt podría tener un efecto tóxico para la supervivencia celular, dando lugar al proceso neurodegenerativo (Davies y col., 1997; DiFiglia y col., 1997; Ordway y col., 1997; Becher y col., 1998), podría ser un proceso no tóxico para la célula (Kim y col., 1999; Leavitt y col., 1999) o incluso podría ser un mecanismo neuroprotector, favoreciendo la supervivencia neuronal (Saudou y col., 1998; Arrasate y col., 2004; Ravikumar y col., 2004). Así pues, el debate sobre el papel que desempeñan los agregados de htt en la enfermedad de Huntington está actualmente abierto.

El desarrollo de modelos animales de la enfermedad de Huntington ha representado un importante avance científico para la investigación de esta enfermedad, a pesar de que dichos modelos no reproducen exactamente la enfermedad humana. Teniendo esto en cuenta, los mejores modelos serían aquellos que recapitulan las principales características de la enfermedad de Huntington, presentando cambios relevantes del comportamiento así como alteraciones neuropatológicas. Los diferentes modelos murinos desarrollados muestran distintos fenotipos en función de dónde y cómo se expresa la htt mutada en el genoma murino. De esta manera, encontramos (1) ratones que expresan, además de los dos alelos del propio gen *Hdh* murino, el exón 1 o los exones 1 y 2 del gen *HD* humano con las mutaciones de poliglutamina (modelos R6) (Mangiarini y col., 1996; Schilling y col., 1999; Laforet y col., 2001); (2) ratones que expresan el exón 1 del gen *HD* humano de

INTRODUCCIÓN

forma condicional, inhibiéndose la expresión de htt mutada mediante la administración de doxiciclina (modelo Tet/HD94) (Yamamoto y col., 2000; Martín-Aparicio y col., 2001; Díaz-Hernández y col., 2005); (3) ratones que expresan el gen completo *HD* humano (modelos YAC) (Hodgson y col., 1996; Reddy y col., 1998) y (4) ratones que contienen las repeticiones de CAG insertadas en el propio gen murino *Hdh* (modelos *knock-in*) (White y col., 1997; Wheeler y col., 2000; Menalled y col., 2003). A partir de estos modelos murinos *knock-in* se han generado líneas celulares estriatales estables que expresan de forma endógena la htt mutada y que representan un modelo celular neuronal idóneo para llevar a cabo estudios bioquímicos y de biología celular (Trettel y col., 2000). Mientras que los modelos murinos que expresan la htt completa son genéticamente más precisos, desarrollan el fenotipo de la enfermedad de manera gradual a lo largo de los meses, pudiendo llegar a morir antes de manifestar una clara sintomatología motora. Por el contrario, los modelos que expresan el fragmento de la htt mutada desarrollan una sintomatología motora rápidamente, muriendo a los 3-4 meses de edad (Ferrante, 2009).

Modelo murino	CAG	Características	Referencias
R6/1 (1)	116	Pérdida de peso a partir de las 22 semanas. Alteraciones motoras desde los 4-5 meses. Agregados de htt a partir de los 2 meses. Atrofia neuronal sin pérdida de neuronas. Esperanza de vida de 32-40 semanas.	Mangiarini y col., 1996; Naver y col., 2003; Ferrante, 2009
R6/2 (1)	144-150	Pérdida de peso desde las 8-9 semanas. Alteraciones motoras desde las 4-5 semanas. Agregados de htt a desde el primer mes. Atrofia neuronal. Pérdida de neuronas y astrogliosis a partir de los 3 meses. Esperanza de vida de 14-21 semanas.	Mangiarini y col., 1996; Stack y col., 2005; Ferrante, 2009
Tet/HD94 (2)	94	Alteraciones motoras desde las 12 semanas. Agregados de htt desde las 10-12 semanas. Atrofia estriatal sin pérdida neuronal, y astrogliosis evidente a las 18 semanas. Esperanza de vida normal.	Yamamoto y col., 2000; Martín-Aparicio y col., 2001; Díaz-Hernández y col., 2005
YAC128 (3)	128	Alteraciones motoras a partir de los 4 meses. Agregados de htt desde los 18 meses. Atrofia y pérdida neuronal a los 12 meses. Esperanza de vida normal.	Van Raamsdonk y col., 2005, 2007; Ferrante, 2009
HdhQ111 (4)	109-111	Alteraciones motoras sutiles a los 24 meses. Inclusiones nucleares a los 12 meses. Astrogliosis a los 24 meses. Esperanza de vida normal.	Wheeler y col., 2000, 2002; Ferrante y col., 2009

Tabla 1. Modelos murinos genéticos de la enfermedad de Huntington. (1) Modelos que expresan el exón 1 del gen *HD* humano además de los dos alelos del gen *Hdh* murino; (2) Modelo que expresa el exón 1 del gen *HD* humano de forma condicional; (3) Modelo que expresa el gen *HD* humano completo; (4) Modelo que contiene las repeticiones CAG insertadas en el propio gen *Hdh* murino.

Dado que la htt mutada se expresa de forma ubicua, la afectación neuronal selectiva que se observa en la enfermedad de Huntington debe estar relacionada no sólo con la expresión *per se* de la htt mutada sino también con las propiedades intrínsecas de cada tipo neuronal y el contexto o ambiente celular en el que se encuentran. De este modo, se ha postulado que, junto a la htt mutada, otros mecanismos, como la excitotoxicidad, la toxicidad dopaminérgica o la deficiencia de factores neurotróficos, entre otros, podrían contribuir a la neurodegeneración selectiva característica de la enfermedad de Huntington.

1. 1.- EXCITOTOXICIDAD EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

El núcleo estriado recibe una densa inervación glutamatérgica, principalmente de la corteza cerebral, lo que hace que sea una estructura especialmente susceptible de sufrir daño excitotóxico mediado por glutamato (Gerfen, 1992).

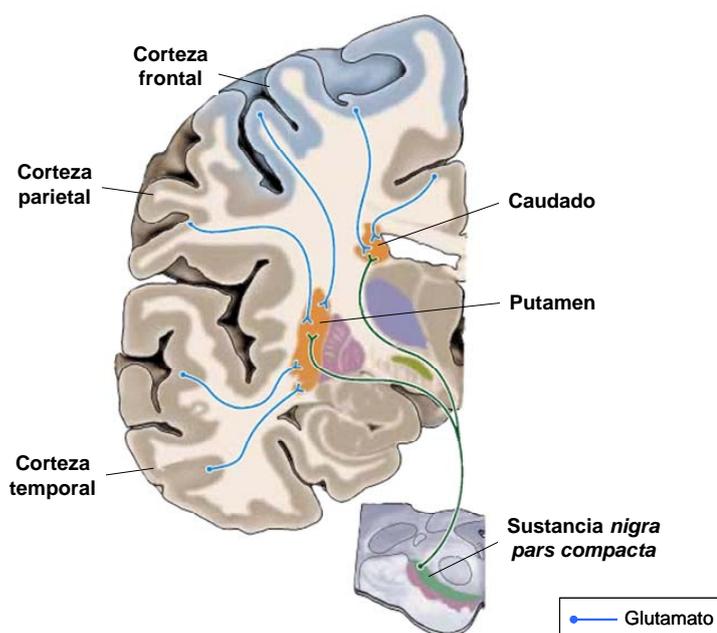


Figura 3. Organización anatómica de las aferencias de los ganglios basales. Sección coronal donde se representan las proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral que inervan los núcleos caudado y putamen. Imagen modificada de *Neuroscience, 2nd edition (2001)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

Este neurotransmisor ejerce su actividad vía receptores glutamatérgicos de dos tipos: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son canales iónicos dependientes de ligando, entre los que se encuentran los NMDA (N-metil-D-

aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropionato) y KA (kainato). Por el contrario, los de tipo metabotrópico, denominados mGluR y de los que se conocen 8 tipos diferentes (mGluR₁₋₈), son receptores acoplados a proteínas G que inducen la activación de sistemas de mensajeros secundarios, como el inositol-3-fosfato (IP3), que a su vez promueve la movilización de calcio desde el retículo endoplasmático (Hollmann y Heinemann, 1994).

La excitotoxicidad es el resultado de una excesiva estimulación de los receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico que lleva a la muerte neuronal, principalmente por la entrada masiva de calcio (Choi, 1988). La hipótesis excitotóxica se empezó a tener en cuenta en el contexto de la enfermedad de Huntington cuando se observó que la administración estriatal de agonistas glutamatérgicos reproducía algunas de las características bioquímicas y neuropatológicas de la enfermedad (Coyle y Schwarcz, 1976; Schwarcz y Kohler, 1983; Beal y col., 1986). De entre los agonistas glutamatérgicos testados, la inyección intra-estriatal de ácido quinolínico, agonista de los receptores de NMDA, es la que mejor reproduce la neuropatología observada en la enfermedad de Huntington, tanto en modelos de rata y ratón (Beal y col., 1986, 1989; Hansson y col., 1999) como en modelos de primates no humanos (Ferrante y col., 1993).

El resultado de una activación patológica de los receptores de NMDA es una entrada masiva de calcio, lo que a su vez afecta las cascadas de señalización intracelular y la correcta función de los mensajeros secundarios. De esta manera, se rompe el equilibrio homeostático del calcio en la célula, alterándose la capacidad de compartimentalizar el calcio en reservorios intracelulares, con la consecuente activación de toda una serie de enzimas catabólicas, como nucleasas, proteasas y fosfolipasas, además de la producción de radicales libres y daño mitocondrial (Dugan y col., 1995; Reynolds y Hastings, 1995; Peng y Greenamyre, 1998; Berliocchi y col., 2005). Todo esto tiene como resultado final la disfunción y muerte celular.

Inicialmente, se pensó que las neuronas con mayor expresión de receptores de NMDA podrían ser las más vulnerables (Young y col., 1988; Albin y Gilman, 1990) pero, el hecho de que tanto las neuronas estriatales de proyección como las interneuronas expresen en gran cantidad estos receptores (Standaert y col., 1994; Landwehrmeyer y col., 1995), hizo pensar que debían haber otros mecanismos que explicaran la muerte selectiva observada en la enfermedad de Huntington. En la actualidad, se postula que las diferentes subunidades que componen los receptores de

NMDA podrían estar relacionadas con el proceso neurodegenerativo selectivo (Perez-Navarro y col., 2006; Fan y Raymond, 2007). Estos receptores están formados por una combinación de las subunidades NR1 y NR2A-D (Hollmann y Heinemann, 1994). Mientras que la subunidad NR1 es imprescindible para la correcta funcionalidad del receptor, los diferentes tipos de subunidades NR2 confieren diferentes propiedades al receptor (Schoepfer y col., 1994). Así, los receptores de NMDA de las neuronas estriatales de proyección y las interneuronas presentan una diferente composición de subunidades. Todas las neuronas estriatales expresan unos niveles similares de la subunidad NR1 (Chen y Reiner, 1996; Chen y col., 1996; Ghasemzadeh y col., 1996). Por el contrario, mientras que las neuronas de proyección expresan mayoritariamente la subunidad NR2B, y la NR2A en menor cantidad, las interneuronas expresan principalmente la subunidad NR2D, y en menor cantidad la NR2A y NR2C (Standaert y col., 1994; Landwehrmeyer y col., 1995; Chen y col., 1999). Curiosamente, los receptores de NMDA formados por las subunidades NR2C o NR2D presentan una menor afinidad por el ácido quinolínico en comparación con los que contienen las subunidades NR2A o NR2B (Buller y col., 1994), hecho que podría explicar la resistencia a la excitotoxicidad por NMDA de las interneuronas. Por otro lado, los receptores de NMDA que contienen la subunidad NR2B predominan a nivel extra-sináptico, mientras que los formados por la subunidad NR2A se encuentran enriquecidos en las sinapsis (Li y col., 1998; Tovar y Westbrook, 1999; Barria y Malinow, 2002). En relación a esto, diferentes estudios han demostrado que la activación de los receptores de NMDA extra-sinápticos estaría preferentemente asociada con vías intracelulares involucradas en muerte celular, mientras que los receptores de NMDA sinápticos estarían más vinculados con procesos de supervivencia celular (Hardingham y col., 2002; Hardingham y Bading, 2003; Soriano y col., 2006; Okamoto y col., 2009).

