

I.-INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo del sistema nervioso, la muerte celular programada es un proceso que afecta a todas las poblaciones neuronales (Lockshin y Williams, 1965). Este mecanismo es esencial para la correcta formación de los circuitos neuronales que definen nuestras funciones sensoriales, motoras o cognitivas. La muerte celular programada está regulada a través de diversos mecanismos, entre los que destacan los factores tróficos, ya que estas proteínas son sintetizadas en cantidades limitantes, de manera que las neuronas que no los captan mueren por apoptosis (Oppenheim, 1991). Los factores tróficos activan varias vías de señalización intracelular relacionadas con la supervivencia, la diferenciación neuronal y la plasticidad (Kaplan y Miller, 2000). Además de la muerte apoptótica durante el desarrollo, este fenómeno se da también en neuronas maduras, a causa de una lesión o por estrés. En determinadas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington, también se ha observado una muerte neuronal apoptótica (Vila y Przedborski, 2003). Los factores tróficos han sido implicados en estos procesos degenerativos ya que su patrón de expresión o el de sus receptores está alterado (Ferrer y col., 2000a; Hock y col., 2000; Holsinger y col., 2000; Hurko y Walsh, 2000; Nagatsu y col., 2000). Estas observaciones, así como el papel neuroprotector de estas proteínas en modelos experimentales, ha llevado a proponerlos como una posible terapia para detener la progresión de los procesos degenerativos e incluso se han realizado ensayos clínicos en pacientes (Thoenen y Sendtner, 2002). Así pues, esta tesis se ha centrado en el estudio de las vías de señalización intracelular de muerte neuronal y en las que median los efectos biológicos y neuroprotectores de los factores tróficos. Estos estudios se han realizado en el núcleo estriado, zona que degenera en la enfermedad de Huntington, con el propósito de aportar nuevos datos para el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras.

1.- LOS FACTORES TRÓFICOS

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

neuronas y conexiones del sistema nervioso. Un mismo tipo neuronal puede responder a varios factores tróficos y un determinado factor neurotrófico puede afectar a distintos grupos de neuronas.

La teoría trófica propone que, durante el desarrollo, las neuronas tienen que competir por concentraciones limitantes de factores tróficos secretados por el tejido diana (Purves y col. 1988). Las neuronas que consigan obtener las concentraciones suficientes y adecuadas de factores tróficos serán las que sobrevivan, mientras que las que no alcancen dichas cantidades morirán mediante el proceso de muerte celular programada (Thoenen y col., 1987; Altman, 1992). Además de actuar como factores derivados de la diana por un mecanismo retrógrado, los factores tróficos también pueden actuar mediante un mecanismo autocrino, en el que la misma célula que tiene receptores para dichos factores en su membrana plasmática sintetiza los factores tróficos (Kokaia y col., 1993; Miranda y col., 1993), o bien paracrinos, en el que la célula que secreta el factor trófico está próxima a la célula receptora (Davies, 1996). Por último, también se ha descrito un mecanismo anterógrado de acción, a través del cual la neurona postsináptica recibe los factores tróficos de la neurona presináptica (von Bartheld y col., 1996; Altar y col., 1997; Figura 1).

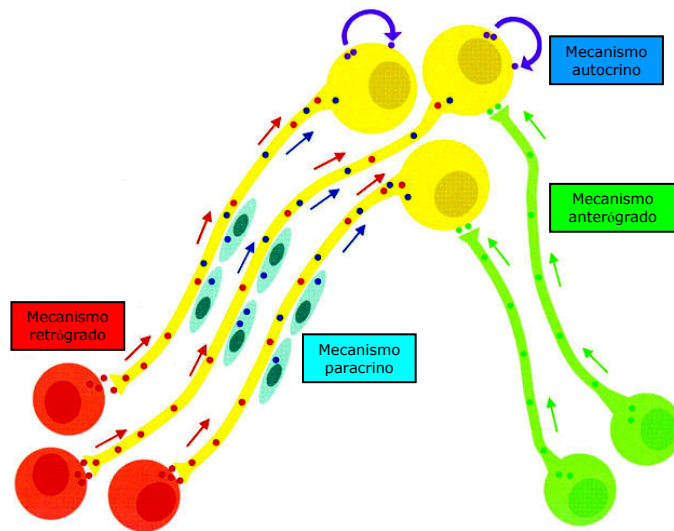


Figura 1.- Mecanismos de acción de los factores tróficos

(fig. adaptada de Davies, 2003)

Aunque tienen un papel protagonista durante el desarrollo, los factores tróficos también participan en la etapa adulta en fenómenos como la regeneración, la neuroprotección y la plasticidad (Thoenen, 2000; Schinder y Poo, 2000). Por otro lado,

se sabe que la interacción de los factores tróficos con sus respectivos receptores puede tener una implicación en los mecanismos que regulan la distinta vulnerabilidad de algunas poblaciones neuronales afectadas en enfermedades neurodegenerativas (Connor y Dragunow, 1998). Alteraciones en los niveles de factores tróficos tienen efecto, además, en una amplia variedad de fenómenos en los que se incluye la mielinización, el dolor, la agresividad, la depresión y el abuso de drogas (Chao, 2003).

Se ha descrito una gran variedad de familias de factores tróficos con distintas funciones, como la de promover la supervivencia, la diferenciación, la proliferación o la maduración de las células durante estadios particulares del desarrollo así como en la edad adulta: (1) la familia de las neurotrofinas; (2) la familia de las citoquinas, dentro de la cual destacan el CNTF (del inglés, *Ciliary neurotrophic factor*), el LIF (del inglés, *Leukaemia-inhibitory factor*) o la interleuquina-6; (3) la superfamilia del TGF- β (del inglés, *Transforming growth factor- β*), que engloba a la familia del TGF- β , a la familia del GDNF (del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*), a la familia de las BMP (del inglés, *Bone morphogenetic proteins*) y a la familia de las activinas. Cada grupo de factores tróficos realizará sus efectos a través de receptores diferentes y específicos. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de algunos miembros de la familia de las neurotrofinas, así como del GDNF y de las BMP.

1.1.- FAMILIA DE LAS NEUROTROFINAS

1.1.1.- Ligandos y receptores

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

El NGF fue el primer miembro de la familia de las neurotrofinas que se descubrió por sus efectos sobre la supervivencia de las neuronas simpáticas y sensoriales en cultivo (Levi-Montalcini y Angeletti, 1968). En el año 1982, se aisló el BDNF (Barde y col., 1982) a partir del cerebro de cerdo como un factor que era capaz de promover el crecimiento de los ganglios sensitivos, aunque no fue clonado hasta unos años más tarde (Leibrock y col., 1989). Actualmente se sabe que el BDNF tiene efectos sobre otros tipos neuronales del sistema nervioso central (SNC) y del sistema

nervioso periférico (SNP), promoviendo su arborización y supervivencia (Huang y Reichardt, 2001). La homología entre las secuencias del BDNF y del NGF permitió la identificación de la NT-3 y la NT-4/5, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Ernfors y col., 1990; Hohn y col., 1990; Maisonpierre y col., 1990). En un principio, la NT-4 y la NT-5 se consideraron factores de crecimiento distintos (Berkemeier y col., 1991; Hallbook y col., 1991), aunque posteriormente se observó que eran homólogos de un mismo factor que se expresaba en especies animales diferentes (Ip y col., 1992).

Para poder mediar sus efectos tróficos, las neurotrofinas se tienen que unir a sus receptores presentes en la membrana citoplasmática. Todas las neurotrofinas se unen al receptor de baja afinidad, el p75^{NTR} (del inglés, *p75 neurotrophin receptor*), y además, se unen a su receptor específico de alta afinidad, el Trk (del inglés, *Tropomyosin-related kinase*), de la familia tirosina quinasa. El NGF se une específicamente al TrkA, el BDNF y la NT-4/5 se unen al receptor TrkB, aunque la NT-4/5 se puede unir en menor afinidad al TrkA, y por último, la NT-3 se une al TrkC, si bien puede interaccionar con menor afinidad con el TrkA y el TrkB (Figura 2). Si las neurotrofinas sólo se unen al receptor Trk, éste es capaz de dar lugar a una respuesta neurotrófica, aunque actualmente también está bien demostrado que la cantidad relativa de p75^{NTR} respecto a la de Trk es crucial para la especificidad entre neurotrofina y receptor. Así pues, en presencia de p75^{NTR}, sólo el BDNF es capaz de activar el TrkB (Bibel y col., 1999; Lee y col., 2001). De forma similar, el p75^{NTR} restringe la activación o la señalización del TrkA por parte del NGF, pero no por la NT-3 (Benedetti y col., 1993).

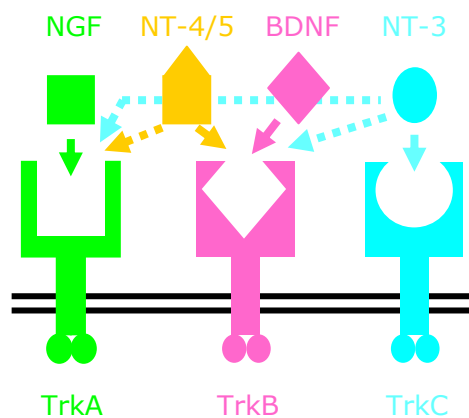


Figura 2.- Familia de las neurotrofinas y sus receptores

Los receptores Trk fueron inicialmente descubiertos como producto del oncogén *trk*, una oncoproteína quimérica en el carcinoma de colon humano (Martin-Zanca y col., 1986; Martin-Zanca y col., 1989), y más tarde se los asoció con el receptor responsable de la señalización intracelular desencadenada por el NGF (Hempstead y col., 1991; Kaplan y col., 1991; Klein y col., 1991). Los receptores Trk presentan una elevada homología en relación a la secuencia (Patapoutian y Reichardt, 2001). En general, los receptores Trk son proteínas de unos ochocientos aminoácidos, formados por una porción extracelular que se encarga de la unión con el ligando, una zona transmembrana, y una región intracelular con actividad tirosina quinasa. La unión de la neurotrofina a su receptor desencadena la activación de varias vías de señalización intracelular las cuales están implicadas en procesos como la diferenciación neuronal, el crecimiento neurítico, la supervivencia, la mielinización y la plasticidad sináptica (Chao y col., 1998; Friedman y Greene, 1999; Sofroniew y col., 2001).

Cabe destacar que se puede dar *splicing* diferencial del ARNm de los receptores Trk, y que esto induce la expresión de proteínas con diferencias en sus dominios extracelulares que afectan las interacciones con sus ligandos (Barbacid, 1994). Además, el *splicing* diferencial también puede afectar a los exones que codifican para los dominios tirosina quinasa, que son los determinantes para la respuesta de las neurotrofinas, generando formas truncadas de los receptores, siendo sólo el TrkB y el TrkC los que presentan variantes truncadas del receptor (Barbacid, 1994). Las formas truncadas del receptor se expresan tanto en células neuronales como en células gliales, y por el contrario, sólo las neuronas expresan el receptor con todos sus dominios. En las células no neuronales las formas truncadas actuarían reclutando y presentando la neurotrofina a las neuronas. En cambio, en las neuronas, en un principio se pensó que las formas truncadas eran las responsables de la captación de dicha neurotrofina, actuando como inhibidoras de las isoformas tirosina quinasa y atenuando la respuesta de la neurotrofina (Eide y col., 1996), aunque en los últimos años se les han atribuido también algunas funciones asociadas a la forma completa del receptor (Ichinose y col., 2000; Yacoubian y Lo, 2000).

El receptor de baja afinidad p75^{NTR} fue el primer receptor aislado para neurotrofinas así como el primer miembro descubierto de la familia de los receptores del TNF (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*, Casaccia-Bonofil y col., 1998). Con su

descubrimiento, sin embargo, aún no se pudieron explicar los efectos que se habían observado de las neurotrofinas (Chao y col., 1986; Radeke y col., 1987; Hempstead y col., 1990). Posteriormente, cuando se descubrieron los receptores de alta afinidad, los Trk, el estudio del p75^{NTR} quedó relegado a un segundo plano. Todavía hoy existe la controversia de cuál es exactamente su función, ya que su estudio ha sido complicado por el hecho que puede interactuar directamente con los Trk (Bibel y col., 1999), y porque su capacidad de activar cascadas de señalización se ve modificada por la activación de los receptores Trk. Se han postulado dos funciones contradictorias para p75^{NTR} (Nykjaer y col., 2005), por un lado actuaría como mediador de la inducción de la supervivencia neuronal mediada por los receptores Trk, y por otro lado puede unirse a varios adaptadores de los receptores Trk, como Shc, estimulando su fosforilación y aumentando la señalización de Trk (Epa y col., 2004). Aparte de su función pro-supervivencia, está ampliamente demostrado que p75^{NTR} puede promover la muerte neuronal de una manera Trk-independiente, y gracias al uso de ratones transgénicos se ha avanzado en esta dirección (Miller y Kaplan, 2001). No obstante, hay varios autores que han atribuido otras funciones al p75^{NTR} como la de prevenir la regeneración después de un daño neuronal (Chao, 2003; Gentry y col., 2004). La capacidad de los receptores Trk y p75^{NTR} de presentar diferentes sitios de unión y afinidad para las neurotrofinas determina su respuesta y especificidad. La relación entre receptores es importante para determinar el número de células que sobrevivirán, y las interacciones entre los receptores Trk y p75^{NTR} ofrecen una mayor discriminación entre las distintas neurotrofinas (Chao, 2003).

1.1.2.- Efectos biológicos

A lo largo de varios años de estudio de los efectos de las neurotrofinas, se ha demostrado repetidamente que son buenas inductoras de la supervivencia, la diferenciación y la maduración de ciertas poblaciones neuronales durante el desarrollo.