Estos datos plantean la cuestión de si la htt mutada es capaz de modificar la actividad de los receptores de NMDA. Diversos estudios han descrito que la actividad y la estabilidad de los receptores de NMDA en la superficie celular están moduladas por cambios en los niveles de fosforilación de las subunidades de dichos receptores (Chen y Roche, 2007). En relación con esto, diferentes estudios han demostrado que la presencia de la htt mutada incrementa la fosforilación de la subunidad NR2B, promoviendo procesos de muerte celular (Song y col., 2003). Por otro lado, la funcionalidad alterada de los receptores de NMDA se ha asociado con cambios en la proteína PSD-95 (*post-synaptic density of 95 kDa*). Ésta es una proteína estructural que colocaliza con la htt e interacciona con los receptores de NMDA, promoviendo su

agrupación en la membrana plasmática y regulando su actividad (Kim y Sheng, 2004). La presencia de la expansión de poliglutaminas en la htt mutada altera la interacción del receptor de NMDA con la proteína post-sináptica, impidiendo que la htt salvaje pueda unirse. Se ha sugerido que esta falta de interacción de la htt salvaje con PSD-95 potencia la sensibilización de los receptores de NMDA debido a una mayor interacción de estos con la proteína post-sináptica, incrementando así la muerte neuronal excitotóxica (Sun y col., 2001; Fan y col., 2009).

Múltiples estudios *in vitro* avalan la hipótesis según la cual la excitotoxicidad característica de la enfermedad de Huntington sería consecuencia, en parte, de una mayor actividad de los receptores de NMDA (Zeron y col., 2004; Tang y col., 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de estudios *in vivo* son controvertidos. Mientras que la administración intra-estriatal de ácido quinolínico causa daño neuronal en los modelos murinos que expresan la htt completa (Zeron y col., 2002), no se observa muerte neuronal en los modelos R6 que expresan únicamente un fragmento de la htt (Hansson y col., 1999). Se ha sugerido que estas discrepancias en los resultados obtenidos pueden ser debidas a la diferencia en el número de repeticiones CAG o a la longitud de la htt que expresan los distintos modelos, así como a la etapa de la enfermedad en el que se encontraban los animales cuando fueron tratados (Estrada Sánchez y col., 2008). Junto a esto, se ha observado que los modelos R6 desarrollan gradualmente una resistencia a la administración de ácido quinolínico (Hansson y col., 2001; Torres-Peraza y col., 2008). De esta manera, se ha observado que en el modelo R6/1 existe una reducción en los niveles de expresión de las proteínas de andamiaje de los receptores de NMDA, MAGUKs (Torres-Peraza y col., 2008). Asimismo, también se ha caracterizado en el modelo R6/1 una reducción de la proteína calcineurina (Xifro y col., 2009), importante mediadora de la toxicidad inducida por NMDA en modelos celulares que expresan la htt mutada completa (Xifro y col., 2008). Estos resultados sugieren que la expresión únicamente del exón 1 de la htt mutada induce un grado sub-letal de excitotoxicidad capaz de desencadenar en las neuronas estriatales un proceso de adaptación al daño excitotóxico, principalmente mediante la potenciación de mecanismos de supervivencia celular.

1. 2.- TOXICIDAD POR DOPAMINA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Además de la inervación glutamatérgica, el núcleo estriado recibe también una densa inervación dopaminérgica proveniente de la sustancia *nigra pars compacta*

(Gerfen, 1992), lo que ha llevado a hipotetizar que la dopamina podría participar en la selectiva degeneración estriatal observada en la enfermedad de Huntington. Este neurotransmisor ejerce su función a través de la interacción con receptores transmembrana acoplados a proteínas G. Existen 5 tipos de receptores de dopamina que, debido a sus similitudes estructurales y farmacológicas, se clasifican principalmente en 2 grupos: los receptores del tipo D₁ y los del tipo D₂. Los del tipo D₁ engloban los receptores D₁ y D₅, mientras que los del tipo D₂ incluyen los receptores D₂, D₃ y D₄ (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

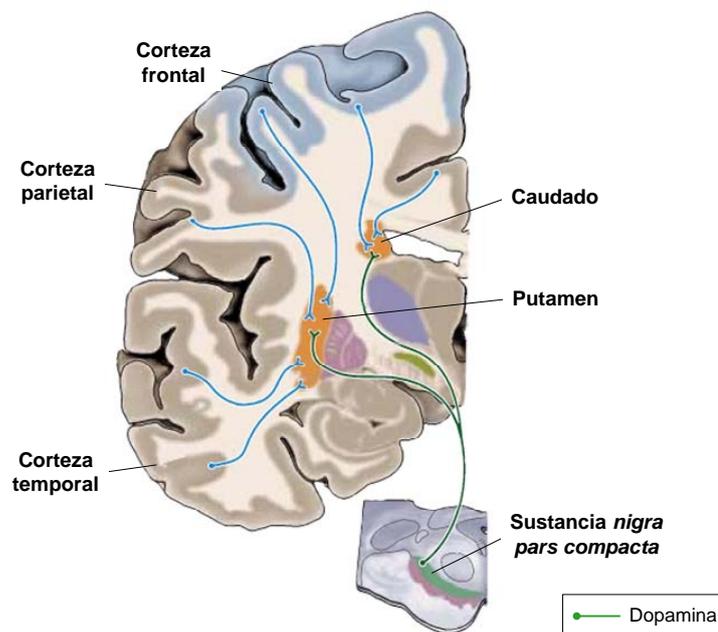


Figura 4. Organización anatómica de las aferencias de los ganglios basales. Sección coronal donde se representan las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra pars compacta que inervan los núcleos caudado y putamen. Imagen modificada de *Neuroscience, 2nd edition (2001)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

El primer indicio que llevó a pensar que la señalización dopaminérgica podía estar involucrada en la neurodegeneración característica de la enfermedad de Huntington fue la observación de que pacientes asintomáticos afectados por la enfermedad desarrollaban disquinesia en respuesta a la administración de L-DOPA (Klawans y col., 1970). Posteriormente se describió que la administración de antagonistas dopaminérgicos era efectiva para el tratamiento de la corea asociada a la enfermedad, mientras que los agonistas dopaminérgicos potenciaban estos movimientos (Sourkes, 1976). Desde entonces, múltiples resultados experimentales han corroborado la posible implicación del sistema dopaminérgico en la enfermedad de Huntington. Así, se ha observado una degeneración de las proyecciones

nigroestriatales (Ferrante y Kowall, 1987; Ginovart y col., 1997; Bohnen y col., 2000; Suzuki y col., 2001), atrofia de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* (Oyanagi y col., 1989; Yohrling y col., 2003) y una marcada reducción en el número de proyecciones dopaminérgicas estriatales en muestras de pacientes afectados por la enfermedad (Huot y col. 2007). Asimismo, se ha descrito que existe una reducción en los niveles del transportador de dopamina y de los receptores D₁ y D₂ en pacientes de Huntington, tanto sintomáticos como asintomáticos (Weeks y col., 1996; Augood y col., 1997; Ginovart y col. 1997). Diferentes trabajos han demostrado que los modelos murinos de la enfermedad reproducen parcialmente esta disfunción dopaminérgica observada en los pacientes de Huntington. Así, los déficits dopaminérgicos son más evidentes en los modelos transgénicos R6 (Bibb y col., 2000; Hickey y col., 2002; Petersen y col., 2002), que presentan una rápida progresión de los síntomas de la enfermedad (Mangiarini y col., 1996), en comparación con los modelos que expresan la htt completa. Estas alteraciones del sistema dopaminérgico incluyen reducción de los niveles de los receptores D₁ y D₂ de dopamina (Cha y col., 1998), déficits en los contenidos de dicho neurotransmisor (Reynolds y col., 1999), afectación de la respuesta motora a estimulantes dopaminérgicos (Hickey y col., 2002) y mayor afectación del sistema dopaminérgico al reducir la expresión endógena de BDNF (Pineda y col., 2005).

A pesar de que la dopamina se expresa en elevadas cantidades en el estriado (Sano y col., 1959), se ha postulado que la dopamina *per se* podría tener también efectos neurotóxicos. De hecho, el efecto tóxico inducido por la dopamina podría ser consecuencia de la formación de metabolitos oxidativos, resultado de la degradación del neurotransmisor, generando así estrés oxidativo celular. En condiciones normales, la enzima monoamina oxidasa (MAO) transforma la dopamina en DOPAC y H₂O₂. Sin embargo, por procesos no enzimáticos la dopamina puede auto-oxidarse dando lugar a quinonas, semiquinonas y radicales superóxido (Sulzer y Zecca, 2000). El carácter pro-oxidante de la dopamina ha quedado patente en estudios en los que niveles incrementados de dopamina se han traducido en una mayor presencia de radicales hidroxilo en células de neuroblastoma (Graham y col., 1978), así como una elevada concentración de glutatión oxidado en neuronas mesencefálicas (Spina y Cohen, 1988; Han y col., 1996). Además, el uso de antioxidantes resulta ser neuroprotector frente a la muerte neuronal mediada por dopamina en neuronas corticales (Rosenberg, 1988), estriatales (McLaughlin y col., 1998) y células de neuroblastoma (Offen y col., 1996). No obstante, otros estudios plantean la posibilidad de que la dopamina pueda ejercer un efecto tóxico a través de mecanismos dependientes de la interacción del

neurotransmisor con sus receptores. La participación del receptor D₁ ha quedado patente en estudios *in vitro*, utilizando diferentes modelos celulares estriatales, en los que la muerte celular mediada por dopamina se revierte con el uso del antagonista D₁ SCH23390, mientras que el uso del agonista D₁ SKF38393 resulta ser citotóxico (Chen y col., 2003, 2004). Del mismo modo, la activación del receptor D₂ también se ha implicado en procesos de neurotoxicidad por dopamina. Así, estudios *in vitro* han demostrado que el uso del agonista D₂ quinpirol induce mecanismos de muerte celular apoptótica (Coronas y col., 1997). Relacionado con la enfermedad de Huntington, un estudio más reciente, en el que se han utilizado cultivos primarios de neuronas estriatales, ha vinculado la formación de agregados de htt con la activación dopaminérgica, concretamente con los receptores D₂. Así, mientras que el uso de agonistas del receptor D₂ mimetiza el efecto de la dopamina en la formación de agregados, la administración del antagonista D₂ la revierte (Charvin y col., 2005). De la misma manera, un estudio *in vitro* utilizando un modelo celular estriatal exón-1 ha demostrado que el uso de un antagonista del receptor D₂ disminuye el daño mitocondrial inducido por la presencia de htt mutada (Benchoua y col., 2008).

Por último pero no menos importante, se ha propuesto un mecanismo alternativo para explicar la actividad neurotóxica de la dopamina según el cual existiría una relación entre la dopamina y los mecanismos de excitotoxicidad mediados por glutamato (Jakel y Maragos, 2000). De esta manera, se ha visto que un incremento en los niveles de dopamina puede inhibir la recaptación de glutamato (Kerkerian y col., 1987). La acumulación de glutamato a nivel sináptico sería capaz de sobre-activar los receptores de NMDA, desencadenando mecanismos excitotóxicos y la muerte celular. Del mismo modo, la estimulación pre-sináptica de los receptores de NMDA potencia la liberación de dopamina en los terminales nerviosos dopaminérgicos (Desce y col., 1992; Wheeler y col., 1995). Trabajos recientes han demostrado que la modulación entre las vías dopaminérgicas y glutamatérgicas se puede explicar por mecanismos en los que la activación de un receptor modificaría la distribución y/o activación del otro receptor (Cepeda y Levine, 2006; Scott y Aperia, 2009). Así, se ha descrito que la activación del receptor de NMDA es capaz de alterar la señalización dopaminérgica, favoreciendo la incorporación en la membrana plasmática y posterior activación del receptor D₁ en detrimento del receptor D₂, a través de una interacción directa entre los receptores de NMDA y D₁ de dopamina (Scott y col., 2002, 2006; Pei y col., 2004). Se ha demostrado que la región carboxy-terminal del receptor D₁ interacciona de manera directa y selectiva con las subunidades del receptor de NMDA (Lee y col., 2002; Fiorentini y col., 2003). Asimismo, la interacción funcional entre los receptores D₁ de

dopamina y los de NMDA es bidireccional. Así, el receptor D₁ de dopamina potencia la respuesta dependiente de NMDA, principalmente al activar cascadas de señalización que llevan a la fosforilación de las subunidades NR1 de los receptores de NMDA (Cepeda y Levine, 1998). Entre las principales vías intracelulares implicadas destacan la quinasa PKA o la quinasa DARPP-32 (Colwell y Levine, 1995; Blank y col., 1997; Snyder y col., 1998; Flores-Hernández y col., 2002).

La teoría de la existencia de un vínculo dopamina-glutamato se ha visto reforzada por estudios en los que se ha utilizado el paradigma del sinergismo, en los que la toxicidad dopaminérgica se ve potenciada con la adición de concentraciones sub-tóxicas de glutamato en neuronas corticales (Hoyt y col., 1997). Asimismo, un estudio más reciente ha demostrado en el modelo de Huntington YAC128 que las vías de señalización glutamatérgica y dopaminérgica actúan de manera sinérgica, incrementando las señales de calcio intracelular, causando así la degeneración de las neuronas estriatales de proyección (Tang y col., 2007). Así pues, se podría decir que entre las funciones dopaminérgicas y glutamatérgicas existe, en condiciones normales, un delicado equilibrio que si se rompe puede desencadenar mecanismos con consecuencias nefastas para la supervivencia neuronal.

Situando todo esto en el contexto de la enfermedad de Huntington, sería plausible pensar que la potente inervación dopaminérgica que reciben las neuronas estriatales de proyección, a pesar de ser tolerada en condiciones fisiológicas, podría resultar potencialmente tóxica en neuronas que presentan una alteración previa, como podría ser la presencia de la htt mutada o el estrés excitotóxico.

1. 3.- FACTORES NEUROTRÓFICOS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Los factores neurotróficos están involucrados en la regulación de múltiples aspectos neuronales como su supervivencia, correcto mantenimiento y diferenciación (Murphy y col., 1997; Egea y col., 2001; Huang y Reichardt, 2001; Airaksinen y Saarma, 2002; Chao, 2003). Esto, sumado al hecho de que ejercen un efecto neuroprotector frente al daño neuronal, ha situado a los factores neurotróficos como unos buenos candidatos para el posible tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas (Alexi y col., 2000; Aebischer y Ridet, 2001; Thoenen y Sendtner, 2002).

El mecanismo de acción de los diferentes factores neurotróficos es dependiente de la interacción de estos con dos tipos de receptores: los receptores Trk (*Tropomyosin-receptor kinase*) y el receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR). Inicialmente se pensó que los factores neurotróficos se unían preferentemente a receptores Trk específicos. Así, la neurotrofina NGF sería específica para el receptor TrkA, BDNF y NT-4/5 para TrkB, y NT-3 para TrkC (Arevalo y Wu, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que existe cierta permisividad en cuanto a la especificidad de receptores ya que la neurotrofina NT-3 puede interaccionar también con los receptores TrkA y TrkB (Clary y Reichardt, 1994; Strohmaier y col., 1996). Por el contrario, todas las neurotrofinas así como las pro-neurotrofinas, las formas inmaduras de éstas, presentan la misma afinidad por el receptor p75 (Hempstead, 2006; Chen y col., 2009).

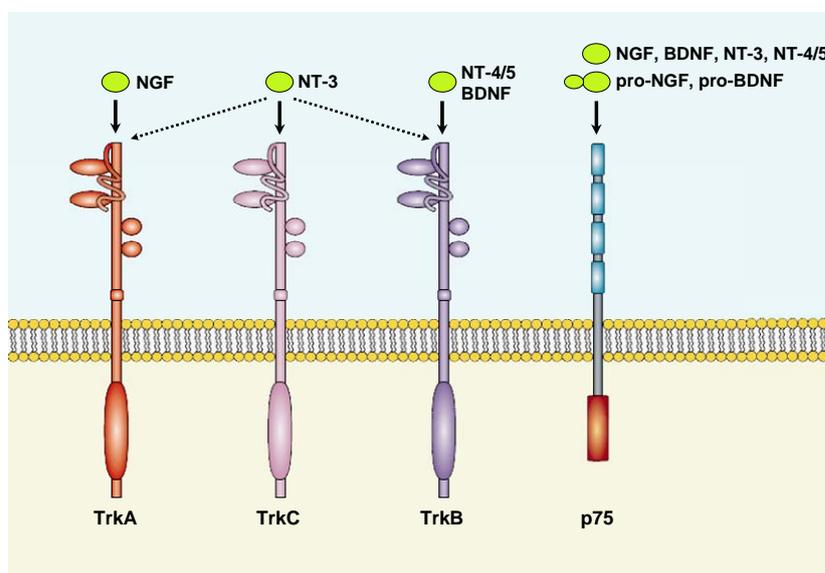


Figura 5. Neurotrofinas y sus receptores. Las diferentes neurotrofinas interaccionan de forma específica con los diferentes receptores Trk, sin embargo todas presentan la misma afinidad por el receptor p75. Imagen modificada de Chao, 2003.

La activación de los receptores Trk se asocia con múltiples procesos neuronales, como supervivencia celular, diferenciación, formación de sinapsis, o crecimiento y guía axonal. Así, la interacción de las neurotrofinas con los receptores Trk conlleva su dimerización y autofosforilación, reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras y la consecuente activación de diversas vías de señalización, entre las que destacan la vía de Ras-MAPK, PI3K-Akt y PLC- γ -PKC. (Arevalo y Wu, 2006). En cambio, la activación del receptor p75 en respuesta a las neurotrofinas se asocia tanto con procesos de supervivencia como de muerte celular, dependiendo del contexto celular, del estímulo activador y de las vías intracelulares movilizadas (Chen y col.,

2009). Diferentes estudios han demostrado que el receptor p75 puede actuar como co-receptor de los Trk, promoviendo de esta manera procesos de supervivencia celular (Zaccaro y col., 2001; Culmsee y col., 2002; Lad y col., 2003; He y Garcia, 2004). Asimismo, se ha observado que la activación del receptor p75 independientemente de los receptores Trk está asociada con mecanismos apoptóticos (Frade y col., 1996; Naumann y col., 2002). A pesar de los múltiples estudios que demuestran el efecto dual que desempeña la activación del receptor p75, queda por determinar los mecanismos de señalización intracelular que participan. Hasta el momento, se han vinculado las vías de Ras-MAPK, NF- κ B y JNK (Chen y col., 2009).

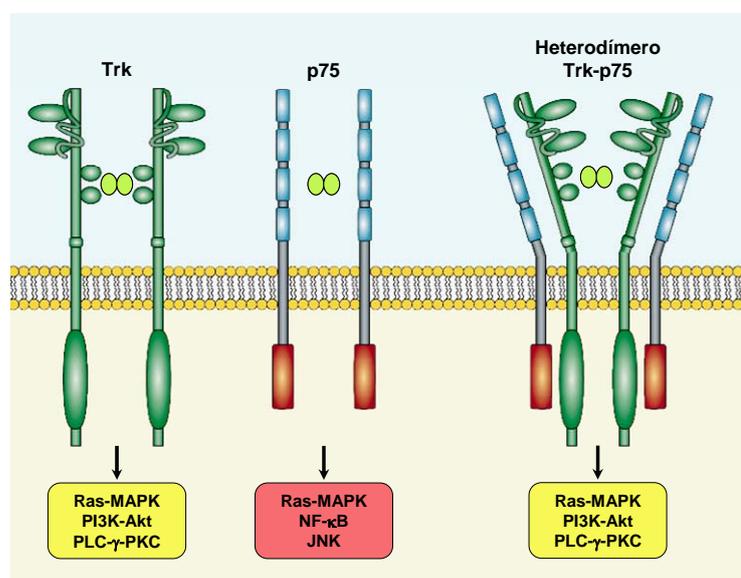


Figura 6. Receptores de neurotrofinas. La unión de la neurotrofina con el receptor induce su dimerización, formando homo o heterodímeros. La activación de los diferentes receptores conlleva la activación de diferentes vías de señalización intracelular. Imagen modificada de Chao, 2003.

De entre los diferentes factores neurotróficos presentes en el estriado, los más estudiados en relación a la enfermedad de Huntington por desempeñar un papel relevante en el desarrollo, mantenimiento trófico y neuroprotección de las neuronas estriatales son las neurotrofinas BDNF, NT-3, NT-4/5 y NGF, y la familia del GDNF. En el estriado, el receptor de BDNF, TrkB, es el más abundante y se localiza principalmente en las neuronas estriatales de proyección junto al receptor de alta afinidad de NT-3, TrkC, expresado en menor cantidad (Merlio y col., 1992). Por el contrario, TrkA, el receptor de NGF, se encuentra únicamente en las interneuronas (Holtzman y col., 1995). Se ha demostrado que frente a diferentes estímulos tóxicos, existe una regulación endógena de los factores neurotróficos que puede proporcionar un soporte trófico adicional a las neuronas, contribuyendo a su supervivencia. De esta

manera, se ha descrito que las neurotrofinas y sus receptores, así como la familia del GDNF y sus receptores, se regulan de forma diferente frente a inyecciones estriatales de agonistas glutamatérgicos en ratas adultas (Canals y col., 1998, 1999; Marco y col., 2002) o a diferentes edades post-natales (Checa y col., 2000, 2001). Concretamente, diferentes estudios han demostrado que el BDNF resulta ser un potente neuroprotector de las neuronas estriatales de proyección frente a estímulos excitotóxicos inducidos por la administración de ácido quinolínico (Perez-Navarro y col., 1999, 2000, 2005; Gratacos y col., 2001).