A nivel de SNC el **NGF** promueve la supervivencia de las neuronas colinérgicas estriatales (Martinez y col., 1985; Mobley y col., 1985; Abiru y col., 1996), y septales (Hartikka y Hefti, 1988), de las neuronas de Purkinje del cerebelo (Cohen-Cory y col., 1991), y de las neuronas de la retina (Caleo y col., 2000; Karlsson y col., 2001). Las neurotrofinas también tienen la capacidad de promover la expresión de determinados neurotransmisores o neuropéptidos, así como de proteínas que son marcadores para

distintas subpoblaciones neuronales. En este contexto, cuando una célula multipotencial avanza en su desarrollo hacia un estado postmitótico y adquiere su fenotipo neuronal, las neurotrofinas juegan un papel muy importante. Se ha demostrado que el NGF es capaz de inducir el fenotipo de las neuronas estriatales y de los núcleos basales (Martinez y col., 1985; Mobley y col., 1985; Friedman y col., 1993). También regula la expresión de varios neuropéptidos a nivel periférico (Davies, 2000). Además de promover un determinado fenotipo, estas proteínas pueden incrementar el crecimiento dendrítico o la ramificación, siendo estas características una forma más del proceso de maduración. El NGF es capaz de inducir la diferenciación de las neuronas corticales (Kolb y col., 1997), de las colinérgicas estriatales (Hagg y col., 1989; Vahlsing y col., 1991) y de las neuronas de los núcleos basales (Mobley y col., 1986). Los ratones deficientes (KO, del inglés *knockout*) para NGF (Crowley y col., 1994) y para su receptor específico, el TrkA, presentan graves déficits a nivel periférico asociados a la pérdida perinatal de las neuronas sensoriales y simpáticas, falleciendo a los tres días de vida. Los ratones heterocigotos para NGF presentan una reducción de la inervación colinérgica en el hipocampo, así como una adquisición y retención deficiente de la memoria (Chen y col., 1997).

Por lo que respecta al **BDNF**, esta neurotrofina promueve la supervivencia de las neuronas sensoriales (Davies y col., 1986) y de las motoneuronas espinales (Oppenheim y col., 1992; Yan y col., 1992; Schutte y col., 2000), así como de las retinales y dopaminérgicas (Rodríguez-Tebar y col., 1989; Hyman y col., 1991; Franke y col., 2000). El BDNF también es un potente inductor de la supervivencia de las neuronas estriatales (Ventimiglia y col., 1995), septales (Alderson y col., 1990) y cerebelares (Lindholm y col., 1993). Además, el BDNF es capaz de regular la expresión de proteínas quelantes de calcio como la calbindina o la parvalbúmina (Mizuno y col., 1994; Ventimiglia y col., 1995; Ivkovic y Ehrlich, 1999; Rickman, 1999; Fawcett y col., 2000). También promueve la maduración de las células GABAérgicas hipocámpales así como el desarrollo de las sinapsis excitadoras (Yamada y col., 2002). La característica más evidente de los animales KO para BDNF es la presencia de graves déficits sensoriales (Jones y col., 1994; Ernfors y col., 1994a; Conover y col., 1995), y la mayoría de ratones deficientes en BDNF mueren a los 2-3 días postnatales, aunque una pequeña porción puede llegar hasta las 4 semanas. Paralelamente, el fenotipo de los ratones KO para su receptor, TrkB, evidencia una reducción dramática de la población

de motoneuronas (Klein y col., 1993), a diferencia del ratón KO para BDNF, donde no se ve afectada su supervivencia, como tampoco la de las neuronas dopaminérgicas ni simpáticas (Ernfors y col., 1994a). Los ratones KO para TrkB, además, presentan una mayor proporción de muerte apoptótica durante el desarrollo en el giro dentado del hipocampo, en algunas capas corticales, en el tálamo y en el núcleo estriado (Alcantara y col., 1997).

La NT-3 regula la supervivencia de las neuronas simpáticas (Rosenthal y col., 1990; Dechant y col., 1993), y las sensoriales (Rosenthal y col., 1990; Oakley y col., 2000). A nivel del SNC la NT-3 también es capaz de potenciar la supervivencia de las motoneuronas (Henderson y col., 1993), de las neuronas colinérgicas (Friedman y col., 1993), noradrenérgicas (Friedman y col., 1993; Arenas y Persson, 1994) y cerebelares (Segal y col., 1992; Katoh-Semba y col., 2000). Por otra parte, se ha descrito el papel de la NT-3 en la determinación del fenotipo colinérgico en neuronas simpáticas (Brodski y col., 2000) y en motoneuronas (Huber y col., 1995). También incrementa el número de células GABAérgicas y de neuronas que expresan calbindina en cultivos estriatales (Ventimiglia y col., 1995), así como la diferenciación neurítica de las neuronas estriatales positivas para DARPP-32 (del inglés, *dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein-32*; Nakao y col., 1996). Promueve además la diferenciación de células del hipocampo (Labelle y Leclerc, 2000) y de las neuronas corticales (McAllister y col., 1997), aunque en este último punto, el BDNF y la NT-3 ejercerían funciones opuestas sobre la regulación del crecimiento axonal y dendrítico de las células piramidales (McAllister y col., 1997; Castellani y Bolz, 1999). En la sustancia negra, la NT-3 incrementa la actividad dopaminérgica (Hyman y col., 1994). En el ratón KO para NT-3 las poblaciones más afectadas son las neuronas sensoriales y simpáticas (Fariñas y col., 1994), y tanto estos animales como los ratones KO para TrkC presentan un fenotipo con movimientos y posturas anormales (Snider, 1994).

Por último, la NT-4/5 comparte varios efectos con el BDNF ya que ambas activan el mismo receptor, el TrkB. Esta neurotrofina promueve la supervivencia de las neuronas colinérgicas y noradrenérgicas *in vitro* (Friedman y col., 1993). Además induce la supervivencia y la diferenciación de las células estriatales GABAérgicas, calbindina y calretinina-positivas en cultivo (Widmer y Hefti, 1994; Ventimiglia y col., 1995). También promueve el fenotipo de las células del hipocampo (Cheng y col., 1994)

y de las motoneuronas (Huber y col., 1995). A diferencia del BDNF, sin embargo, la NT-4/5 aumenta el número de neuronas dopaminérgicas en cultivo, aunque no promueve la recaptación de dopamina (Hyman y col., 1994). Curiosamente, los ratones KO para NT-4/5, a diferencia de otros animales KO para otras neurotrofinas, viven normalmente sin presentar defectos neurológicos significativos (Conover y col., 1995).

1.2.- FAMILIA DEL GDNF

1.2.1.- Ligandos y receptores

La capacidad que tenía el medio condicionado de una línea celular de glioma (B49) de promover la supervivencia de neuronas mesencefálicas en cultivo permitió identificar al GDNF (Lin y col., 1993). Los otros miembros de la familia son la neurturina (Kotzbauer y col., 1996), la persefina (Milbrandt y col., 1998) y la artemina (Baloh y col., 1998a). La familia del GDNF representa un grupo de proteínas relacionadas con la superfamilia del TGF- β , ya que presentan residuos de cisteína en las mismas posiciones que otros miembros de esta superfamilia. A nivel estructural, estos factores son proteínas de secreción que actúan en forma de dímeros unidos por un puente disulfuro. La homología de la secuencia aminoacídica entre los miembros de la familia del GDNF se encuentra entre un 40-50%, y menos del 20% con las otras proteínas de la superfamilia del TGF- β .

Todos los miembros de la familia del GDNF comparten el receptor Ret (Jing y col., 1996; Treanor y col., 1996; Trupp y col., 1996), el cual presenta actividad tirosina quinasa, al igual que los receptores Trk de las neurotrofinas. La especificidad de la unión del ligando con su receptor viene determinada por los receptores α (GFR α , del inglés *GDNF family receptor alpha*), pues presentan afinidad específica para cada miembro de la familia del GDNF. Se han descrito cuatro GFR α diferentes (GFR α 1-4; Figura 3). Así pues, el GDNF se une específicamente a GFR α 1 (Jing y col., 1996; Treanor y col., 1996), la neurturina a GFR α 2 (Baloh y col., 1997; Buj-Bello y col., 1997), la artemina a GFR α 3 (Baloh y col., 1998b; Masure y col., 1998), y la persefina a GFR α 4 (Enokido y col., 1998; Masure y col., 2000). Aunque existe esta especificidad de GFR α para cada ligando, un mismo ligando puede unirse a otros GFR α , aunque en menor afinidad (Baloh y col., 1997, 1998b; Cacalano y col., 1998; Scott e Ibáñez, 2001).

Sin embargo un estudio reciente demuestra que aunque artemina se una a GFR α 1, éste no actuaría como un correceptor funcional *in vivo* (Carmillo y col., 2005).

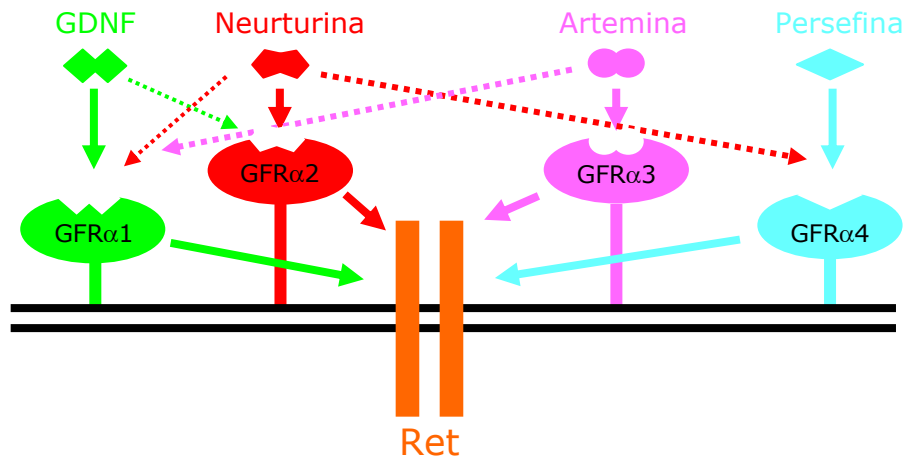


Figura 3.- Familia del GDNF y sus receptores

Cabe destacar que Ret sólo puede ser activado si el ligando se ha unido previamente al GFR α , el cual está anclado a la membrana plasmática. Primero los ligandos forman un complejo de alta afinidad con su receptor α específico, y este complejo, que contiene el ligando y homodímeros del GFR α , se une a dos moléculas del receptor Ret, dando lugar a la transfosforilación de los residuos específicos de tirosina del dominio tirosina quinasa y activando la señalización intracelular (Airaksinen y Saarma, 2002). Aunque la interacción entre GFR α y Ret se ha demostrado que es necesaria para la señalización intracelular, también se ha sugerido que cuando el GDNF se une al GFR α 1, éste puede activar la transducción de señal independientemente de Ret (Poteryaev y col., 1999; Trupp y col., 1999). Otra forma de activación independiente de Ret es la que está mediada por moléculas neuronales de adhesión celular, las NCAM (Paratcha y col., 2003). Paralelamente, otro estudio ha revelado que Ret puede ser activado por factores tróficos que no pertenecen a la familia del GDNF, siendo la neurotrofina NGF la inductora de la fosforilación de Ret (Tsui-Pierchala y col., 2002a).

La activación de Ret depende de su localización en los *lipid rafts*, unos microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos localizados en la membrana plasmática. Estos microdominios están enriquecidos en proteínas ancladas a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) y se ha propuesto que estarían

implicados en procesos de transducción de señales intracelulares (Brown y London, 1998; Simons y Toomre, 2000). También serían importantes para otras funciones como la adhesión celular, la transmisión sináptica y la orientación del axón. Sólo los GFR α , gracias a sus anclajes GPI, se localizan en los *lipid rafts*, en cambio Ret, en su forma inactiva, se encuentra en el exterior de estos dominios. Cuando es activado por el GDNF, el GFR α 1 es capaz de reclutar Ret hacia el interior de los *lipid rafts*, aunque el mecanismo es aún desconocido (Tsui-Pierchala y col., 2002b; Sariola y Saarma, 2003). El fenómeno de *splicing* diferencial, al igual que ocurría en los receptores Trk, también se produce para el ARNm de Ret. Se da lugar al menos a dos isoformas distintas de receptor, el Ret-9 y el Ret-51, las cuales difieren sólo en el extremo C-terminal que se asocia a distintos complejos de señalización (Tsui-Pierchala y col., 2002c).

1.2.2.- Efectos biológicos

Los miembros de la familia del GDNF presentan efectos neurotróficos sobre distintas poblaciones neuronales del SNC. El GDNF es capaz de promover la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas *in vitro* (Lin y col., 1993; Rosenblad y col., 2000; Akerud y col., 1999, 2002) e *in vivo* (Gash y col., 1995; Hudson y col., 1995), así como de las células GABAérgicas del septum (Price y col., 1996), las neuronas colinérgicas de los núcleos basales (Ha y col., 1996), las neuronas de Purkinje del cerebelo (Mount y col., 1995) y las motoneuronas (Henderson y col., 1994; Oppenheim y col., 1995, Zurn y col., 1996). A nivel de SNP, el GDNF induce la supervivencia de las neuronas de los ganglios simpáticos y parasimpáticos (Ebendal y col., 1995; Trupp y col., 1995). La neurturina y la artemina comparten con el GDNF los efectos neurotróficos sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo así como los efectos sobre las neuronas simpáticas (Kotzbauer y col., 1996; Baloh y col., 1998a; Horger y col., 1998; Rosenblad y col., 2000). La neurturina es un factor de supervivencia crítico para las neuronas parasimpáticas (Heuckeroth y col., 1999; Rossi y col., 1999), además de tener efectos también sobre las neuronas colinérgicas de los núcleos basales junto con la persefina (Golden y col., 2003). La persefina promueve la supervivencia de las neuronas motoras y las neuronas dopaminérgicas del SNC, pero no ejerce efectos sobre las neuronas del SNP (Milbrandt y col., 1998; Bilak y col., 1999).

Además de los efectos sobre la supervivencia, el GDNF y la persefina, pero no la neurturina, inducen el crecimiento neurítico de las neuronas dopaminérgicas *in vitro*

(Akerud y col., 1999, 2002). En cambio, la neurturina y también el GDNF inducen el crecimiento neurítico de la neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* en cultivo (Holm y col., 2002). Además, tanto el GDNF como la artemina y la neurturina, pero no la persefina, afectan a la elongación del axón de neuronas maduras del ganglio de la raíz dorsal (Paveliev y col., 2004). El tratamiento con GDNF, en cultivos de células del área tegmental ventral, regula el establecimiento de la funcionalidad de los terminales dopaminérgicos (Bourque y Trudeau, 2000). Un estudio reciente, utilizando células progenitoras estriatales, las ST14A, que sobreexpresan GDNF, demuestra que este factor trófico induce la regulación de genes implicados en fenómenos de migración y diferenciación (Pahnke y col., 2004).