Además se ha demostrado que la htt participa en la regulación transcripcional del BDNF. Mientras que en condiciones fisiológicas la proteína htt incrementa la transcripción de BDNF en neuronas corticales, la htt mutada disminuye su transcripción (Zuccato y col., 2001, 2003). Acorde con este papel de la htt en la regulación del BDNF, diferentes trabajos han demostrado una disminución de dicha neurotrofina en estriado y corteza cerebral en pacientes de Huntington (Ferrer y col., 2000; Zuccato y col., 2001), así como en áreas corticales y estriatales en diferentes modelos transgénicos de Huntington, como en el YAC72 (Zuccato y col., 2001), R6/2 (Zhang y col., 2003) y en el modelo *knock-in* (Gines y col., 2003). Estos datos, junto con el hecho de que el BDNF resulta ser un potente neuroprotector de las neuronas estriatales de proyección, han llevado a hipotetizar que déficits de BDNF podrían contribuir en la selectiva neurodegeneración estriatal característica de la enfermedad de Huntington. Es por esto que se ha planteado la administración de BDNF como estrategia terapéutica para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad (Alberch y col., 2004). Sin embargo, la eficacia del BDNF dependerá a su vez de la correcta expresión y funcionalidad de los receptores TrkB. Así, diferentes estudios han demostrado que existe una reducción en los niveles de expresión del receptor TrkB, tanto en pacientes de Huntington como en modelos murinos de la enfermedad (Gines y col., 2006; Zuccato y col., 2008). Esto sugiere que la alteración en el aporte neurotrófico, característico de la enfermedad de Huntington, podría deberse no sólo a la disminución en la expresión de BDNF sino también de su receptor TrkB.

2.- LA QUINASA CDK5

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son una gran familia de serina/treonina quinasas que, al ser activadas por ciclinas, desempeñan su principal papel controlando el ciclo celular en eucariotas. En 1992 se identificó un miembro

atípico de la familia de las CDKs, Cdk5, que a pesar de no activarse por ciclinas ni participar en la regulación de ciclo celular, presentaba un 60% de homología con miembros de esta familia (Hellmich y col., 1992; Ishiguro y col. 1992; Lew y col., 1992; Meyerson y col., 1992). Esta quinasa, altamente conservada entre mamíferos, se expresa de manera ubicua en los diferentes tejidos aunque presenta unos niveles máximos de expresión en el sistema nervioso central (Paglini y col., 2001). Es por esto que múltiples trabajos se han centrado en estudiar el papel de Cdk5 en el desarrollo del sistema nervioso central (Ko y col., 2001; Smith y col., 2001). Asimismo, también se ha implicado la participación de Cdk5 en la regulación del citoesqueleto (Hallows y col., 2003; Smith y col., 2003), crecimiento axonal (Nikolic y col., 1996), exocitosis y transporte axonal (Paglini y col., 2001; Barclay y col., 2004; Shea y col., 2004), y plasticidad sináptica (Cheng y Ip, 2003). Por último, un gran número de estudios han descrito alteraciones en la función de Cdk5 asociadas a procesos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (Weishaupt y col., 2003; Shelton y Johnson, 2004).

2.1.- CDK5: LA ENZIMA, MECANISMOS ACTIVADORES Y SUSTRATOS

La proteína Cdk5 es una quinasa de 33 kDa sintetizada a partir del gen *Cdk5* localizado en el cromosoma 7. Una vez activada, Cdk5 fosforila serinas y treoninas seguidas de un residuo de prolina, siendo este último imprescindible para el reconocimiento de la secuencia sustrato y su consiguiente fosforilación (Shetty y col., 1993; Brown y col., 1999).

Cdk5	CDKs
No involucrada en el control de ciclo celular	Reguladoras imprescindibles de ciclo celular
No interacciona con ciclinas. Activación regulada por p35 y p39	Activación regulada por ciclinas
Actividad restringida principalmente en neuronas	Actividad presente en todas las células con capacidad de división
Elevada actividad durante el proceso de desarrollo del sistema nervioso central	Reducida actividad durante el desarrollo del sistema nervioso central

Tabla 2. Principales diferencias entre la quinasa Cdk5 y el resto de CDKs. Tabla adaptada a partir de Weishaupt y col., 2003.

Estructuralmente, la quinasa Cdk5 es muy similar al resto de miembros de la familia CDKs, presentando los mismos dominios catalíticos y reguladores (Buzko y Shokat, 2002; Manning y col., 2002). Sin embargo, a pesar de las similitudes estructurales, múltiples estudios han demostrado que la quinasa Cdk5 desempeña una función diferente del resto de CDKs, implicadas principalmente en la regulación del ciclo celular (Meyerson y col., 1992; Van den Heuvel y Harlow, 1993). Asimismo, el patrón de activación de Cdk5 también difiere del resto de CDKs (Mapelli y Musacchio, 2003).

2.1.1.- Activación y regulación de la quinasa Cdk5

El principal mecanismo de activación de las quinasas de la familia CDKs es a través de la interacción con las proteínas activadoras ciclinas, si bien modificaciones post-traduccionales también pueden regular su actividad. Como el resto de las CDKs, Cdk5 también requiere la unión a una proteína reguladora para su activación, sin embargo, todavía no se ha identificado ninguna ciclina que se una a Cdk5 para regular su actividad. Por el contrario, se han identificado dos proteínas necesarias para la activación y regulación de la quinasa Cdk5, las proteínas p35 y p39. Estas diferencias son quizás las que definen la diferente funcionalidad de Cdk5 respecto al resto de CDKs en células post-mitóticas (Dhavan y Tsai, 2001).

En 1994, mediante técnicas de inmunoprecipitación, se identificó p35, también denominada NCK5a (*Neuronal CDK5 activator*), como proteína co-activadora de Cdk5 (Lew y col. 1994; Uchida y col., 1994). Posteriormente, mediante *screening* de librerías de cDNA y estudios de homología de secuencia, se identificó p39, también denominada NCK5ai (*Neuronal CDK5 activator isoform*), como proteína reguladora de la actividad de Cdk5 (Tang y col., 1995). Ambas proteínas activadoras, aunque no son ciclinas, presentan cierta homología tanto de secuencia como de estructura tridimensional con las ciclinas clásicas que activan el resto de CDKs, lo que sugiere que podrían actuar de forma similar (Morgan, 1995). Es importante destacar que ratones mutantes para p35 y p39 resultan ser fenotípicamente idénticos a los ratones KO para *Cdk5*, lo que sugiere que no existen activadores adicionales de Cdk5 y, que p35 y p39 son necesarios y suficientes para activar Cdk5 (Ko y col., 2001). Además, el hecho de que tanto p35 como p39 se expresen principalmente en neuronas (Zheng y col., 1998) explicaría porque se detecta una elevada actividad de la quinasa en el sistema nervioso a pesar de que la proteína Cdk5 se expresa de forma ubicua (Tsai y

col., 1993). Estos co-activadores, p35 y p39, se localizan principalmente en membrana, si bien un estudio más reciente ha demostrado que p35 puede presentar una localización dinámica entre el núcleo y el citoplasma mediante la interacción con las proteínas importinas (Fu y col., 2006), lo que definirá el rango de sustratos asequible o la actividad del complejo Cdk5-p35/p39.

Junto a las proteínas p35 y p39, Cdk5 también puede activarse por la interacción con las proteínas p25 y p29. La proteína p25 es un fragmento derivado de la proteólisis de p35, generado principalmente por la acción de la proteasa dependiente de calcio calpaína (Lee y col., 2000; Nath y col., 2000; Patzke y Tsai, 2002). A diferencia de p35, que presenta una vida media muy corta, p25 es más estable, presentando una vida media dos o tres veces superior a la de p35 (Patrick y col., 1998). Además, p25 carece de la secuencia de miristoilización, modificación necesaria para mantener a la proteína en la periferia de la célula, a nivel de la membrana celular (Patrick y col., 1999; Dhavan y Tsai, 2001). De esta manera, la interacción de p25 con Cdk5 no sólo conlleva una activación de la quinasa más sostenida en el tiempo sino que modifica su distribución celular, concentrándose en el citoplasma y el núcleo, alterando de esta manera su especificidad de sustratos. Así pues, este fragmento procesado a partir de p35 mantiene deslocalizada a la quinasa Cdk5, permitiéndole acceder a nuevos sustratos, y en un estado de hiperactivación, fenómenos que se han asociado con neurotoxicidad (Patrick y col., 1999; Lee y col., 2000). Paralelamente, estudios *in vivo* e *in vitro* en modelos de isquemia han identificado un fragmento similar a p25, p29, obtenido a partir del procesamiento de p39, que contribuye de la misma manera que p25 en la desregulación de la actividad de Cdk5 (Patzke y Tsai, 2002).

Una vez activada Cdk5 por interacción con las proteínas p35/p39 o p25/p29, su grado de actividad puede modularse mediante procesos de fosforilación. Hasta el momento se conocen dos residuos susceptibles de ser fosforilados, la tirosina 15 (Tyr15) y la serina 159 (Ser159). La fosforilación del residuo Tyr15, mediada principalmente por las quinasas c-Abl (Zukerberg y col., 2000; Lin y col., 2007) y Fyn (Sasaki y col., 2002), tiene un efecto estimulador y parece ser necesaria para la correcta activación de la quinasa (Zukerberg y col., 2000). Sin embargo, la fosforilación del residuo Ser159 juega un papel secundario, no siendo obligatoria para la activación de Cdk5 o incluso influyendo de manera negativa en la activación de la quinasa (Qi y col., 1995; Poon y col., 1997; Sharma y col., 1999). Además, a diferencia del resto de CDKs, Cdk5 puede regular su propia actividad fosforilando directamente la proteína

p35. Así, se ha descrito que la fosforilación de p35 por Cdk5 facilita la ubiquitinización y degradación de p35 vía proteasoma (Patrick y col., 1998), lo que indica la existencia de un *feedback* negativo que limita la activación de Cdk5 mediante p35.