El uso de ratones transgénicos para los distintos ligandos y receptores de la familia del GDNF evidencia una vez más la redundancia trófica y/o los mecanismos compensatorios existentes en el sistema. Dichos animales presentan más anomalías a nivel periférico que central. Los ratones KO para GDNF (Moore y col., 1996; Pichel y col., 1996; Sanchez y col., 1996) o GFR α 1 (Cacalano y col., 1998; Enomoto y col., 1998), por ejemplo, mueren perinatalmente al no desarrollar neuronas entéricas ni riñones, tal como ocurre en los ratones KO para Ret (Baloh y col., 2000). En cambio, los ratones que carecen de neurturina (Heuckeroth y col., 1999) o de GFR α 2 (Rossi y col., 1999) son viables y fértiles. La similitud de sus fenotipos apoya que la neurturina es el ligando específico de GFR α 2 *in vivo*. El ratón KO para la artemina también presenta una deficiencia a nivel del sistema nervioso simpático (Honma y col., 2002). El ratón deficiente para GFR α 3 presenta déficits severos en el ganglio superior cervical pero no en otros ganglios simpáticos (Nishino y col., 1999). El ratón KO para persefina presenta un desarrollo y un comportamiento normal, pero es hipersensible a la isquemia cerebral (Tomac y col., 2002).

1.3.- FAMILIA DE LAS BMP

1.3.1.- Ligandos y receptores

Las BMP son una familia de proteínas englobada dentro de la superfamilia del TGF- β . Aunque inicialmente fueron identificadas y caracterizadas por su capacidad de inducir la formación de hueso y cartílago *in vivo* (Reddi, 1992), desde hace unos años se les están atribuyendo funciones importantes a nivel de sistema nervioso donde controlan

un sinnúmero de procesos celulares, en los que se incluyen la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la motilidad y la supervivencia. Además, las BMP están implicadas en la formación y en el patrón de muchos otros tejidos, entre los cuales destacan el corazón, el hígado, los dientes y el ojo (Hogan, 1996; Wozney, 1998; Zhao, 2003). Cabe destacar su gran importancia durante el desarrollo embrionario, donde participan en la formación del tubo neural y en el establecimiento del eje dorso-ventral a nivel mesodérmico (Lemaire y Yasuo, 1998; Christiansen y col., 2000; Yamamoto y Oelgeschläger, 2004). Las BMP también participan en la regulación del equilibrio existente entre gliogénesis y neurogénesis. Así, por ejemplo, en determinadas condiciones, las BMP pueden promover la adquisición de un fenotipo neuronal actuando sobre células madre (Li y col., 1998; Morrison y col., 2000), mientras que en otras promoverían el fenotipo astrogial (Gross y col., 1996; Lim y col., 2000).

Actualmente existen más de 20 miembros de la familia de las BMP, los cuales se clasifican en cinco grupos bien definidos basados en consideraciones estructurales y evolutivas: (1) Dpp (producto del gen *Drosophila decapentaplegic*), BMP-2 y BMP-4; (2) 60A, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a y BMP-8b; (3) BMP-3 y factor de crecimiento y diferenciación-10 (GDF-10); (4) BMP-9, BMP-10 y Dorsalina-1; (5) BMP-12, BMP-13 y GDF-5. Los ligandos, tal y como sucede con los otros miembros de la superfamilia del TGF- β , son sintetizados en forma de precursores y después de ser secretados son procesados por proteólisis y dimerizados.

Las BMP señalizan a través de receptores de tipo I y tipo II (Figura 4) con actividad serina-treonina quinasa (Mehler y col., 1997; Ebendal y col., 1998). Se han descrito tres receptores de tipo I que se unen a los ligandos de la familia de las BMP, el receptor de BMP de tipo IA y IB (BMPR-IA y BMPR-IB) y el receptor activina tipo IA (ActR-IA). Además, también se han identificado tres receptores de tipo II; el del grupo de los receptores de BMP tipo II (BMPR-II), y los receptores activina de tipo II y IIB (ActR-II y ActR-IIB; Yamashita y col., 1995; Rosenzweig y col., 1995; Kawabata y col., 1995). Mientras que BMPR-IA, IB y II son específicos para las BMP, el ActR-IA, II y IIB también señalizan para las activinas. Cabe destacar que existe una compleja interacción entre las distintas BMP y todas las subunidades de receptores. Así pues, para simplificar, en la figura 4 se muestran sólo algunos ejemplos de las interacciones de distintas BMP y sus receptores.

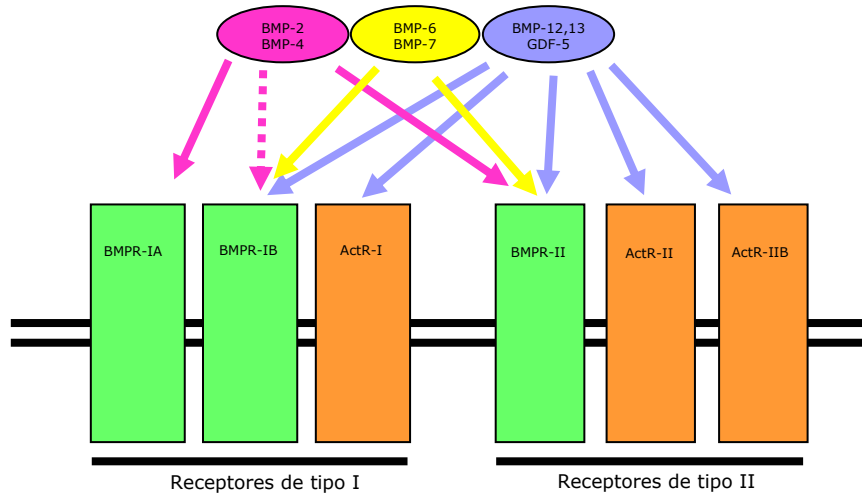


Figura 4.- Familia de las BMP y sus receptores

Después de la unión del ligando se forma un complejo heterotetramérico del receptor activado. El receptor activo está formado por un complejo de dos receptores de BMP de tipo I y dos de tipo II (Moustakas y Heldin, 2002). Dado que existen menos tipos de receptores para las BMP que tipos de ligandos, se ha propuesto que diferentes BMP podrían compartir un mismo receptor, lo que sugiere que no se puede correlacionar una determinada familia de BMP con un fenotipo neuronal concreto. Es importante destacar también que el cerebro adulto presenta distintos patrones de expresión de algunos de los receptores, lo que demuestra que las BMP no ejercen sólo una función a nivel de desarrollo, sino también en la etapa adulta.

1.3.2.- Efectos biológicos

En los últimos años se ha avanzado de manera considerable en la caracterización de los efectos de las BMP sobre diferentes poblaciones neuronales. Los efectos de las BMP varían dependiendo del tiempo de exposición, de la dosis y de la presencia de otras señales o factores externos (Mabie y col., 1999; Mehler y col., 2000). Se ha descrito que algunos miembros de la familia de las BMP estarían implicados en la generación de las neuronas simpáticas (Schneider y col., 1999), de las colinérgicas (Lopez-Coviella y col., 2000) y de las células granulares del cerebelo (Alder y col., 1999), así como en la diferenciación de células madre corticales hacia fenotipo neuronal y glial (Chang y col., 2003), o la diferenciación de precursores mesencefálicos hacia neuronas dopaminérgicas (Brederlau y col., 2002). Por otra parte, también presentan efectos sobre ciertas neuronas postmitóticas. Por ejemplo, la BMP-2 ejerce efectos

neurotróficos sobre las neuronas mesencefálicas (Jordan y col., 1997; Reiriz y col., 1999), estriatales (Hattori y col., 1999; Gratacos y col., 2001a) y corticales (Mabie y col., 1997), siendo capaz de promover la supervivencia y/o diferenciación de estas poblaciones. La BMP-6, a su vez, es capaz de actuar sobre neuronas serotoninérgicas (Galter y col., 1999), dopaminérgicas (Jordan y col., 1997) y granulares cerebelares (Yabe y col., 2002) y promueve la actividad de las neuronas colinérgicas del septum (Nonner y col., 2001). La BMP-7, paralelamente, induce la diferenciación de neuronas simpáticas (Lein y col., 1995), serotoninérgicas (Galter y col., 1999), hipocampales (Withers y col., 2000) y corticales (Le Roux y col., 1999).

Respecto a los distintos ratones deficientes para ciertas BMP que se han diseñado, no todos permiten el estudio de la función de dicha BMP ya que, por ejemplo, los ratones KO para BMP-2 o para BMP-4 mueren entre el día embrionario (E) E7.5-E10.5 y E6.5-E9.5, respectivamente (Winnier y col., 1995; Zhang y Bradley, 1996), presentando defectos cardíacos los primeros y una nula diferenciación del mesodermo los segundos. El ratón KO para BMP-7 muere a los pocos días de nacer a causa de un desarrollo anormal del aparato renal (Dudley y col., 1995). Por el contrario, el ratón deficiente para BMP-6 es viable y fértil (Solloway y col., 1998), y se piensa que puede existir algún mecanismo compensatorio por parte de la BMP-2, ya que la expresión de las dos BMP se solapa en algunos tejidos. Además de los animales deficientes para los ligandos, también se han obtenido los de los receptores. Así, se ha podido observar la letalidad a nivel embrionario del ratón KO para BMPRIIA por no formarse el mesodermo (Mishina y col. 1995) pero, por el contrario, el animal KO para BMPRIIB es viable (Yi y col., 2000).

Además de los efectos de las BMP a nivel individual, varios estudios han demostrado en diferentes modelos que puede existir un efecto sinérgico o potenciador de las BMP en presencia de otros factores neurotróficos. La expresión de los receptores de las BMP se solapa parcialmente en varias poblaciones neuronales, y se ha observado que puede ser regulada en determinadas ocasiones. Esto sugiere que existe un mecanismo paralelo a los receptores de las neurotrofinas y/o los miembros de la familia del GDNF para regular la plasticidad y la regeneración. Así pues se ha descrito que la BMP-2 es capaz de inducir dependencia respecto GDNF y NT-3 en neuronas simpáticas de rata (Kobayashi y col., 1998; Zhang y col., 1998) y en células progenitoras

catecolaminérgicas de la cresta neural (Song y col., 1998), así como la potenciación de la respuesta a GDNF, neurturina y NT-3 en células del *locus coeruleus* (Reiriz y col., 2002). Además la BMP-2, al igual que la BMP-7 y la BMP-12, incrementa la supervivencia inducida por la NT-3 y el NGF en neuronas sensoriales de embrión de pollo (Farkas y col., 1999). Por otra parte, los efectos de la BMP-2 sobre neuronas serotoninérgicas (Galter y col., 1999) y estriatales (Gratacos y col., 2001b) están mediados por la liberación de BDNF endógeno. La BMP-7 también potencia la respuesta neurotrófica de la NT-3 y del GDNF en células simpáticas (Bengtsson y col., 1998), y la del BDNF y NGF en neuronas colinérgicas del septum (Nonner y col., 2004). Por último, la BMP-4 y BMP-6 también actuarían sinérgicamente con la NT-3 y la neurturina (Althini y col., 2004).

Al margen de sus efectos sobre las diversas poblaciones neuronales, las BMP juegan también un papel importante sobre la población glial. En determinados estadios del desarrollo controlan el equilibrio existente entre la neurogénesis y la gliogénesis, actuando como inhibidoras del fenotipo neural. Sus antagonistas *chordin*, *noggin* y *follistatin*, en cambio, actúan promoviendo dicho efecto (Gross y col., 1996; Lim y col., 2000). Las BMP son potentes promotoras de la proliferación glial *in vitro*, induciendo un incremento dosis-dependiente en el número de células GFAP-positivas en cultivos de mesencéfalo (Jordan y col., 1997; Reiriz y col., 1999), de núcleo estriado (Hattori y col., 1999; Gratacos y col., 2001a) y del rafe (Galter y col., 1999). En cultivos corticales, algunas BMP promueven la diferenciación astrogliar (Mabie y col., 1999), aunque en determinadas condiciones no se han detectado cambios sobre el número de células inmunoreactivas para GFAP (Le Roux y col., 1999). Algunos trabajos apuntan que algunos de los efectos observados de las BMP sobre las neuronas estarían mediados por la glía (Jordan y col., 1997; Lein y col., 2002), aunque otros no observan la desaparición de los efectos de las BMP en presencia de agentes antimitóticos (Hattori y col., 1999; Reiriz y col., 1999).

1.4.- VÍAS INTRACELULARES ACTIVADAS POR FACTORES TRÓFICOS

La unión de cada factor trófico a su receptor correspondiente activa una serie de señales intracelulares que se han relacionado con fenómenos de supervivencia, diferenciación, plasticidad y/o neuroprotección. Las neurotrofinas y los miembros de la

familia del GDNF comparten vías de señalización intracelular, mientras que la familia de las BMP activa otras vías intracelulares distintas para realizar sus efectos. Así pues, la activación de los receptores Trk por neurotrofinas, o Ret por miembros de la familia del GDNF inicia una serie de cascadas de señalización intracelular como la de la p42/p44 MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*), la de la PI3-K (del inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase*) o la de la PLC- γ 1 (del inglés, *phospholipase C- γ 1*) (Patapoutian y Reichardt, 2001; Chao, 2003). Para promover la activación de estas vías existen una serie de proteínas adaptadoras que interaccionan con los dominios intracelulares de los receptores. En cambio, las BMP actúan a través de la activación, por parte del receptor tipo I, de las proteínas Smad (Ebendal, 1998).

Los receptores Trk y Ret se pueden localizar en el soma neuronal o bien en los terminales axónicos. En el primer caso, los factores tróficos activan a sus receptores específicos localizados en la membrana plasmática del soma y eso conlleva la activación de las vías mencionadas anteriormente (Kaplan y Miller, 2000). El segundo caso se caracteriza por el transporte retrógrado del complejo receptor-ligando desde el axón hasta el soma de la célula. Los factores tróficos liberados por las células diana inducen una activación a través de los receptores que se encuentran en los terminales axónicos e inician cascadas de señalización locales (p42/44 MAPK y PI3-K) que promueven la elongación del axón (Atwal y col., 2000; Kuruvilla y col., 2000). Además de esta activación local los receptores activados pueden ser internalizados formando vesículas, dando lugar a endosomas que serán transportados a lo largo de microtúbulos desde los axones distales hasta el soma neuronal (Howe y col., 2001; Delcroix y col., 2003; Ye y col., 2003; Couplier e Ibáñez, 2004). Una vez en el soma, estos receptores todavía se mantienen autofosforilados y son capaces de promover señales intracelulares. Es importante destacar que dependiendo de la localización del receptor, se activarán unas vías u otras.

La activación de las distintas vías intracelulares puede dar lugar a efectos diferentes (Segal y Greenberg, 1996). Muchos de los componentes de las vías activadas por factores tróficos no son únicos para un determinado factor, sino que cada uno de los componentes de la cascada de señalización puede actuar también en diversos contextos y ser activado a través de otros factores de crecimiento o de citoquinas, complicando el

problema de relacionar un mecanismo específico a una determinada respuesta (Kernie y Parada, 2000).

1.4.1.- Vía de las MAPK

La vía de las MAPK es una de las más conservadas a lo largo de la evolución y está formada por tres subfamilias: la vía de las ERKs (del inglés, *Ras/extracellular signal regulated kinase*), la vía de la p38 y finalmente, la vía de la SAPK/JNK (del inglés, *Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase*; Schaeffer y Weber, 1999). Hasta el momento se han identificado aproximadamente unos 20 miembros de la familia de las MAPK (Pearson y col., 2001). La vía de las MAPK se caracteriza por ser activada en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares, aparte de los factores de crecimiento, como son el suero, las citoquinas, el calcio, las hormonas y los neurotransmisores (Peyssonnaud y Eychene, 2001). En general, se asocia la vía de la ERK con la diferenciación/supervivencia, y las otras dos vías son inductoras de apoptosis (Xia y col., 1995). Las MAPK catalizan la fosforilación de residuos serina/treonina que están seguidos de una prolina. Cada quinasa es activada mediante una fosforilación dual de este motivo tripeptídico localizado en el *loop* de activación. Esta fosforilación está mediada por la MAPK quinasa (MAPKK), que a su vez es activada por fosforilación por otra quinasa, la MAPKKK. A nivel molecular la señalización se regula mediante la fosforilación y defosforilación por quinasas y fosfatasas, respectivamente (Johnson y Lapadat, 2002).

La vía de la **ERK/MAPK** (Figura 5A) más caracterizada es la cascada de Ras, Raf y MEK1/2. Esta vía comprende la fosforilación de la ERK1 y la ERK2 (ERK1/2), o lo que es lo mismo, la p44 y la p42 (p42/p44 MAPK). Una vez la p42/p44 MAPK se fosforila en los sitios Thr²⁰² y Tyr²⁰⁴, es translocada al núcleo donde se cree que regula la transcripción de varios genes. Se ha observado que c-Jun, c-Fos, c-Myc, c-Myb, Elk y CREB (del inglés, *cyclic-AMP responsive element binding*) son sustratos fosforilables por p42/p44 MAPK (Davis, 1995; Gille y col., 1995; Grewal y col., 1999; Vanhoutte y col., 1999). Aparte de ser translocada al núcleo, también puede actuar en el citoplasma, donde se cree que podría participar en la reorganización del citoesqueleto (Reszka y col., 1995).

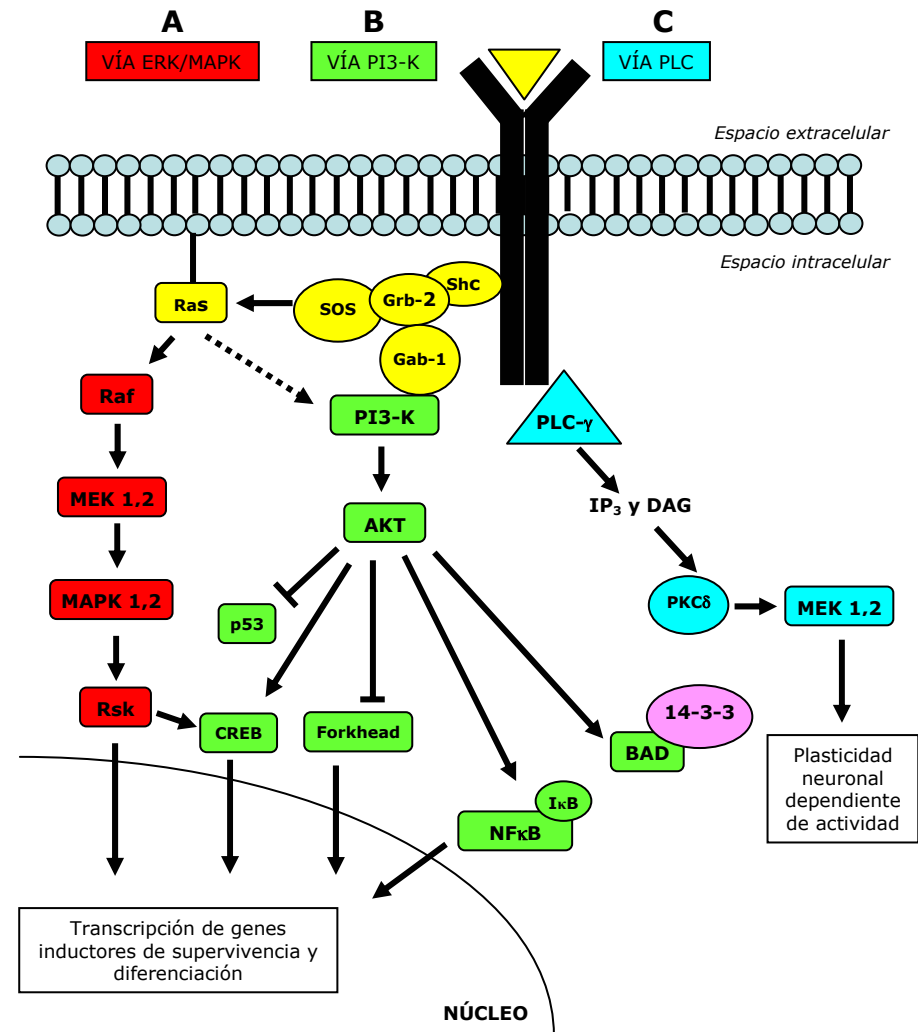


Figura 5.- Vías intracelulares activadas por factores tróficos

Varios estudios demuestran que la activación de la vía p42/p44 MAPK está implicada en fenómenos de diferenciación neuronal (Perron y Bixby, 1999; Atwal y col., 2000; Sole y col., 2004). No obstante, otros trabajos muestran que la activación de esta vía también regula la supervivencia celular (Parrizas y col., 1997; Feng y col., 1999; Hetman y col., 1999; Chaib-Oukadour y col., 2004), además de participar en fenómenos de plasticidad neuronal como el aprendizaje y la memoria (Mazzucchelli y col., 2002; Goldin y Segal, 2003). En este último punto hay alguna controversia, ya que estudios realizados en el ratón KO para p44 han demostrado que esta isoforma no está involucrada en fenómenos de aprendizaje. Además, no existe ninguna compensación por parte de la p42 (Selcher y col., 2001). También se ha descrito que la activación de la vía de la p42/p44 MAPK participa en fenómenos de neuroprotección por factores

tróficos (Hetman y col., 1999; Han y Holtzman, 2000; Rossler y col., 2004; Wu y col., 2004; Leeds y col., 2005).

La vía de la p42/p44 MAPK puede regularse también por neurotransmisores. Por ejemplo, en estudios realizados utilizando antipsicóticos se ha observado que dependiendo de la droga utilizada existe una activación o una reducción de la fosforilación de la p42/p44 MAPK en el núcleo estriado (Gerfen y col., 2002; Pozzi y col., 2003). También se ha observado un incremento en la fosforilación de p42/p44 MAPK en respuesta a la estimulación glutamatérgica (Wang y col., 2004). Los agonistas del receptor NMDA activan la vía de la p42/p44 MAPK (Sgambato y col., 1998; Mao y col., 2004) probablemente a través de un mecanismo que implica una serie de quinasas sensibles al calcio (Perkinton y col., 1999, 2002). Además, también se ha observado una activación de esta vía cuando se estimulan los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I y V, aunque esta activación está menos caracterizada (Vanhoutte y col., 1999; Thandi y col., 2002; Yang y col., 2004). Más recientemente, se han publicado varios estudios que relacionan la activación de p42/p44 MAPK con la inducción de apoptosis, un efecto claramente opuesto a lo que se conocía hasta el momento (Friguls y col., 2002; Noshita y col., 2002; Cheung y Slack, 2004; de Bernardo y col., 2004).

Aparte de la p42/p44 MAPK, otra isoforma de la familia de las ERKs, la ERK5, también conocida como BMK1 (del inglés, *big-mitogen activated kinase 1*), está implicada en procesos parecidos a la p42/p44 MAPK. Actualmente se conoce que se activa en respuesta a varios estímulos como el estrés oxidativo y los factores de crecimiento, como por ejemplo las neurotrofinas (Abe y col., 1997; Kato y col., 1997), relacionándose con fenómenos de supervivencia en el SNC (Cavanaugh y col., 2001; Liu y col., 2003; Shalizi y col., 2003) y en el SNP (Watson y col., 2001). El bloqueo de la activación de ERK5 disminuye la respuesta retrógrada iniciada por la estimulación de las neurotrofinas en los terminales axónicos (Watson y col., 2001).

1.4.2.- Vía de la PI3-K

Actualmente la vía de la PI3-K (Figura 5B) es por excelencia la vía de supervivencia que utilizan muchos modelos celulares para hacer frente a varios estímulos apoptóticos. Se han caracterizado tres clases de PI3-K en base a la estructura

proteica y a la preferencia hacia sus sustratos (Vanhaesebroeck y Waterfield, 1999; Cantrell 2001). La clase I es la que mejor se ha estudiado y la que ha sido relacionada con fenómenos de supervivencia; en cambio, la función de la clase II todavía no se conoce exactamente, y por último, se cree que la PI3-K clase III participa en el tráfico vesicular. La PI3-K de clase I está constituida por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110), las cuales están asociadas de manera constitutiva.

Cuando el factor trófico se une específicamente a su receptor, la PI3-K es reclutada de las proximidades de la membrana plasmática. La subunidad catalítica de la PI3-K genera los fosfoinosítoles fosfatos PIP₂ y PIP₃ en la membrana citoplasmática interna, los cuales presentan una afinidad diferencial para varias proteínas diana, entre las que destaca la serina/treonina quinasa Akt/PKB (Kaplan y Miller, 2000; Brunet y col., 2001). Se ha descrito también que la estimulación de la PI3-K a través del receptor Trk puede estar afectada por la localización intracelular del receptor. Cuando la endocitosis de los Trk está inhibida, el NGF incrementa aún más la actividad de la PI3-K, sugiriendo que la estimulación de la PI3-K tiene lugar en la membrana plasmática más que en los endosomas (York y col., 2000; Zhang y col., 2000; MacInnis y Campenot, 2002).

La activación de la PI3-K a través de los receptores Trk se puede dar de dos maneras distintas: (1) la subunidad reguladora de la PI3-K se une a proteínas que sirven de enlace, como son Grb-2 y/o Gab1/2 (Liu y Rohrschneider, 2002), y (2) la subunidad catalítica de la PI3-K se une directamente a proteínas de la familia Ras (Holgado-Madruga y col., 1997; Downward 1998; Vaillant y col., 1999). Es importante destacar que en ausencia de estas proteínas adaptadoras la PI3-K no se puede activar (Mazzoni y col., 1999; Kaplan y Miller, 2000; Huang y Reichardt, 2001). Además, se ha descrito que los factores tróficos necesitan la presencia de calmodulina, una proteína quelante de calcio, para la activación de la PI3-K en motoneuronas, lo que sugiere que existen otros componentes reguladores (Soler y col., 1998).

La quinasa Akt es una de las dianas de PI3-K más estudiada, observándose que es necesaria y suficiente para promover la supervivencia neuronal. Existen varios sustratos de esta quinasa que están implicados en diferentes pasos de las vías de muerte celular (Datta y col., 1999; Yuan y Yankner, 2000), entre los que destacan las proteínas pro-apoptóticas Bad (Datta y col., 1997; del Peso y col., 1997) y la caspasa 9 (Cardone

y col., 1998), la proteína quinasa GSK-3 β (del inglés, *glycogen synthase kinase 3- β* ; Pap y Cooper, 1998; van Weeren y col., 1998; Hetman y col., 2000), y factores de transcripción como los de la familia forkhead (Brunet y col., 1999; Kops y col., 1999), CREB (Walton y Dragunow, 2000) y la quinasa I κ B, proteína que regula de forma negativa a NF- κ B (Foehr y col., 2000). Trabajos en los cuales se ha utilizado el dominante negativo de Akt han demostrado que éste bloquea la supervivencia neuronal en presencia de factores tróficos, lo que sugiere que la expresión de Akt activada es suficiente para promover la supervivencia aún en ausencia de factores tróficos (Datta y col., 1999). Akt puede inducir la supervivencia neuronal mediante otros mecanismos, como por ejemplo, bloqueando la acción pro-apoptótica de p75^{NTR} (Miller y Kaplan, 2001). La activación de la vía de la PI3-K por factores tróficos y sus efectos sobre la supervivencia se han demostrado en varias poblaciones neuronales, como las neuronas estriatales (Stroppolo y col., 2001; Perkinton y col., 2002), neuronas corticales (Hetman y col., 1999; Yamada y col., 1997, 2001), células granulares de cerebelo (Nonomura y col., 1996), neuronas simpáticas (Creedon y col., 1997; Vaillant y col., 1999; Tsui-Pierchala y col., 2000), neuronas hipocampales (Righi y col., 2000), y motoneuronas (Dolcet y col., 1999; Soler y col., 1999; Nishimune y col., 2000). Se han observado además, cambios en la actividad o en los niveles de PI3-K tras una isquemia cerebral, después de una lesión axonal en las motoneuronas (Jin y col., 2000; Sakurai y col., 2001), así como en la esclerosis lateral amiotrófica (Wagey y col., 1998), en la corea de Huntington (Humbert y col., 2002; Gines y col., 2003), y en la enfermedad de Alzheimer (Zubenko y col., 1999). Además de la implicación de la vía de señalización PI3-K en la supervivencia neuronal, también se ha demostrado que puede tener un papel importante en fenómenos de diferenciación como la extensión neurítica, o la elongación y ramificación axonal (Atwal y col., 2000; Sanchez y col., 2001, Markus y col., 2002; Dijkhuizen y Ghosh, 2005).