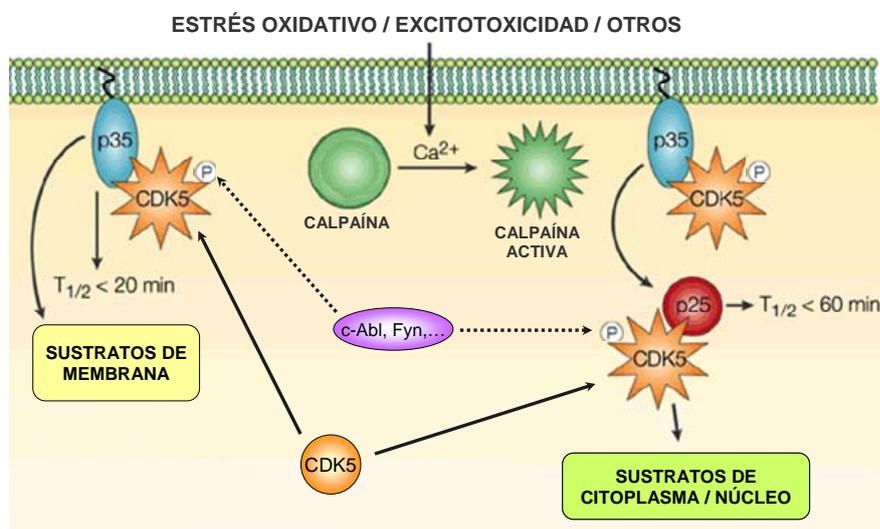


Figura 7. Mecanismos de activación y regulación de la quinasa Cdk5. La interacción de Cdk5 con p35 activa la quinasa direccionándola a sustratos de membrana. p35 es una proteína de vida media ($T_{1/2}$) corta, degradada rápidamente por el sistema ubiquitina-proteasoma. Estímulos de estrés oxidativo o excitotoxicidad, entre otros, activan la caspasa dependiente de calcio calpaína, procesando p35 a p25. p25 carece de la secuencia de miristoilización, quedando libre en el citoplasma, lo que le permite a Cdk5 acceder a sustratos de citoplasma y núcleo. Además, al tener una vida media más larga, la interacción de Cdk5 con p25 permite una activación de la quinasa más sostenida en el tiempo. Paralelamente a la interacción con p35 o p25, el nivel de activación de Cdk5 puede modularse por fosforilación mediante las quinasas c-Abl o Fyn, entre otras. Imagen modificada de Dhavan y Tsai, 2001.

2.1.2.- Funciones y sustratos de Cdk5

Los estudios llevados a cabo con los ratones KO de *Cdk5* y los KO de *p35/p39* mostraron una alteración en la citoarquitectura de la corteza cerebral como consecuencia de un defecto en la migración neuronal (Chae y col., 1997). Esto marcó el inicio de la identificación y caracterización de proteínas y mecanismos celulares sobre los que Cdk5 actúa, entre los que destacan:

- **Adhesiones focales:** Las células tienen la capacidad de formar expansiones transitorias o estables mediante la coordinación entre las adhesiones focales y el citoesqueleto, dinámica en la que Cdk5 juega un papel relevante (Lalioy y col., 2010). Así, diferentes trabajos han demostrado que varias proteínas importantes para la formación y estabilización de las adhesiones focales, como son TLN, FAK y Paxilina, son sustratos de Cdk5 (Mitra y col., 2005; Mitra y Schlaepfer, 2006; Arnaout y col., 2007; Moser y col., 2009).

- Citoesqueleto: La organización del citoesqueleto de actina y los microtúbulos permite a la célula desarrollar prolongaciones de diferente calibre y longitud, reorganizar su morfología, generar la fuerza necesaria para migrar y mediar el transporte axonal. Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que Cdk5 es esencial para la reorganización del citoesqueleto implicada en la propulsión celular, así como en la expansión celular (Lalioi y col., 2010). A nivel de la dinámica del citoesqueleto de actina, se ha observado que Cdk5 actúa principalmente sobre la vía de las Rho GTPasas (Rho, Rac, Cdc42), vinculadas con la motilidad celular (Hall, 1998; Jaffe y Hall, 2005). Así, la fosforilación de éstas por la quinasa Cdk5 afecta a la polimerización de la actina durante la formación de proyecciones, y con ello a la motilidad celular (Nikolic y col., 1998; Rashid y col., 2001; Nikolic, 2002; Takahashi y col., 2002). Asimismo, Cdk5 modifica el proceso de polimerización de la actina mediante la fosforilación de la proteína WAVE1, inhibiendo su actividad, lo que se ha relacionado con una inhibición en la formación de espinas dendríticas (Kim y col., 2006). Por otro lado, Cdk5 juega un papel relevante en la estabilización de los microtúbulos mediante potenciación de su acetilación, una vez estos están ensamblados (Pandithage y col., 2008). Además, la fosforilación de proteínas como Tau, Doblecortina o Crmp2 regula directamente el proceso de polimerización/despolimerización de los microtúbulos (Baumann y col., 1993; Baas, 1999; Fukata y col., 2002; Tanaka y col., 2004).
- Transmisión y plasticidad sináptica: A nivel de la transmisión sináptica, diferentes trabajos han descrito que Cdk5 incrementa la actividad de los receptores de NMDA mediante fosforilación de las subunidades NR1 y NR2A (Li y col., 2001; Wang y col., 2003). Además, Cdk5 fosforila la proteína PSD-95, reduciendo el reclutamiento de subunidades NR1 de los receptores de NMDA (Morabito y col., 2004). También se ha descrito que Cdk5 puede fosforilar la tirosina hidroxilasa, incrementando su actividad y de esta manera la síntesis de catecolaminas (Kansy y col., 2004; Moy y Tsai, 2004). Asimismo, Cdk5 es capaz de controlar el nivel de receptores post-sinápticos, modulando mediante fosforilaciones la interacción de estos con las proteínas de andamiaje de la membrana post-sináptica, como es el caso de los receptores mGluR₁ y mGluR₅ (Orlando y col., 2009). En cuanto al papel que ejerce Cdk5 en la plasticidad sináptica, se ha descrito que la fosforilación de proteínas como WAVE1 o Efexina1 llevan a la activación de la vía de las Rho GTPasas y la reorganización del citoesqueleto de actina, lo que se traduce en una menor

densidad de espinas dendríticas y menor formación de sinapsis (Kim y col., 2006; Fu y col., 2007; Sanchez y col., 2009).

- Exocitosis: El transporte de vesículas hacia la membrana plasmática es un proceso complejo en el que las vesículas transportadas deben fusionarse con membranas diana específicas para liberar su contenido (Lalioy y col., 2010). La participación de Cdk5 en los procesos de exocitosis se produce mediante la fosforilación de las proteínas involucradas en el direccionamiento y fusión de las vesículas exocíticas con la membrana, como son las proteínas SNARE, SM o Munc18 (Fletcher y col., 1999; Barclay y col., 2004; Lilja y col., 2004; Liu y col., 2007).

- Transcripción génica: Cdk5 puede actuar a nivel nuclear regulando la actividad de diferentes factores de transcripción, sin embargo esta regulación no siempre requiere la presencia de la quinasa en el núcleo (Lalioy y col., 2010). Algunos de los factores de transcripción identificados como dianas de Cdk5 son STAT3 o MEF2. La fosforilación de STAT3 por Cdk5 afecta la translocación de éste al núcleo y su posterior unión al DNA (Wen y col., 1995; Aznar y col., 2001). Por otro lado, MEF2 regula las respuestas a factores de crecimiento y apoptosis. La activación de Cdk5 por daños neurotóxicos inhibe la transactivación de MEF2, causando muerte neuronal por apoptosis (Mao y col., 1999; Gong y col., 2003).

- Muerte celular: Cdk5, mediante la fosforilación de diferentes proteínas, puede desencadenar procesos de muerte celular. Así, la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, involucrada en el mantenimiento de la estructura de la cromatina por estabilización de las histonas, induce muerte celular (Lee y col., 1997; Hamdane y col., 2005). Del mismo modo, la proteína p53 induce apoptosis neuronal frente a determinados estímulos, como el estrés oxidativo. Así, cuando p53 es fosforilada por Cdk5 aumenta su estabilidad nuclear, lo que promueve la expresión de genes apoptóticos, desencadenando la apoptosis vía mitocondria (Lee y col., 2007, 2008).

2.2.- PAPEL DE CDK5 EN LOS PROCESOS NEURODEGENERATIVOS

El amplio espectro de sustratos que Cdk5 es capaz de fosforilar es indicativo no sólo de su papel en el correcto desarrollo del sistema nervioso y su normal

fisiología, sino también de su posible participación en procesos patológicos del sistema nervioso (Nguyen y col., 2002; Weishaupt y col., 2003; Shelton y Johnson, 2004). Así, se ha detectado un incremento en la actividad de la quinasa Cdk5 en diferentes modelos experimentales de neurodegeneración, tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Patrick y col., 1999; Lee y col., 2000). Además, en la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Niemann-Pick, Cdk5 podría ser una de las quinasas responsables de la anormal fosforilación de proteínas del citoesqueleto, dando lugar a una acumulación anormal de agregados, causando muerte neuronal (Shetty y col., 1993; Ko y col., 2001).

Se sabe que un punto crítico para la inducción de toxicidad por Cdk5 es el procesamiento de p35 a p25, que se traduce en una sobreactivación y deslocalización de Cdk5. Se han observado niveles incrementados de p25 en muestras de pacientes de Alzheimer y en modelos murinos de esclerosis lateral amiotrófica y Parkinson (Dhavan y Tsai., 2001; Nguyen y col., 2001; Cruz y Tsai, 2004; Kesavapani y col., 2004; Shelton y Johnson, 2004), así como una anormal localización intracelular de la quinasa Cdk5 en muestras de pacientes de Parkinson o esclerosis lateral amiotrófica (Nakamura y col., 1997; Bajaj y col., 1998). Además, diferentes estudios han demostrado que la conversión de p35 a p25 está mediada por la proteasa calpaína dependiente de calcio (Lee y col., 2000; Patzke y Tsai, 2002). La alteración de la homeostasis del calcio es una característica común en diferentes modelos de muerte neuronal y procesos neurodegenerativos, por lo que sería posible que la sobreactivación y deslocalización de Cdk5 inducida por calcio fuera un punto crítico en el contexto de la neurodegeneración (Weishaupt y col., 2003). Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que la quinasa Cdk5 puede inducir procesos de muerte neuronal, a nivel citoplasmático, mediante la disrupción del citoesqueleto de actina (Patrick y col., 1999; Weishaupt y col., 2003) o, a nivel nuclear, al interferir con la normal actividad de genes pro-supervivencia como MEF2 (Gong y col., 2003; Tang y col., 2005).

Los indicios obtenidos sobre una actividad incrementada de Cdk5 en diferentes procesos neurodegenerativos han llevado a especular sobre la posibilidad de desarrollar compuestos farmacológicos para atenuar la actividad de dicha quinasa (Lau y col., 2002; Michaelis, 2003). Asimismo, dado que p25 induce una mayor activación de Cdk5 en comparación con p35, se ha considerado también la posibilidad de inhibir la conversión de p35 a p25 como una posible aproximación terapéutica (Patrick y col., 1999; Lee y col., 2000).

2.2.1.- Cdk5 y la enfermedad de Huntington

La implicación de la quinasa Cdk5 en la enfermedad de Huntington es bastante reciente. Así, los primeros trabajos en vincular esta quinasa con la patología de la enfermedad han descrito la capacidad de Cdk5 de interactuar con la proteína htt y fosforilarla (Luo y col., 2005; Anne y col., 2007).