1.4.3.- Vía de la PLC

Otra vía de señalización intracelular activada por neurotrofinas y miembros de la familia del GDNF es la de la PLC (Figura 5C). Se han descrito diez isoformas de la PLC en mamíferos, entre las cuales cuatro son proteínas PLC- β , dos PLC- γ y cuatro PLC- δ . Todas estas enzimas catalizan la hidrólisis del fosfatidilinositol (4,5)P₂ para generar diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP₃; Rhee, 2001). El IP₃ promueve la

salida de calcio de las reservas internas y la posterior activación de enzimas como la isoforma de PKC reguladora de calcio o la calmodulina. Se ha demostrado que solo la isoforma PLC- γ 1 es activada al unirse el factor trófico a su receptor (Middlemas y col., 1994; Obermeier y col., 1994; Poulin y col., 2000). Se ha propuesto pues, que la vía de la PLC- γ 1 juega un papel crítico en la plasticidad sináptica. Se piensa que la vía de la PLC- γ 1 se activa cuando se produce una salida de factor trófico hacia la zona sináptica en respuesta a la actividad eléctrica. La formación de IP3 promueve la salida masiva de calcio intracelular almacenado que conlleva a la activación de CaM quinasas que estimularán la salida de glutamato (Ouyang y col., 1997; Lessmann, 1998). En un estudio realizado en cultivos de cortes de hipocampo de ratón, donde el sitio de unión a la PLC- γ 1 estaba mutado, se observó que la potenciación sináptica estaba afectada, un fenotipo similar al descrito en los ratones KO para BDNF o TrkB (Minichiello y col., 2002). Además, el uso de inhibidores de la PLC- γ 1 bloquean la potenciación sináptica dependiente de BDNF (Kleiman y col., 2000; Yang y col., 2001).

1.4.4.- Vía de las Smad

La señalización intracelular en respuesta a las BMP (Figura 6) viene determinada por los patrones de expresión de los propios ligandos, de sus receptores y finalmente de los antagonistas solubles de las BMP, como la *noggin* y la *follistatin*, las cuales se unen a las BMP y previenen la interacción funcional de ligando-receptor (Cho y Blitz, 1998).

Una vez se ha dado la unión del ligando a su receptor, el receptor de tipo II fosforila al receptor de tipo I que es el responsable de iniciar la señalización intracelular a través de la fosforilación de las proteínas Smad (primero descubiertas en *Drosophila* como *mothers against decapentaplegic*, MAD, y posteriormente en *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) como *sma-1*, -2 y -3, SMA). Se ha descrito que las Smad actuarían de puente entre el receptor activo y los genes diana que se encuentran en el núcleo de la célula que está respondiendo a las BMP (Massagué y col., 1997). Existen tres tipos de Smads, (1) las que son activadas por el receptor de tipo I, la Smad1, Smad5 y Smad8, denominadas R-Smad, (2) la Smad4 que actúa como mediadora de la señal (Co-Smad), y (3) las inhibidoras, que incluyen la Smad6 y la Smad7 (I-Smad). Las R-Smads se asocian a la Smad4 en el citoplasma, promoviendo que este complejo heteromérico sea translocado al núcleo donde participará directamente en la modulación de la expresión

génica (Ebendal y col., 1998; Zwijsen y col., 2003; Yamamoto y Oelgeschläger, 2004). Las I-Smads se localizan en el citoplasma donde juegan un papel importante en la regulación de las Smad. Esta regulación puede darse por distintos mecanismos que pueden variar entre los diferentes tipos celulares. La Smad 6 y 7 inhiben la fosforilación de las R-Smads (Heldin y col., 1997), así como también pueden interactuar con los receptores de las BMP de tipo I y competir con las R-Smads (Imamura y col., 1997; Nakao y col., 1997), o bien con las Co-Smads (Hata y col., 1997). Por otro lado también se ha observado que las I-Smads pueden degradar el receptor de la BMP a través del reclutamiento de una ubiquitin-ligasa denominada *Smurf* (Kavsak y col., 2000; Ebisawa y col., 2001; Yanagisawa y col., 2001). Por último, la expresión de las I-Smads puede estar inducida a su vez a través de la señalización de miembros de la superfamilia del TGF- β , las cuales inducirán una retroalimentación negativa después de un periodo largo de activación (Nakao y col., 1997; Tsuneizumi y col., 1997; Afrakhte y col., 1998; Takase y col., 1998).

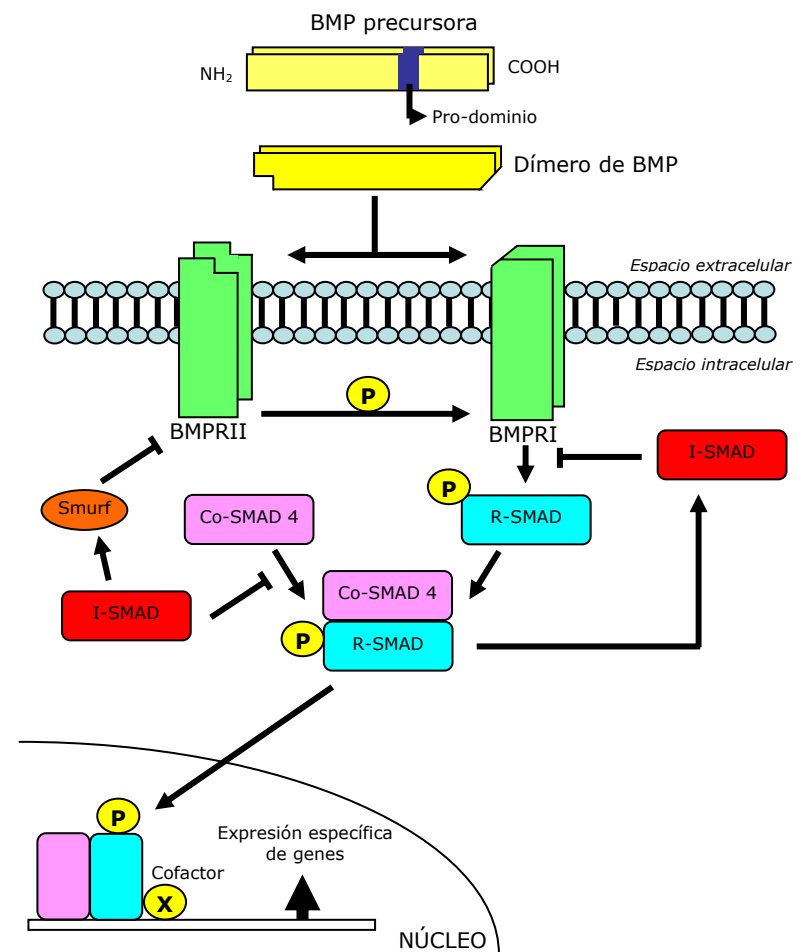


Figura 6.- Vía intracelular de las Smad

Es importante destacar que en una misma zona del SNC pueden coexistir varias Smad, pues no hay una Smad específica para cada área. No obstante, sí existe una especificidad tiempo-espacio, de manera que una determinada BMP actúa en el momento oportuno a través de una Smad específica. Por ejemplo, la BMP-2 antagoniza la proliferación que induce *sonic hedgehog* en las neuronas granulares del cerebelo a través de Smad5 (Rios y col., 2004), o el crecimiento dendrítico inducido por la BMP-7 sobre neuronas simpáticas requiere la Smad1 (Guo y col., 2001). La BMP-4 también actúa a través de la Smad1 en la diferenciación postnatal de las células cerebelares (Angley y col., 2003). Además se ha observado que la Smad7 inhibe el efecto sinérgico de la BMP-2 junto con el FGF (del inglés, *fibroblast growth factor*) en la diferenciación de las células PC12 (Hayashi y col., 2003).

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, ciertas BMP presentan efectos sinérgicos con determinadas neurotrofinas y/o miembros de la familia del GDNF. A nivel de señalización intracelular se ha observado que puede existir un punto de convergencia entre la p42/p44 MAPK y la Smad1/5 (Althini y col., 2004; Kim y col., 2004). En un estudio realizado en células septales se sugiere que la combinación de BDNF o NGF con BMP-6 y/o BMP-7 protege ante un estímulo de estrés bloqueando las caspasas (Nonner y col., 2004).

2.- MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Durante las etapas de desarrollo o bien durante la edad adulta, las neuronas están expuestas a la muerte neuronal. Esta muerte puede ocurrir a través de diversos mecanismos, entre los que destacan, por ser los más estudiados, la apoptosis y la necrosis (Yuan y col., 2003).

2.1.- APOPTOSIS

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

secuencia muy bien determinada de cascadas de señalización, siendo un mecanismo común en todas las células del organismo. Afortunadamente, los mecanismos de muerte celular parecen estar altamente conservados a nivel evolutivo. Gracias a este proceso, gran parte de los conocimientos actuales sobre la apoptosis en los mamíferos es gracias a los estudios realizados en el nematodo *C. elegans* (Horvitz, 2003).

Se han descrito dos vías principales de señalización intracelular que dan lugar a la muerte apoptótica: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Figura 7).

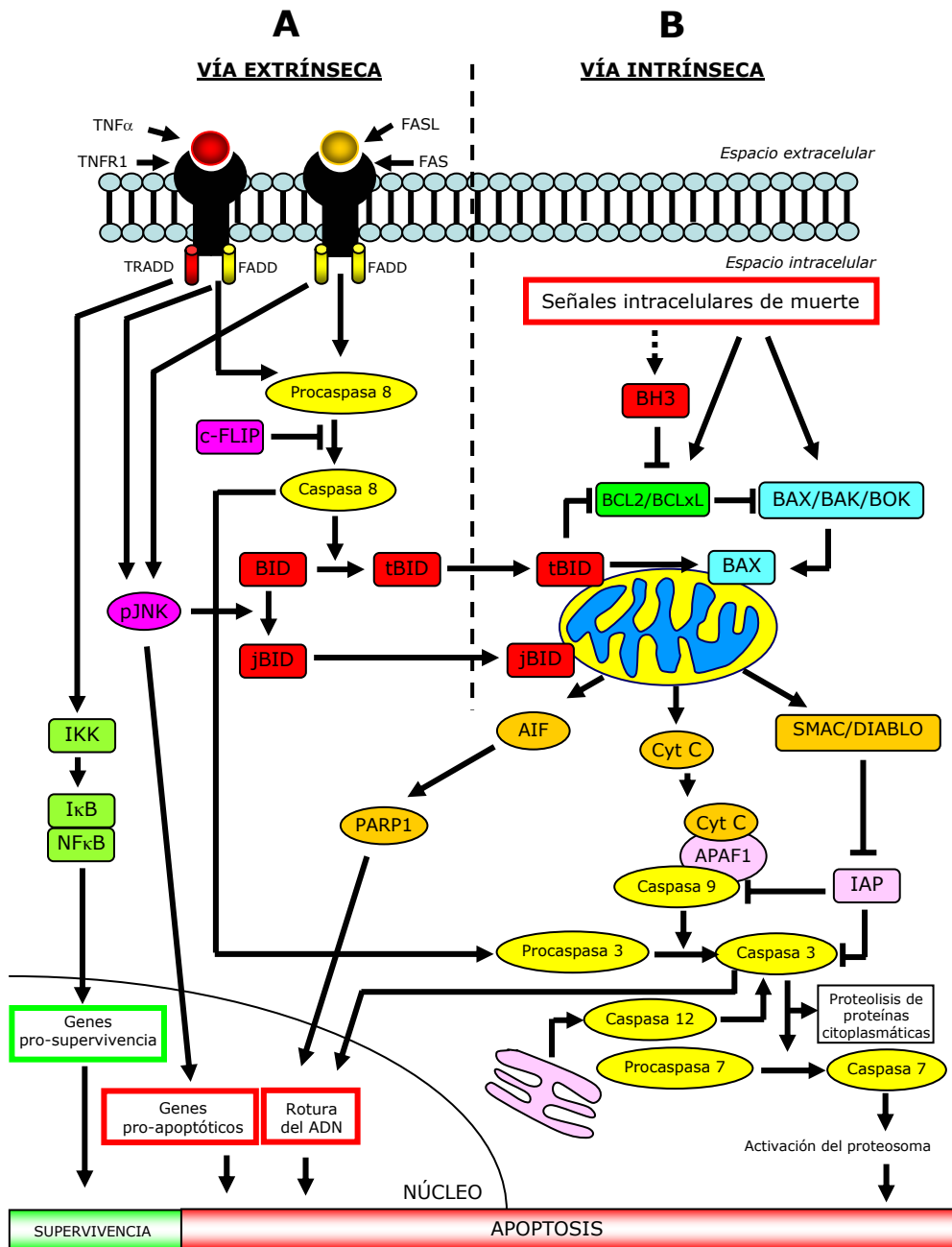


Figura 7.- Vías apoptóticas de señalización intracelular

Una misma neurona puede activar distintas vías apoptóticas en respuesta a diferentes estímulos (Pettmann y Henderson., 1998). La decisión de morir de una célula depende de (1) la localización subcelular de los miembros de la familia de la Bcl-2, (2) de los receptores de muerte y (3) la presencia y/o activación de señales anti-apoptóticas. Una vez la decisión de morir es la escogida, la ejecución del programa apoptótico requiere la coordinación de las vías de señalización intracelular que convergen en la muerte neuronal.

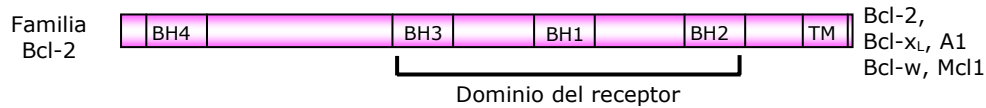
2.1.1.- Vía intrínseca

La vía intrínseca (Figura 7B) se caracteriza por el papel fundamental que tiene la mitocondria, concretamente la permeabilización de su membrana, en la cascada de señalización. La primera evidencia que indicó la importancia de la mitocondria en la apoptosis fue revelada por Newmeyer en el año 1994, usando un modelo de “célula-libre” (Newmeyer y col., 1994). Dicha vía puede activarse por varios estímulos agudos o semi-agudos, como la isquemia (Krajewski y col., 1995), el estrés oxidativo, o bien por radiación ionizante (Benn y Woolf, 2004), los cuales provocan cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Actualmente es bien conocido que la vía intrínseca está regulada por los miembros de la familia de la Bcl-2, ya que éstos realizan sus funciones (pro-apoptóticas o pro-supervivencia) en este orgánulo (Cory y Adams, 2002), aunque aún existen varias controversias acerca de los mecanismos moleculares de los mismos. El primer miembro que se descubrió fue el protooncogen *Bcl-2*, y se observó que su expresión no promovía la proliferación celular como otros oncogenes, sino que bloqueaba la muerte celular ante múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (Vaux y col., 1988; McDonnell y col., 1989). Dentro de la familia de la Bcl-2, existen miembros anti-apoptóticos que promueven la supervivencia, y miembros pro-apoptóticos con función opuesta. El primer homólogo pro-apoptótico de la Bcl-2 descubierto fue la proteína Bax, identificada por su interacción con la Bcl-2 (Oltvai y col., 1993). Todas estas proteínas presentan, como mínimo, una de las cuatro regiones o dominios homólogos a Bcl-2 (BH1-BH4, del inglés *Bcl-2 homology*), lo cual les permite interactuar entre ellos formando homodímeros o heterodímeros, regulando así su función (Oltvai y col., 1993). Existen al menos 20 miembros de la familia de la Bcl-2, que se dividen a su vez en tres subclases principales (Figura 8). Los miembros anti-apoptóticos incluyen la Bcl-2, la

Bcl-x_L (Boise y col., 1993), la MCL-1 (Kozopas y col., 1993), la A1 (Choi y col., 1995) y la Bcl-w (Gibson y col., 1996). Todo este grupo de proteínas conservan los cuatro dominios homólogos a Bcl-2. Los miembros pro-apoptóticos multidominio, Bax, Bak y Bok, no tienen el dominio 4; en cambio, el otro grupo pro-apoptótico, que incluye las proteínas Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Hrk/DP5, Noxa y Puma solo presenta el dominio 3, siendo su nombre “solo BH3” (del inglés *BH3-only*).

Pro-supervivencia



Pro-apoptosis

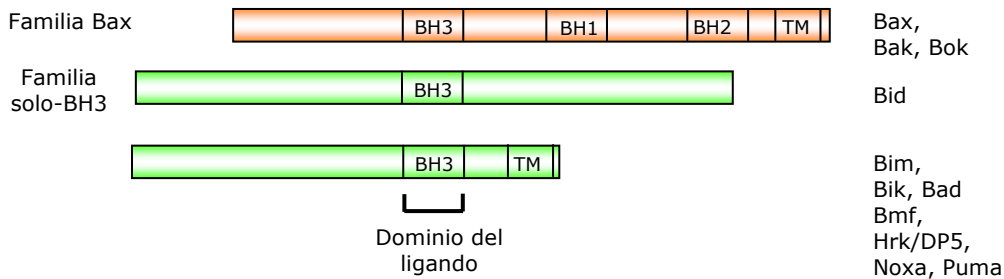


Figura 8.- Miembros de la familia de la Bcl-2

(fig. adaptada de Cory y Adams, 2002)

Las proteínas de la familia de la Bcl-2 se pueden regular a nivel transcripcional y post-translacional (mediante cambios conformacionales o por fosforilación). En condiciones normales, las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o Bcl-x_L están ancladas en determinadas membranas intracelulares como la mitocondria, el retículo endoplásmico o la membrana nuclear (Krajewski y col., 1993). Ambas proteínas actúan inhibiendo a los miembros pro-apoptóticos a través de la heterodimerización con éstos (Merry y Korsmeyer, 1997). Además de los cambios a nivel de dimerización, Bcl-2 también puede regularse por fosforilación. Dependiendo de la serina que se fosforile puede dar lugar a un cambio de su función, así pues, la fosforilación de la serina 87 se ha ligado a la inactivación de la proteína con la pérdida de su función anti-apoptótica (Srivastava y col., 1998; Yamamoto y col., 1999; Korhonen y col., 2003), y por el contrario, el incremento de la fosforilación de la serina 70 puede incrementar la función protectora de Bcl-2 en células mieloides dependientes de interleuquina-3, y en algunas

líneas celulares de linfomas (Ruvolo y col., 1998; Deng y col., 2000; Zhao y col., 2001). En cambio, Bax se localiza en el citosol y después de un estímulo apoptótico es translocada a la membrana mitocondrial externa donde se integra y forma oligómeros o multímeros (Hsu y col., 1997; Gross y col., 1998; Zhang y col., 1998; Antonsson y col., 2001; Nechushtan y col., 2001; Mikhailov y col., 2001). A diferencia de Bax, Bak está siempre anclada a la membrana mitocondrial (Griffiths y col., 1999), pero durante la apoptosis también cambia de conformación y puede así formar grandes agregados (Wei y col., 2001). Varios estudios demuestran la regulación a nivel transcripcional de miembros de la familia de la Bcl-2 en respuesta a diversos estímulos apoptóticos o citotóxicos, observándose una disminución de la expresión de Bcl-2 y/o Bcl-x_L (Krajewski y col., 1995; Sato y col., 1998; Tamatani y col., 1998; Ghribi y col., 2002; Wei y col., 2002) y un aumento de la expresión de Bax (Krajewski y col., 1995; Ghribi y col., 2002; Korhonen y col., 2003).

Las proteínas que sólo presentan el dominio BH3 también presentan los dos tipos de regulación. A nivel transcripcional, sólo son reguladas Bim, Noxa, Puma y Hrk/DP5 (Huang y Strasser, 2000). Noxa y Puma están bajo control transcripcional de p53 en respuesta a daño en el ADN (Oda y col., 2000; Yu y col., 2001). Estudios realizados utilizando inhibidores químicos han demostrado que la activación transcripcional del gen *Hrk/DP5* requiere la activación de la SAPK/JNK quinasa. Por último, el control transcripcional de Bim parece ser complejo, ya que diversos grupos han revelado distintas formas de regulación. Estas discrepancias pueden ser debidas al análisis de diferentes tipos de tejidos, indicando quizás una regulación transcripcional específica del gen *bim* para cada tipo celular. Además, existen tres isoformas de Bim que se sintetizan a partir del mismo transcrito (O'Connor y col., 1998), la Bim_{EL} (del inglés, *extra-long*), la Bim_L (del inglés, *long*), y la Bim_S (del inglés, *short*), lo cual representa un nivel de regulación adicional a nivel de *splicing* de pre-RNA. Hasta el momento, se ha descrito que la JNK (Putchá y col., 2001; Whitfield y col., 2001; Harris y Johnson, 2001), la vía de la ERK/MAPK y de la PI3-K (Shinjyo y col., 2001; Weston y col., 2003; Reginato y col., 2003) actuarían como reguladoras de la transcripción de Bim, así como el factor de transcripción forkhead (Dijkers y col., 2000).

A nivel post-translacional también existen diferencias en cuanto a la regulación de las distintas proteínas de la subfamilia que sólo presentan el dominio BH3. Por

ejemplo, en células que son estimuladas con factores de crecimiento, Bad es fosforilada en algunos residuos serina y eso permite su secuestro en el citoplasma uniéndose a la chaperona 14-3-3 (Zha y col. 1996). En cambio la fosforilación de Bik, a diferencia de Bad, incrementa su actividad pro-apoptótica (Verma y col., 2001). Respecto a la regulación post-translacional de Bim puede darse a través de dos mecanismos: la liberación del complejo donde se encuentra unida y la fosforilación. Las proteínas Bim_{EL} y Bim_L, en condiciones normales se encuentran unidas a la cadena ligera de dineína LC8. Existen pero, múltiples estímulos que hacen que se liberen de esta unión y se activen (Puthalakath y col., 1999). Bim también puede ser fosforilada a través de la vía de la JNK (Lei y Davis, 2003; Putcha y col., 2003; Okuno y col., 2004) y de la ERK/MAPK (Luciano y col., 2003). Una vez activadas las proteínas que presentan solo el dominio BH3 se unen y neutralizan a sus homólogos anti-apoptóticos, como por ejemplo, Bcl-2 o Bcl-x_L (Conradt y Horvitz., 1998; O'Connor y col., 1998; Hsu y col., 1998), o se unen a proteínas como Bax en la membrana mitocondrial (Wang y col., 1996).

Actualmente existe la teoría que se requieren tanto las proteínas que presentan sólo el dominio BH3 como las proteínas pro-apoptóticas multidominio para que se inicie la apoptosis: las proteínas que sólo tienen el dominio BH3 actuarían de “centinelas” y antagonistas directos de las proteínas pro-supervivencia. En cambio, las proteínas Bax y Bak actuarían a nivel de la mitocondria, donde formarían poros para que se produzca la salida de citocromo c, de AIF (del inglés, *apoptosis-inducing factor*) o de Smac/DIABLO (del inglés, *second mitochondrial-derived activator of caspase/direct IAP-associated binding protein with Low PI*). Bax y Bak juntos constituyen el requisito de entrada para que se active la vía intrínseca en la mitocondria (Wei y col., 2001) y en el retículo endoplásmico (Scorrano y col., 2003). Es importante mencionar que sin la presencia de Bax o Bak, las proteínas que sólo tienen el dominio BH3 no son capaces de llevar a cabo la apoptosis (Zong y col., 2001).

Cabe destacar la importancia que tiene el equilibrio entre proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas para que se inicie la apoptosis (Korsmeyer y col., 1993). El uso de ratones heterocigotos o KO para estas proteínas y también los dobles deficientes ha facilitado el avance en el estudio de las funciones de toda esta compleja familia de proteínas. En general, la delección de una sola proteína muestra efectos que se

limitan a ciertos tipos de célula o tejido, lo cual indicaría cierta redundancia entre miembros de esta familia, al menos durante el desarrollo (Ranger y col., 2001). Por ejemplo, la pérdida de un solo alelo de *bcl-2*, *bcl-x*, *bcl-w* o *mcl-1* no incrementa la muerte celular (Ranger y col., 2001), revelando que los niveles de la familia pro-supervivencia parecen ser menos limitantes, quizás porque solo es necesaria una porción de estas moléculas unidas a proteínas con sólo el dominio BH3 para que se active la apoptosis. Además, la redundancia funcional (Lindsten y col., 2000; Zheng y col., 2000; Wei y col., 2001) o la compensación (Harlin y col., 2001) entre miembros de la familia de la Bcl-2 podrían explicar porqué la delección de un gen individual puede dar lugar a poca o nula muerte celular, al menos en ciertos paradigmas. La vía por la cual se puede dar lugar a mecanismos compensatorios en cuanto a la expresión de ciertas proteínas que podrían ser funcionalmente redundantes, aún está por resolver (Harlin y col., 2001). Así pues, el ratón KO para Bcl-2 es viable aunque durante el desarrollo postnatal sufre una degeneración de las motoneuronas así como de las neuronas sensoriales (Michaelidis y col., 1996). En cambio, el ratón deficiente en Bcl-x_L es letal ya que muere a E13 (Motoyama y col., 1995). Respecto a los ratones deficientes para proteínas pro-apoptóticas, se ha observado, por ejemplo, que el ratón KO para Bax presenta anormalidades en el desarrollo hematopoyético, neuronal y gametogénico (Knudson y col., 1995), aparte de la eliminación de la muerte celular programada en ciertas zonas del SN (White y col., 1998). En cambio, el ratón KO para Bak presenta un desarrollo relativamente normal (Lindsten y col., 2000), pero el doble mutante para Bax y Bak presenta una mortalidad de casi un 90% al momento de nacer (Lindsten y col., 2000). Aparte de estos ratones, se han diseñado otras combinaciones de delecciones de genes de la familia de la Bcl-2, que tienen como resultado distintos fenotipos y anormalidades durante el desarrollo (Knudson y col., 1997; Shindler y col., 1997, 1998; Bouillet y col., 1999, 2001; Yin y col., 1999; Ranger y col., 2003; Hutcheson y col., 2005).

Los cambios en los niveles de expresión, de conformación o de fosforilación de los distintos miembros de la familia de la Bcl-2, entre otros, provoca que en la mitocondria, las proteínas pro-apoptóticas promuevan la salida del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol del citocromo c, de la Smac/DIABLO y del AIF, aunque todavía hoy existen varias teorías intentando descifrar de qué manera tiene lugar (Hengartner, 2000). Cabe mencionar pero, que la salida de la Smac/DIABLO y del AIF puede ocurrir por más de un mecanismo, o al menos, puede estar regulada por

varias proteínas pro-apoptóticas (Adrain y col., 2001; Arnoult y col., 2002; Kandasamy y col., 2003). También es importante destacar que la salida de AIF induce a una muerte que es independiente de la activación de caspasas (Susin y col., 1999; Daugas y col., 2000). Una vez se ha dado la salida del citocromo c de la mitocondria, éste se une a una proteasa activadora de apoptosis, la Apaf-1 (del inglés, *Apoptosis protease activating factor-1*), se oligomerizan e interaccionan con la procaspasa 9 y con ATP. El complejo proteico formado por el citocromo c, la Apaf-1 y la procaspasa 9 recibe el nombre de apoptosoma, y da lugar a la activación de la caspasa 9 (Srinivasula y col., 1998; Wang, 2001). A partir de la formación de este complejo, se inicia la activación de las caspasas 3 y 7, y la cascada de activación conlleva finalmente a la rotura y a la degradación de proteínas estructurales citoplasmáticas y de ADN cromosómico (Benn y Woolf, 2004).