Concretamente, en el año 2005 se demostró mediante técnicas *in vitro* de inmunoprecipitación que la proteína htt interactúa de forma selectiva con la quinasa Cdk5 pero no con su activador p35. Estas dos proteínas no sólo interactúan sino que, además, Cdk5 fosforila la proteína htt en el residuo Ser434 (Luo y col., 2005). Esta fosforilación causa un menor procesamiento de la proteína htt mediado por caspasas (Luo y col., 2005; Schilling y col., 2006), lo que se traduce en una disminución en la formación de agregados de htt y consecuentemente, menor toxicidad en células que expresan el fragmento N-terminal de la htt mutada (Luo y col., 2005). En este mismo trabajo se describe una menor actividad de la quinasa Cdk5 así como menor fosforilación de la htt en un modelo murino que expresa el exón 1 de la htt, posiblemente debido a que la htt mutada impide la correcta interacción de la quinasa Cdk5 con su activador p35 (Luo y col., 2005).

Posteriormente, otro trabajo ha corroborado la capacidad de Cdk5 de interactuar y fosforilar la proteína htt (Anne y col., 2007). Además en este trabajo vinculan la actividad de Cdk5 sobre la htt con el daño del DNA dependiente de p53. Así, en condiciones fisiológicas, la quinasa Cdk5 se activa en respuesta a daños del DNA y fosforila la proteína htt en los residuos Ser1181 y Ser1201, bloqueando la muerte neuronal mediada por p53. En cambio, en etapas avanzadas de la enfermedad de Huntington, la acumulación de daños del DNA es mayor, lo que se traduce en una menor actividad de la quinasa Cdk5. Esto implica una menor fosforilación de la proteína htt, acelerando la muerte neuronal vía p53 (Anne y col., 2007).

Otra línea de investigación, centrada en definir los mecanismos moleculares que llevan a la pérdida neuronal en modelos de Huntington inducidos con 3-NP, ha vinculado la quinasa Cdk5 en este proceso neurodegenerativo (Crespo-Biel y col., 2007, 2009). Así, estos trabajos han demostrado que la administración intra-peritoneal de 3-NP incrementa la actividad de Cdk5 específicamente en el núcleo estriado. Esta mayor actividad de la quinasa es debido a un incremento en la actividad calpaína, lo que se traduce en una mayor proporción de proteína activadora p25 (Crespo-Biel y

col., 2007). Asimismo, demuestran que la mayor actividad de Cdk5 disminuye el efecto neuroprotector del factor de transcripción MEF2, vinculando la actividad de la quinasa con la pérdida neuronal observada en este modelo de Huntington (Crespo-Biel y col., 2007). En un trabajo más reciente, este mismo grupo ha demostrado que el tratamiento con litio reduce la pérdida neuronal estriatal debida al tratamiento con 3-NP (Crespo-Biel y col., 2009). El efecto neuroprotector del litio se debe a la capacidad de éste por disminuir la activación de la calpaína mediada por 3-NP. De esta manera, se genera menos p25 y se induce una menor activación de la quinasa Cdk5 (Crespo-Biel y col., 2009).

Estos datos sugieren la participación de la quinasa Cdk5 en la enfermedad de Huntington, pero es necesario conocer y definir los mecanismos moleculares que llevan a la anómala activación de Cdk5 así como los procesos que ésta desencadena, en el contexto de la enfermedad, con el fin de poder llevar a cabo una correcta acción terapéutica.

3.- PRINCIPALES VÍAS INTRACELULARES DE SUPERVIVENCIA CELULAR

3.1.- LA VÍA DE LAS MAPK

La familia de las MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) está constituida por un amplio número de serina/treonina quinasas que regulan múltiples y antagónicos procesos celulares, tales como el crecimiento y diferenciación celular, o la muerte celular apoptótica. Asimismo, la desregulación de la actividad de las MAPK juega un papel relevante en fenómenos patológicos, como por ejemplo en procesos de inflamación, transformación oncogénica e invasión celular tumoral (Pearson y col., 2001; Junttila y col., 2008).

Se han caracterizado principalmente tres vías intracelulares de MAPK: la vía de ERK (*Extracellular regulated kinase*), la vía de SAPK/JNK (*Stress-activated protein kinase / c-Jun NH₂-terminal kinase*) y la vía de la quinasa p38. La vía de ERK se activa por mitógenos, y actúa promoviendo mecanismos de supervivencia celular, básicamente por oposición a la actividad de las vías pro-apoptóticas JNK y p38, activadas por estrés ambiental y citoquinas pro-inflamatorias (Davis, 2000; Roux y Blenis, 2004; Raman y col., 2007; Weston y Davis, 2007).

Las vías de señalización de las MAPK están organizadas siguiendo unas cascadas en las que la activación de la quinasa inicial por receptores de membrana lleva a la activación secuencial de un módulo MAPK (MAPKKK → MAPKK → MAPK). Una vez activadas, bien en el citoplasma o en el núcleo, las MAPK actúan regulando la transcripción génica mediante la fosforilación en serinas y treoninas de factores de transcripción tales como c-Jun, c-Fos, c-Myc, Elk-1, ATF2, MEF2 o STAT3. Además, las MAPK también participan en la regulación de la funcionalidad celular mediante la fosforilación de proteínas citoplasmáticas, como proteínas de membrana plasmática, tales como Syk o calnexina; proteínas del citoesqueleto, tales como neurofilina, paxilina o Tau; u otras proteínas quinasas, como la familia de quinasas RSK o MNK (Davis, 2000; Pearson y col., 2001; Roux y Blenis, 2004; Raman y col., 2007; Weston y Davis, 2007).

3.1.1.- La vía de ERK1/2

La vía intracelular de ERK1/2 se activa principalmente en respuesta a mitógenos y factores de crecimiento y, como el resto de las MAPK, se organiza siguiendo una cascada modular (A-Raf, B-Raf o Raf-1 → MEK1/2 → ERK1/2). La activación de esta vía se asocia generalmente a crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Ballif y Blenis, 2001; Rubinfeld y Seger, 2005; Meloche y Pouyssegur, 2007).

La mayoría de señales que llevan a la activación de la vía de ERK1/2 se inician con la unión de un ligando a un receptor de membrana, como pueden ser los receptores tirosina quinasa, integrinas o receptores acoplados a proteínas G. En general, la unión del ligando a su receptor desencadena la activación de la GTPasa Ras (McKay y Morrison, 2007).

Ras es una proteína unida a membrana que se activa mediante el intercambio de GDP por GTP. De esta manera, el mecanismo de activación de Ras requiere del reclutamiento en membrana de proteínas responsables del intercambio de GDP/GTP. En el proceso de reclutamiento participan una serie de proteínas denominadas proteínas de andamiaje (*scaffold proteins*). Estas proteínas median el ensamblaje de los diferentes componentes que participan en las cascadas de señalización de las MAPK, mejorando la eficiencia de fosforilación y activación de los sustratos (Raman y

col., 2007). De entre las diferentes proteínas de andamiaje destacan Shc y Grb2, las cuales, tras activarse por fosforilación, permiten la interacción de Ras con la proteína intercambiadora de GDP por GTP, SOS (Ravichandran, 2001). La activación de Ras, a su vez, permite reclutar en membrana la proteína citoplasmática Raf para su activación.

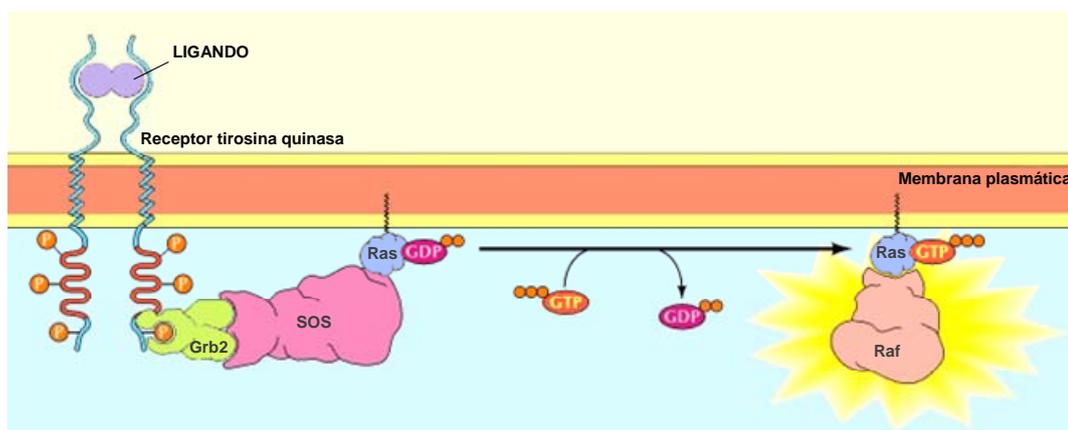


Figura 8. Mecanismo de activación de Ras. La unión del ligando al receptor tirosina quinasa, permite su dimerización y autofosforilación de los dominios intracelulares. Proteínas acopladoras, como Grb2, reconocen las secuencias fosforiladas del receptor activo, favoreciendo el reclutamiento de SOS. SOS es una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina, que permite el intercambio de GDP por GTP, activando la proteína de membrana Ras. La activación de Ras, a su vez, recluta y activa Raf. Imagen modificada de *The Cell*, 2nd edition (2000) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

Se han descrito tres isoformas de la quinasa Raf: A-Raf, B-Raf y Raf-1 (también llamada C-Raf). Estudios de deleción génica en modelos murinos han demostrado que las diferentes isoformas de Raf se regulan de manera independiente mediante mecanismos específicos de activación e inhibición. Este fenómeno probablemente afecte a la intensidad o duración de la señalización mediada por cada isoforma, dependiendo de la señal extracelular de activación y del contexto celular (Wellbrock y col., 2004). Pese a esto, las tres proteínas Raf comparten un mismo sustrato, MEK.

La quinasa MEK interacciona con la proteína inactiva ERK y la retiene en el citoplasma (Fukuda y col., 1997). Cuando MEK es activada por doble fosforilación en dos serinas, fosforila de manera específica los residuos tirosina y treonina separados por un residuo glutamato en el *loop* de activación de la proteína ERK, desencadenando su activación (Ramos, 2008). Una vez ERK es activa, se libera de MEK para dimerizar y translocar al núcleo, donde puede fosforilar y activar diferentes factores de transcripción, como c-Fos, ATF-2, Elk-1, c-Jun, c-Myc y Ets-1. Además,

ERK activa puede también fosforilar otras quinasas, tanto citoplasmáticas como nucleares, como MNK1, MNK2, MAPKAP-2, RSK y MSK1,2 (Roux y Blenis, 2004; Zebisch y col., 2007).