La familia de las caspasas es un componente de la maquinaria apoptótica clave en la cascada de señalización intracelular. La caracterización del gen *ced-3* en el nemátodo *C. elegans* permitió analizar cómo se ejecutaba la muerte celular en los mamíferos. Se observó que *ced-3* codificaba para una proteína relacionada con la proteasa ICE en mamíferos (del inglés, *Interleukin-1 beta-converting enzyme*), la cual se había relacionado con procesos inflamatorios (Yuan y col., 1993). ICE fue el primer miembro (caspasa 1) descubierto de esta familia de proteasas que dependen de la presencia de un ácido aspártico localizado justo anteriormente al sitio de rotura (Black y col., 1989). Las caspasas comparten similitudes tanto en su secuencia aminoacídica como en su estructura y especificidad de sustrato. Todas se expresan de manera constitutiva como proenzimas inactivas donde el prodominio N-terminal se encuentra seguido de secuencias que codifican primero para una subunidad corta, y luego, para una larga. La activación de las caspasas requiere la proteólisis de este proenzima, obteniendo un complejo heterotetramérico (el enzima activo) compuesto por dos subunidades cortas y dos largas (Wolf y Green, 1999).

Actualmente se conoce la existencia de 12 caspasas diferentes en mamíferos. En base a sus funciones apoptóticas, se dividen en 2 grupos: las que se cree que están implicadas en la muerte neuronal (caspasa 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 y 12), y las que están relacionadas con procesos inflamatorios (caspasa 1, 4, 5 y 11). Dentro del primer grupo de caspasas, existe a su vez una subdivisión (Philchenkov, 2004):

a.- caspasas iniciadoras: caspasa 2, 8, 9, 10 y probablemente la 11. Son las encargadas de activar al grupo de las caspasas ejecutoras

b.- caspasas ejecutoras: caspasa 3, 6 y 7. Este grupo de proteasas son capaces de degradar directamente múltiples sustratos, incluyendo las proteínas estructurales y reguladoras del núcleo, del citoplasma y del citoesqueleto.

En determinados casos las caspasas iniciadoras también pueden funcionar como efectoras y al revés, así lo parecen indicar estudios *in vitro* donde la caspasa 2 puede actuar como ejecutora, y la caspasa 6 puede ser iniciadora (Thornberry y col., 1997). Por otro lado, la activación de caspasas efectoras no sólo puede ser a través de caspasas iniciadoras, sino a través de proteasas que no sean caspasas, como las catepsinas o calpaínas (Johnson, 2000).

La activación de las caspasas dentro de la célula está altamente controlada, por eso en la cascada de muerte celular existen una serie de reguladores, procesos de retroalimentación e inhibidores endógenos que controlan todo este mecanismo. Un ejemplo claro es el de la familia de las proteínas IAP (del inglés, *inhibitors of apoptosis*), las cuales regulan negativamente la activación de las caspasas 3, 7 y 9 (Deveraux y col., 1997; Chai y col., 2001; Huang y col., 2001; Riedl y col., 2001). Al mismo tiempo, las IAPs están controladas por varios mecanismos, como es la Smac/DIABLO (Chai y col., 2000), la cual antagoniza el efecto inhibitorio de la IAP. La Smac/DIABLO sale de la mitocondria al citosol con el citocromo c, y así puede unirse a las IAPs dejando libre a las caspasas para que actúen (Saelens y col., 2004).

2.1.2.- Vía extrínseca

La vía extrínseca (Figura 7A) se inicia por la activación de receptores de muerte de la familia del TNF (del inglés, *Tumor necrosis factor*) anclados a la membrana plasmática. La familia del TNF está constituida por varios grupos de receptores, entre los cuales destacan el TNFR1 (del inglés, *TNF-receptor 1*), el APO1/FAS/CD95 (del inglés, *Apoptosis antigen-1*) y el TRAILR1 (del inglés, *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1*). Estos receptores tienen en común la presencia de un motivo llamado “dominio de muerte” y otro que es el dominio “efector de muerte” (Tartaglia y col., 1993; Hsu y col., 1995). La activación del receptor se inicia a través de ligandos específicos, por ejemplo el ligando de Fas, el FasL, se une al receptor Fas, el TNF α se

une al TNFR1 y el TRAIL al TRAILR1. Cuando el ligando se une a su receptor, los dominios de muerte se asocian con las proteínas adaptadoras que contienen los dominios efectores de muerte; en el caso del Fas, éste se asocia con el FADD, y el TNFR1 con el FADD y el TRADD (Vila y Przedborski, 2003; Danial y Korsmeyer, 2004).

Una vez Fas y FADD o TNFR1 y TRADD se han asociado, reclutan a la procaspasa 8 provocando su activación. A su vez, la caspasa 8 puede ser inhibida a través de c-FLIP (del inglés *FADD-like ICE-inhibitory protein*) (Irmeler y col., 1997). Posteriormente la caspasa 8 proteoliza a Bid, que en condiciones normales se encuentra de forma inactiva en el citosol, formando un fragmento truncado (tBid) que es translocado a la mitocondria (Desagher y col., 1999; Wei y col., 2000). El tBid inicia la permeabilización de la membrana mitocondrial induciendo cambios conformacionales y la oligomerización de Bax y Bak, estimulando la salida del citocromo c (Esposti, 2002) y la posterior activación de las caspasas efectoras. La caspasa 8 también puede activar estas caspasas directamente sin promover la salida de citocromo c de la mitocondria (Cryns y Yuan, 1998). La interacción funcional entre la vía intrínseca y la extrínseca es un fenómeno que se ha descrito en multitud de modelos, y parece ser que la vía mitocondrial puede inducir una amplificación importante de la señal por parte de los receptores de muerte. Por otra parte, se ha observado que la procaspasa 8 puede activarse a través de un mecanismo que depende de la vía intrínseca (Slee y col., 1999), y por el contrario, la activación de la caspasa 8 y la rotura de Bid puede ocurrir después de la salida del citocromo c y la activación de la caspasa 9 (Viswanath y col., 2001).

Otra vía alternativa activada por receptores de muerte es la JNK (Weston y Davis, 2002; Shaulian y Karin, 2002; Lin, 2003). JNK desencadena la muerte apoptótica inactivando los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-x_L, o por el contrario, induciendo la fosforilación y activación de la proteína pro-apoptótica Bim. Además, JNK también incrementa la expresión de Bim, p53 y Fas/FasL (Ip y Davis, 1998). Bid también puede ser modificada por JNK, la cual genera un producto, denominado jBid, diferente al tBid. A su vez, jBid es translocada a la mitocondria y permite la salida selectiva de Smac/DIABLO (Deng y col., 2002, 2003; Liu, 2003). A pesar de que las señales de los receptores de muerte están restringidas a la apoptosis, como en el caso del Fas, parece ser que el TNF α puede activar, además de la vía de muerte, el factor de

transcripción NF- κ B y promover la supervivencia neuronal (Tamatani y col., 1999; Wajant y Scheurich, 2001; MacEwan, 2002).

Se ha descrito que la vía extrínseca está relacionada con situaciones patológicas donde hay inflamación, y precisamente este fenómeno se da en diversas enfermedades neurodegenerativas (Wyss-Coray y Mucke, 2002). Varios trabajos relacionan la vía del Fas-FasL con mantener el sistema inmunitario suprimido en el SNC e inducir la muerte celular en enfermedades como el Alzheimer, la corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (Mogi y col., 1996; Ferrer y col., 2000b; Morishima y col., 2001; Raoul y col., 2002).

2.2.- NECROSIS

Además de la muerte por apoptosis, existe otro tipo de muerte neuronal que es consecuencia directa de agresiones tales como un traumatismo, hipoxia, isquemia, sustancias tóxicas, excitotoxicidad o una reducción energética. También puede darse un proceso necrótico en algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Martin, 2001). Es importante destacar que también se dan procesos de necrosis “regulada” durante el desarrollo. Al igual que en el caso de la apoptosis, la necrosis se describió como un tipo importante de muerte celular con unas características morfológicas determinadas (Kerr y col., 1972; Wyllie y col., 1972). Las células presentan un hinchamiento de la mitocondria, dilatación del retículo endoplásmico, y una disrupción de la integridad del núcleo y del citoplasma. Es típico que la necrosis induzca una respuesta inflamatoria.

Cabe destacar que una misma célula puede morir por apoptosis o necrosis dependiendo del estímulo que reciba (Leist y col., 1997). Por lo tanto, la característica morfológica de la célula durante el proceso de muerte viene determinada por la intensidad del estímulo (Lee y col., 1999). Otro factor adicional que participa en el mecanismo que activará la célula para morir, apoptosis o necrosis, es la duración y la intensidad del estímulo, así pues, un estímulo agudo genera respuestas que son diferentes a las inducidas por el mismo tipo de estímulo pero de forma crónica (Ankarcrona y col., 1995). Un ejemplo claro es el de la excitotoxicidad; el incremento de la concentración del calcio intracelular está implicado tanto en necrosis como en

apoptosis, y la contribución de cada tipo de muerte está correlacionado con el aumento de la concentración del calcio intracelular (Sattler y col., 2000). Existen además otras proteínas o fenómenos relacionados con la necrosis, como las catepsinas, las calpaínas o una excesiva acumulación de especies reactivas al oxígeno (Bonfoco y col., 1995; Yamashima, 2000; See y Loeffler, 2001).

2.3.- INTERACCIÓN ENTRE VÍAS DE SUPERVIVENCIA Y VÍAS DE MUERTE NEURONAL

Cuando se inicia el proceso de muerte en una célula se activan varios factores, endógenos o exógenos, capaces de frenarla. Existen multitud de interconexiones entre las vías de supervivencia y las de muerte, un gran entramado de proteínas de señalización intracelular con capacidad de antagonizar una respuesta celular a un determinado estímulo.

Tal como se ha mencionado, la vía de la PI3-K es, por excelencia, la vía de supervivencia que utilizan muchas células frente a un estímulo apoptótico. PI3-K antagoniza algunas proteínas pro-apoptóticas como Bad, la caspasa-9 o la GSK-3 β (Yuan y Yankner, 2000). Estudios realizados en neuronas simpáticas han demostrado que la vía de la PI3-K es necesaria para que las células sobrevivan en ausencia de factores tróficos (Orike y col., 2001). Akt también puede regular la supervivencia neuronal inhibiendo el cambio de conformación de Bax (Yamaguchi y Wang, 2001) o bien fosforilando la proteína pro-apoptótica Bad (Datta y col., 1997).

Varios trabajos demuestran la importancia de Akt en la supervivencia celular antagonizando una amplia variedad de estímulos apoptóticos. La activación de esta quinasa por parte del IGF-1 (del inglés, *Insulin-like growth factor-1*) en respuesta a la exposición a óxido nítrico en cultivos hipocámpales desencadena una serie de estímulos anti-apoptóticos, como la modulación de la expresión de Bax y Bcl-2 (Matsuzaki y col., 1999). Por otra parte, la sobreexpresión de Akt en neuronas del nervio hipogloso expuestas a una axotomía induce una mayor supervivencia de estas células (Namikawa y col., 2000). La Akt también protege frente al daño del ADN (Henry y col., 2001), al estrés oxidativo (Yamaguchi y Wang, 2001; Chong y col., 2003) y a la hipoxia (Wick y col., 2002). Además, la Akt también es regulada por fenómenos de excitotoxicidad, por ejemplo, en un estudio realizado en células hipocámpales se observa una disminución

de la fosforilación de Akt tras una lesión inducida por ácido kaínico (KA) lo que provoca a su vez la liberación de Bad de su chaperona y la posterior unión de Bad a Bcl-x_L (Henshall y col., 2002). La GSK-3 β es una quinasa regulada por la Akt que cuando es fosforilada se inactiva. El uso de inhibidores de la GSK-3 β tiene un papel neuroprotector frente a la excitotoxicidad inducida por agonistas del receptor NMDA y no-NMDA (Facci y col., 2003).

Las vías de señalización pro-supervivencia también antagonizan la muerte inducida por receptores de muerte. La Akt promueve la expresión de c-FLIP el cual a su vez antagoniza el receptor Fas en células endoteliales (Suhara y col., 2001). Otra interacción entre vías de supervivencia y muerte celular se ha observado en células de glioma donde TRAIL activa tanto la vía de muerte extrínseca como la intrínseca, y además, inhibe la vía de la Akt a través de la activación de caspasas que neutralizan su función anti-apoptótica (Puduvalli y col., 2005). Aparte de la Akt, la vía de la ERK/MAPK también antagoniza los receptores de muerte a nivel de la caspasa 8 (Tran y col., 2001). Por último, la inducción de la muerte apoptótica a través de la vía de la SAPK/JNK es inhibida por la activación de las vías de la ERK/MAPK y de la PI3-K (Yang y col., 1997; Davis, 2000).

La regulación de diferentes miembros de la familia de la Bcl-2 también es un fenómeno ampliamente descrito en varios modelos de lesión. Tras una lesión excitotóxica, por ejemplo, la presencia de ciertos factores tróficos protege a las células activando las vías de supervivencia o antagonizando las proteínas pro-apoptóticas de la familia de la Bcl-2 (Tamatani y col., 1998; Sawada y col., 2000; Schabitz y col., 2000; Natsume y col., 2001; Ghribi y col., 2002; Wong y col., 2005).

Por último, la generación de ratones doble deficientes en proteínas pro-apoptóticas como Bax y factores tróficos como el NGF y la NT-3 demuestran la interacción tan estrecha que hay entre las vías de muerte y las de supervivencia neuronal. En los animales doble deficientes para NGF o TrkA y Bax se ha observado que las neuronas del ganglio de la raíz dorsal sobreviven aunque presentan déficits de desarrollo (Patel y col., 2000; Glebova y Ginty, 2004). El ratón doble mutante para Bax y NT-3 no presenta la pérdida del número de neuronas del ganglio de la raíz dorsal que tiene lugar en los animales deficientes para esta neurotrofina (Ernfors y col., 1994b; Fariñas y col.,

1994), sino que alcanza unos niveles comparables a los que se encuentran en los ratones KO para Bax (Patel y col., 2003).