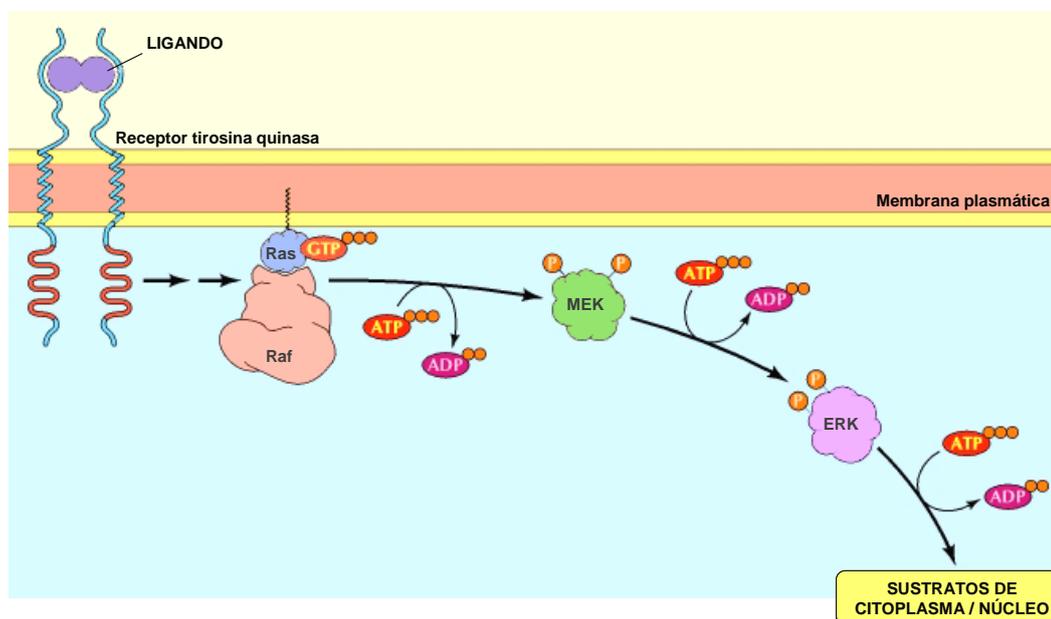


Figura 9. Mecanismo de activación de la vía de ERK1/2. La unión del ligando con el receptor tirosina quinasa desencadena el mecanismo de activación del receptor que, a su vez, permite la activación de Ras. Ras activa induce la activación de Raf, que fosforila y activa MEK. La activación de MEK permite la activación por fosforilación de la quinasa efectora final, ERK. ERK activa puede actuar a nivel citoplasmático o a nivel nuclear, regulando mediante fosforilación la actividad de sus sustratos, como serían otras quinasas o factores de transcripción. Imagen modificada de *The Cell, 2nd edition (2000)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

Uno de los principales mecanismos para inhibir la señalización de las MAPK es mediante defosforilación. Las proteínas MAPK se fosforilan y activan de manera reversible, por lo que mantener un equilibrio entre las quinasas y las fosfatasas que actúan sobre las fosforilaciones en las MAPK resulta imprescindible para la correcta regulación de la vía. De esta manera, inactivar estas proteínas de señalización permite que la célula tenga capacidad de responder frente a un nuevo estímulo, además de prevenir los efectos deletéreos debidos a una estimulación prolongada de la vía (Junttila y col., 2008). Las fosfatasas que actúan sobre la vía de ERK se clasifican en tres grupos en función de su especificidad de sustrato: las fosfatasas de especificidad dual denominadas DUSP (*Dual specificity phosphatase*), las serina/treonina fosfatasas PSP (*Protein serine/threonine phosphatase*) y las tirosina fosfatasas PTP (*Protein tyrosine phosphatase*) (Hunter, 1995; Janssens y Goris, 2001; Alonso y col., 2004; Owens y Keyse, 2007). Estas fosfatasas pueden localizarse tanto a nivel citoplasmático como nuclear, o bien translocarse de un compartimento a otro.

Las DUSP son un tipo de tirosina fosfatasas que pueden actuar defosforilando tanto los residuos tirosina como los treonina. La transcripción de alguna de estas fosfatasas se estimula mediante la propia acción de ERK a nivel nuclear, generándose así un circuito de inhibición de la quinasa ERK (Kondoh y Nishida, 2007; Owens y Keyse, 2007; Junttila y col., 2008).

Las PSP se caracterizan por su capacidad de defosforilar los residuos serina/treonina, y se clasifican principalmente en dos familias: las PP1 (*Protein phosphatase type-1*) y las PP2 (*Protein phosphatase type-2*). Estas fosfatasas actúan tanto a nivel de Raf como de MEK, o sobre la propia ERK para inducir la inhibición de la vía (Silverstein y col., 2002; Ugi y col., 2002; Dougherty y col., 2005; Van Kanegan y col., 2005).

Las PTP componen una gran familia de enzimas que defosforilan los residuos tirosina. La inhibición de la vía de ERK la ejercen de dos maneras diferentes, (1) indirectamente, por defosforilación de los receptores tirosina quinasa de membrana implicados en la activación de la vía (Haj y col., 2003; Mattila y col., 2005), o (2) actuando directamente sobre la fosforilación de ERK (Paul y col., 2003; Toledano-Katchalski y col., 2003).

3.1.2.- Papel de la vía de ERK1/2 en el sistema nervioso central

Tradicionalmente, ERK1/2 se ha descrito como una MAPK activada en respuesta a estímulos de proliferación y supervivencia, mientras que las quinasas JNK y p38 se han asociado con respuestas a estrés celular, como estimulación por citoquinas, daño del DNA o estrés oxidativo (Johnson y Lapadat, 2002; Roux y Blenis, 2004; Wada y Penninger, 2004).

Así pues, ERK1/2, que normalmente actúa como factor de supervivencia, se activa en respuesta a factores de crecimiento y regula proliferación, diferenciación, memoria a largo plazo y plasticidad sináptica. Por ejemplo, la inhibición de la vía de ERK1/2 inhibe el crecimiento neurítico en el modelo celular PC12 (Marshall, 1995; Sole y col., 2004). Además, ERK1/2 puede actuar sobre la cascada de activación de las caspasas, bloqueando su acción en la apoptosis (Allan y col., 2003). De acuerdo con el papel antiapoptótico de ERK1/2, la activación de la quinasa inhibe la apoptosis inducida por privación de factores de crecimiento o por compuestos citotóxicos (Xia

y col., 1995; Erhardt y col., 1999; Le Gall y col., 2000). Sin embargo, diferentes estudios han sugerido una posible participación de la quinasa ERK1/2 en fenómenos de muerte neuronal, así como en procesos neurodegenerativos (Cheung y Slack, 2004; Subramaniam y Unsicker, 2010). Así, se ha descrito una activación de la quinasa en modelos de la enfermedad de Alzheimer, relacionándola con una hiperfosforilación de Tau y una degeneración neurofibrilar (Perry y col., 1999; Guise y col., 2001; Pei y col., 2002; Shahani y col., 2006). De la misma manera, resultados similares se han obtenido en modelos de la enfermedad de Parkinson, en los que la activación de ERK1/2 media la muerte celular inducida por MPTP y 6-OHDA (Kulich y Chu, 2001; Gomez-Santos y col., 2002). Además, se ha observado la presencia de ERK1/2 activa en agregados citoplasmáticos en la sustancia *nigra* de pacientes de Parkinson con cuerpos de Lewy (Zhu y col., 2002).

De esta manera, la activación de ERK1/2 puede mediar tanto procesos de supervivencia neuronal como participar en mecanismos de muerte neuronal (Fukunaga y Miyamoto, 1998; Grewal y col., 1999; Cheung y Slack, 2004; Subramaniam y Unsicker, 2010). Esta función dual de la quinasa se ha relacionado con la duración de la señalización mediada por ERK1/2, así como su asociación con diferentes moléculas efectoras (York y col., 1998; Corbit y col., 1999). La combinación de estos elementos se traduce en una organización molecular específica, lo que resulta en un patrón de expresión génica distinto, dando lugar a una diferente función celular.

3.2.- LA VÍA DE LAS PI3K

La transmisión de señales desde la membrana plasmática al interior de la célula es un proceso complejo en el que participan, entre otros elementos, las moléculas de señalización lipídica fosfatidilinosítiles (Martin, 1998). La gran mayoría de lípidos de inositol se encuentran en la membrana plasmática donde son susceptibles de sufrir modificaciones por la acción de quinasas, fosfatasas y fosfolipasas (Payrastre y col., 2001).

La familia de proteínas PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) engloba un conjunto de quinasas lipídicas activadas en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento y hormonas. Las PI3K se clasifican en tres grandes grupos en función de su especificidad por los sustratos lipídicos: clase I, clase II y clase III (Vanhaesebroeck y

Waterfield., 1999; Martelli y col., 2006). De entre los diferentes tipos de PI3K, las de clase I son las que desempeñan un papel más relevante en cuanto a la supervivencia celular y respuesta a estímulos externos. Las PI3K de clase I son enzimas que forman heterodímeros constituidos por una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. La subunidad reguladora actúa como molécula adaptadora y permite la localización de la PI3K en la membrana plasmática para poder interactuar con residuos tirosina fosforilados de receptores activos (Vanhaesebroeck y col., 2001; Martelli y col., 2006).

Una vez la PI3K es activa, su principal papel es fosforilar fosfolípidos de membrana. De esta manera, la PI3K fosforila moléculas de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato de la membrana, dando lugar a la formación de PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Las moléculas de PIP3 generadas actúan como mensajeros secundarios, interactuando y activando proteínas efectoras de la activación de la PI3K, como son Akt/PKB y PDK-1 (Neri y col., 2002; Bayascas, 2008; Duronio, 2008).

La inhibición de la actividad de la PI3K está regulada por la acción de fosfatasas y por proteínas efectoras de la PI3K que forman un circuito de regulación negativo. De entre las diferentes fosfatasas, destaca la denominada PTEN (*Phosphatase of tensin homologue*) como la principal reguladora de la actividad de la vía de la PI3K (Tamguney y Stokoe, 2007). Por otro lado, destaca el complejo rictor-mTOR como modulador de la actividad de la vía. Cuando éste es activo, induce una represión de la vía de la PI3K, mientras que la inhibición del complejo lleva a la activación de la proteína PI3K (Carracedo y Pandolfi, 2008).

3.2.1.- La vía de Akt/PKB

La proteína Akt es una serina/treonina quinasa englobada dentro de la familia de las quinasas AGC (*cAMP-dependent protein kinases A, cGMP-dependent protein kinases G and phospholipid-dependent protein kinases C*). Se han descrito tres isoformas de la proteína Akt (Akt1, Akt2 y Akt3) que, a pesar de derivar de genes diferentes, presentan más de un 80% de homología entre ellas (Brazil y col., 2004; Hanada y col., 2004). En respuesta a múltiples estímulos, como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas, la proteína Akt inactiva es reclutada a la membrana plasmática por los productos de la PI3K, donde será activada.

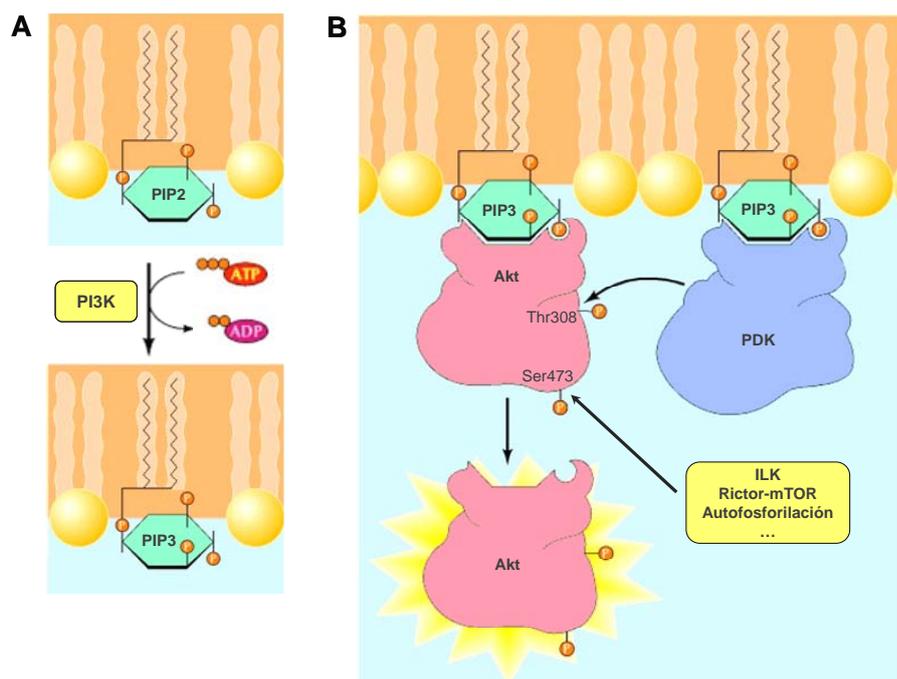


Figura 10. Mecanismo de activación de la vía de Akt. (A) La activación de la quinasa PI3K en respuesta a diferentes estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento u hormonas, media la fosforilación de moléculas de PIP2 en membrana, dando lugar a la formación de PIP3. (B) Las moléculas de PIP3 en membrana sirven de sustrato para reclutar y activar proteínas efectoras de la activación de PI3K, como son Akt y PDK. Para la completa activación de Akt, ésta debe ser fosforilada en dos residuos. La fosforilación del residuo Thr308 está mediada por la quinasa PDK. En cambio, la fosforilación de la Ser473 está mediada por la quinasa ILK, el complejo rictor-mTOR o por la propia Akt, entre otros. Imagen modificada de *The Cell*, 2nd edition (2000) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

Para la completa activación de la quinasa Akt, ésta debe ser fosforilada en dos residuos, la treonina 308 (Thr308) y la serina 473 (Ser473) (Brazil y col., 2004; Bayascas y Alessi, 2005; Ehrhardt y Ludwig, 2009). La fosforilación del residuo Thr308 está mediada por la quinasa PDK, sustrato directo de la PI3K (Bayascas, 2008). En cambio, el mecanismo de fosforilación de la Ser473 no está completamente descrito. Diferentes trabajos han implicado la participación de diversas proteínas en este proceso, como la quinasa ILK (Persad y col., 2001), el complejo rictor-mTOR (Sarbasov y col., 2005) o la propia Akt mediante un proceso de autofosforilación (Toker y Newton, 2000). A pesar de que la proteína Akt no se fosforila directamente por la PI3K, las fosforilaciones detectadas en Akt son dependientes de la actividad de dicha quinasa. Es por esto que la detección de Akt fosforilada se utiliza para monitorizar la activación de la vía de la PI3K (Ehrhardt y Ludwig, 2009).

3.2.2.- Papel anti-apoptótico de la vía de la PI3K/Akt

Actualmente, está completamente aceptada la idea de que la activación de la PI3K y su proteína efectora Akt juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la viabilidad celular, mediante la inhibición de vías apoptóticas (Duronio, 2008). Las primeras evidencias de que la vía de la PI3K ejercía una función importante en el mantenimiento de la supervivencia celular surgieron a partir de estudios *in vitro* donde se observó que la inhibición farmacológica de la PI3K mediante wortmanina causaba muerte celular y que el efecto pro-supervivencia del factor de crecimiento PDGF requería de la activación de la PI3K (Scheid y col., 1995; Yao y Cooper, 1995). Estos estudios, a parte de reconocer la proteína PI3K como un elemento regulador de la supervivencia celular, permitieron identificar una proteína efectora de la actividad de la PI3K, la quinasa Akt (Burgering y Coffey, 1995; Franke y col., 1995; Kohn y col., 1995; Franke y col., 1997). De la misma manera, diferentes estudios demostraron que la activación de Akt es un proceso necesario para promover la supervivencia celular mediado por la vía de la PI3K (Marte y Downward, 1997; Alessi y Cohen, 1998).

En general, la vía de la PI3K/Akt desempeña su papel de mantenimiento de la supervivencia celular mediante diferentes mecanismos: regulando directamente vías apoptóticas o bien mediante la modulación de factores de transcripción.

A cerca de la regulación directa de vías apoptóticas, múltiples trabajos han demostrado que la quinasa Akt es capaz de fosforilar e inhibir la actividad de diferentes miembros de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2, como son la proteína Bad (Datta y col., 1997; del Peso y col., 1997; Dudek y col., 1997; Blume-Jensen y col., 1998) o la proteína Bax (Gardai y col., 2004; Xin y col., 2007). De la misma manera, la quinasa Akt ejerce una función inhibitoria sobre la actividad de la proteína GSK-3 (Cross y col., 1995; Pap y Cooper, 1998; Van Weeren y col., 1998), proteína involucrada directamente en mecanismos de muerte celular por activación de la vía de JNK, entre otras (Maurer y col., 2006; Mishra y col., 2007). Por otro lado, la vía de la PI3K/Akt puede actuar regulando la vía apoptótica de p53 (Mayo y Donner, 2001; Lopez-Pajares y col., 2008) mediante fosforilación y activación de Mdm2, proteína encargada de regular negativamente la actividad de p53.

En cuanto a la modulación de factores de transcripción que ejerce la vía de la PI3K/Akt, se ha demostrado que la fosforilación de los factores de transcripción Fox (*Forkhead box*) por la quinasa Akt induce su degradación en el citoplasma (Brunet y

col., 1999; del Peso y col., 1999; Tang y col., 1999; Arden y Biggs, 2002). Así pues, los factores Fox, cuya actividad se ve incrementada cuando la vía de la PI3K/Akt se encuentra inhibida, actúan potenciando la síntesis de proteínas pro-apoptóticas como las proteínas de la familia Bcl-2 (Dijkers y col., 2000). Asimismo, se ha demostrado que la vía de la PI3K/Akt regula positivamente la actividad del factor de transcripción NF- κ B (Ozes y col., 1999; Romashkova y Makarov, 1999), importante regulador de múltiples genes anti-apoptóticos (Sonenshein, 1997).

3.3.- IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE LAS MAPK Y PI3K/AKT EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Diversos trabajos han demostrado que la presencia de la htt mutada es capaz no sólo de modular la expresión de moléculas de señalización sino también de desencadenar la activación de vías intracelulares en respuesta a estrés celular (Borrell-Pagès y col., 2006).

En respuesta a este estrés celular se induce la activación de las vías de las MAPK involucradas en iniciar programas apoptóticos (Johnson y Lapadat, 2002; Weston y col., 2002). De entre éstas, la primera quinasa que se describió en relación con la enfermedad de Huntington fue JNK, claramente implicada en controlar procesos de muerte celular programada o apoptosis (Weston y Davis, 2007). Así, estudios llevados a cabo con diferentes modelos *in vitro* han demostrado que la expresión de htt mutada induce la activación de JNK, iniciando los mecanismos de muerte neuronal (Liu, 1998; Merienne y col., 2003; Apostol y col., 2006). Corroborando estos resultados, otro trabajo ha demostrado que la inhibición de una quinasa responsable de la fosforilación y activación de JNK, la quinasa SEK1, resulta ser protectora frente a la muerte celular inducida por la presencia de htt mutada (Yasuda y col., 1999). Asimismo, el tratamiento de neuronas estriatales con 3-NP o la transfección del exón 1 de la htt induce la activación de JNK y del factor de transcripción c-Jun en neuronas estriatales (García y col., 2004). Por otro lado, la presencia de fragmentos de htt mutada desencadena a nivel neuronal estrés de retículo endoplasmático, lo que a su vez lleva a la activación de cascadas de MAPK hasta la final activación de JNK (Nishitoh y col., 1998, 2002).

De la misma manera, el estrés celular también conlleva la activación de las MAPK involucradas en promover la supervivencia de las células, como es el caso de la

quinasa ERK1/2 (Johnson y Lapadat, 2002; Weston y col., 2002). De acuerdo con el papel protector de dicha quinasa, diferentes trabajos han descrito su participación en diferentes modelos de Huntington. Así, se ha observado que la activación de ERK1/2 resulta ser un mecanismo neuroprotector frente a la toxicidad inducida por la htt mutada en células PC12 y en neuronas estriatales inmortalizadas que expresan el exón 1 de la htt mutada (Wu y col., 2002; Apostol y col., 2006). Además, mientras que la inhibición de la activación de ERK1/2 incrementa la susceptibilidad de las células que expresan la htt mutada (Apostol y col., 2006), el tratamiento con ortovanadato, que mantiene la fosforilación y activación de ERK1/2, disminuye la muerte celular en células PC12 que expresan la htt mutada (Wu y col., 2002).

Paralelamente, también se ha implicado la participación de la quinasa Akt como importante vía de supervivencia en la enfermedad de Huntington. Así, el carácter neuroprotector de la quinasa Akt ha quedado patente en estudios realizados con el modelo murino y celular *knock-in*, en los que se ha observado una actividad incrementada de la quinasa Akt como mecanismo compensatorio a las alteraciones tóxicas inducidas por la expresión de la htt mutada (Gines y col., 2003). De acuerdo con estos resultados, un trabajo más reciente ha descrito que la expresión de htt mutada disminuye los niveles de la fosfatasa PHLPP1, responsable de defosforilar e inactivar la quinasa Akt (Gao y col., 2005), tanto en los modelos murinos y celulares *knock-in* como en los modelos murinos que expresan el exón 1 de la htt mutada (Saavedra y col., 2010). De esta manera, la disminución de los niveles de PHLPP1 contribuiría a mantener unos niveles incrementados de Akt activa, que actuaría como mecanismo compensatorio a la toxicidad inducida por la presencia de htt mutada. Estos resultados se oponen a los obtenidos en muestras humanas de pacientes de Huntington, en los que se ha observado una disminución en los niveles de Akt total (Humbert y col., 2002). Esta aparente controversia podría deberse a que en estados avanzados de la enfermedad, cuando la supervivencia de las neuronas se encuentra altamente comprometida, se produce una disminución de los niveles de Akt, perdiéndose así su carácter pro-supervivencia, contribuyendo de esta manera a la pérdida neuronal característica de estados avanzados de la enfermedad.

Asimismo, se ha demostrado que diferentes vías de señalización pueden actuar directamente sobre la proteína htt, modificándola mediante fosforilaciones, regulando así su funcionalidad (Borrell-Pagès y col., 2006). En esta línea, se ha descrito que la quinasa Akt fosforila la proteína htt en la serina 421, disminuyendo así

la toxicidad estriatal inducida por la htt mutada (Humbert y col., 2002; Warby y col., 2005; Pardo y col., 2006).