3.- LOS GANGLIOS BASALES

La expresión de ciertos factores tróficos durante el desarrollo y en la etapa adulta, así como la regulación de los mecanismos de muerte neuronal permiten establecer una correcta formación de los circuitos cerebrales. Una alteración en el funcionamiento de dichos circuitos conlleva a una descompensación del sistema, tal como se ha observado en determinadas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la corea de Huntington, en las cuales los ganglios basales están severamente afectados. Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la atrofia selectiva que presentan las células de una determinada zona del cerebro como consecuencia de una mutación hereditaria o por determinados factores ambientales. Estas enfermedades suelen ser crónicas, ya que los enfermos que las padecen conviven con ellas durante bastantes años.

Los ganglios basales son un conjunto de núcleos subcorticales altamente interconectados entre sí, e involucrados en el control de la actividad motora. Anatómicamente están constituidos por el núcleo estriado (núcleo caudado y putamen), el globo pálido (segmento interno y externo) y el núcleo accumbens. Funcionalmente existen dos núcleos asociados más, el núcleo subtalámico y la sustancia negra. El núcleo estriado es el responsable de integrar la información procedente de diversas zonas cerebrales controlando así en gran medida los movimientos. Principalmente recibe aferencias de la corteza cerebral (vía corticoestriatal) y de la sustancia negra *pars compacta* (vía nigroestriatal), aunque también recibe aferencias del tálamo y del rafe. Una vez procesada la información, envía eferencias hacia el globo pálido interno y la sustancia negra *pars reticulata*, bien directamente (vía directa; vía estriatonigral), o bien a través del globo pálido externo y del núcleo subtalámico (vía indirecta; vía estriatopalidal). Las proyecciones de los ganglios basales se dirigen otra vez al tálamo y después hacia la corteza cerebral (Gerfen, 1992; Smith y col., 1998; Bolam y col., 2000; Figura 9).

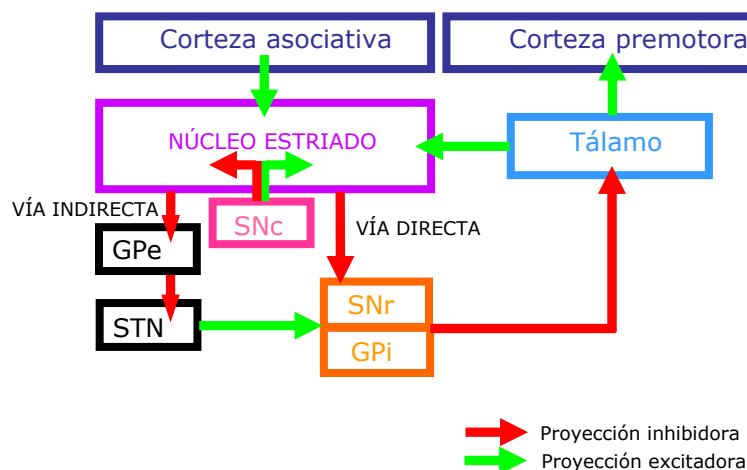


Figura 9.- Circuitos de los ganglios basales

En condiciones normales, ambas vías se equilibran, pero en condiciones patológicas cuando las neuronas que integran estas vías degeneran, la descompensación del sistema genera graves problemas en el control del movimiento (Graybiel, 2000).

3.1.- HISTOLOGÍA DEL NÚCLEO ESTRIADO

A nivel histológico, el núcleo estriado está compuesto por neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección representan un 90-95% de la población estriatal, y utilizan el GABA como neurotransmisor, aunque de manera simultánea también expresan la proteína quelante de calcio calbindina, y uno o más neuropéptidos (Graybiel, 1983; Gerfen, 1992). Las células que proyectan al globo pálido externo expresan encefalinas, y en cambio, las que envían sus axones a la sustancia negra *pars reticulata* o al globo pálido interno se distinguen por expresar dinorfina y sustancia P. Estas neuronas presentan un soma celular de tamaño mediano, unas 10-15 μm de diámetro, y presentan espinas dendríticas y un axón largo que establece conexiones fuera del núcleo, y precisamente por estas características morfológicas reciben también el nombre de neuronas medianas espinosas. Las interneuronas representan sólo el 5-10 % de la población del núcleo estriado pero ejercen un papel importante en el control de la excitabilidad de las neuronas estriatales de proyección. Las interneuronas se pueden clasificar en (1) colinérgicas, las cuales se caracterizan por su enorme soma (20-50 μm de diámetro), y utilizan la acetilcolina como neurotransmisor (Bolam y col., 1984); (2) GABAérgicas de tamaño algo mayor

que el de las neuronas de proyección y que expresan la proteína quelante de calcio parvalbúmina (Gerfen y col., 1985); (3) GABAérgicas de tamaño mediano que contienen calretinina (Jacobowitz y Winsky, 1991; Resibois y Rogers, 1992) y (4) las interneuronas que coexpresan somatostatina y neuropéptido Y (Vincent y col., 1983; Dawson y col., 1991).

El uso de marcadores neuroquímicos específicos y el estudio de las conexiones que establece el núcleo estriado han permitido definir una serie de compartimentos que reciben el nombre de estriosomas y matriz. Los estriosomas son regiones ricas en receptores μ -opiáceos y pobres en acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale, 1978; Herkenham y Pert, 1981). La matriz en cambio, se caracteriza por presentar un elevado marcaje para calbindina y fibras inmunoreactivas para la somatostatina (Gerfen, 1992). Esta organización en compartimentos del núcleo estriado se podría correlacionar con la segregación funcional de diferentes poblaciones de neuronas de proyección que reciben y emiten diferentes aferencias y eferencias.

3.2.- DESARROLLO DEL NÚCLEO ESTRIADO

Los dos compartimentos del núcleo estriado, la matriz y los estriosomas, se generan a partir de dos ondas de neurogénesis empezando a E12 en la rata. Las células generadas hasta E17 formarán el compartimento estriosomal, mientras que la segunda onda de neurogénesis, a partir de E18 hasta el inicio del periodo postnatal, dará lugar a las células de la matriz (van der Kooy y Fishell, 1987). La génesis de las neuronas que forman los estriosomas coincide con la llegada de las primeras proyecciones dopaminérgicas de la sustancia negra a E14. A E19 estas fibras se agrupan en islotes (Moon y Herkenham, 1984) marcando claramente el compartimento de los estriosomas del núcleo estriado en desarrollo. Los estriosomas también expresan DARPP-32 (Ouimet y col., 1992) y sustancia P, mientras que las neuronas medianas espinosas del compartimento de la matriz, expresan preferentemente encefalina y calbindina (Gerfen, 1992), y se desarrollan en una etapa más tardía e independiente de la invasión dopaminérgica. Por lo que se refiere a las interneuronas, las neuronas colinérgicas son las primeras en desarrollarse, y posteriormente lo hacen las GABAérgicas (Anderson y col., 1997). Los genes responsables del desarrollo de estos dos compartimentos son aún bastante desconocidos, aunque se han identificado varios candidatos, como *mash1*

(Casarosa y col., 1999), o genes *dlx* (Anderson y col., 1997), y también la proteína reelina (Nishikawa y col., 1999).

El desarrollo del núcleo estriado no termina a nivel embrionario, sino que la formación de conexiones, el establecimiento de circuitos y la maduración de las vías se produce en las primeras etapas de la edad postnatal. La vía nigroestriatal es la más temprana; los terminales dopaminérgicos llegan al núcleo estriado en edad embrionaria y forman agrupaciones alrededor de E19-E20 (Moon y Herkenham, 1984; Voorn y col., 1988). Uno o dos días después, los receptores de opiáceos también se agrupan, al igual que las células ricas en receptores D1 para la dopamina y en receptores muscarínicos para la acetilcolina (Moon y Herkenham, 1984; Murrin y Zeng, 1989; Nastuk y Graybiel, 1995). Aunque los terminales dopaminérgicos procedentes de la sustancia negra llegan al núcleo estriado durante el desarrollo embrionario, la principal innervación tiene lugar durante la primera semana postnatal (Voorn y col., 1988). El período de muerte neuronal natural acaba a finales de la primera semana postnatal tanto para la matriz como para los estriomas (Fishell y Van der Kooy, 1991), así las neuronas que se forman primero, a E13, son mayoritariamente las primeras en formar proyecciones hacia la sustancia negra y las que sobrevivirán, preferentemente, al período de muerte natural. Las terminaciones axónicas primitivas de la vía corticoestriatal no se forman hasta P2, y su desarrollo sigue hasta P7; su maduración pero, sigue hasta las tres primeras semanas de vida, y la vía no se considera totalmente formada hasta el final del primer mes postnatal (Sharpe y Tepper, 1998).

3.2.1.- Expresión de los factores tróficos durante el desarrollo de los circuitos estriatales

Los factores tróficos son imprescindibles para el desarrollo y la organización del núcleo estriado y sus conexiones con otros núcleos. Sus diferentes picos de expresión se han relacionado con procesos de diferenciación celular.

- Neurotrofinas: Se han detectado niveles elevados de ARNm de NGF en el núcleo estriado entre P2 y hasta P30 (Mobley y col., 1989), y el incremento de los niveles de proteína de esta neurotrofina coincide con la diferenciación colinérgica (Mobley y col., 1989; Pérez-Navarro y Alberch, 1995). El NGF también se detecta en la corteza cerebral, con picos de expresión de ARNm entre P10 y P30 (Large y col., 1986).

Mediante técnicas de Northern blot (Hofer y col., 1990) o ensayos de riboprotección (Canals y col., 1998; Checa y col., 2000) se ha detectado BDNF en el núcleo estriado. Se ha demostrado que hay un pico en los niveles de ARNm de BDNF en la tercera semana postnatal (Checa y col., 2000). En la edad adulta se ha detectado BDNF mediante ELISA (Yurek y Fletcher-Turner, 2001), aunque se ha observado que los niveles de BDNF disminuyen casi a la mitad en ratas con edades avanzadas (Kato-Semba y col., 1998). Además del núcleo estriado, el BDNF también se expresa en las áreas que conectan con él. Los niveles de ARNm en la corteza cerebral alcanzan su máxima expresión a P21 (Checa y col., 2000). En la sustancia negra el nivel máximo de expresión se da a P7, y después del primer mes disminuye progresivamente hasta los niveles de la edad adulta (Friedman y col., 1991; Checa y col., 2000). La expresión de NT-3 durante el desarrollo está regulada de manera diferente en el núcleo estriado y las áreas con las que conecta. Los niveles de ARNm en el núcleo estriado se mantienen constantes durante el desarrollo postnatal, mientras que en la corteza y en la sustancia negra se produce una disminución y un aumento, respectivamente (Checa y col., 2000). En el adulto, también se detecta NT-3 en todas estas zonas (Hohn y col., 1990; Canals y col., 1998; Checa y col., 2000). Por lo que se refiere a la NT-4/5, es difícil estudiarla porque se expresa a niveles mucho más bajos que las otras neurotrofinas (Ibañez, 1996). Mediante ensayos de riboprotección se ha demostrado que se expresa en el cerebro durante el desarrollo embrionario y a niveles más elevados durante la etapa postnatal (Timmusk y col., 1993).

La maduración de los circuitos estriatales viene determinada no sólo por la expresión de los factores tróficos, sino también por la de sus receptores. Los receptores de las neurotrofinas se han detectado tanto en el núcleo estriado como en sus zonas aferentes y eferentes. El receptor común $p75^{NTR}$ se expresa en el núcleo estriado durante el desarrollo (Mobley y col., 1989; Koh y Higgins, 1991) y en el adulto prácticamente no se detecta (Holtzman y col., 1992). Los niveles de TrkA incrementan en el núcleo estriado durante el desarrollo postnatal, alcanzando su máxima expresión en la segunda semana postnatal y manteniéndose hasta la etapa adulta (Ringstedt y col., 1993). En cambio, la expresión de este receptor no se detecta ni en la corteza cerebral ni en la sustancia negra (Barbacid, 1994). Respecto a la expresión de TrkB, éste aumenta durante el desarrollo embrionario del núcleo estriado hasta E20 y disminuye en la etapa postnatal (Jung y Bennett, 1996). A nivel de la corteza cerebral, el ARNm del TrkB

presenta su máxima expresión a E20 en el córtex cingulado y a P1 en el córtex parietal (Jung y Bennett, 1996). Sin embargo, TrkB truncado adquiere sus niveles máximos en el adulto (Checa y col., 2001). Las neuronas de la sustancia negra *pars compacta* expresan niveles altos de TrkB, a diferencia de las de la *pars reticulata* (Merlio y col., 1992; Yan y col., 1997; Checa y col., 2001). Por último, la expresión de TrkC se detecta ya a E16 en el primordio estriatal (Jung y Bennett, 1996) alcanzando su máxima expresión desde E18 hasta P7, cuando disminuye adquiriendo los niveles adultos (Jung y Bennett, 1996; Checa y col., 2001). En la corteza cerebral, el pico de expresión de TrkC se detecta desde E20 hasta las primeras etapas postnatales (Jung y Bennett, 1996; Checa y col., 2001), y en la sustancia negra se observa una disminución leve en la primera semana postnatal (Checa y col., 2001).

- Familia del GDNF: El GDNF se detecta tanto en el núcleo estriado como en la corteza cerebral y la sustancia negra, aunque con diferentes patrones de expresión. Durante el desarrollo embrionario, la primera zona cerebral donde se detecta GDNF es en la corteza, a E14, y posteriormente a E16 en el núcleo estriado. En este último, la expresión de GDNF varía a lo largo del desarrollo postnatal, con un pico de expresión a P2 y otro a P14 (Oo y col., 2005). En cambio este factor trófico no se detecta en la sustancia negra durante el desarrollo (Nosrat y col., 1996; Golden y col., 1999). Sin embargo, la neurturina sí se detecta ya a nivel embrionario (Horger y col., 1998; Golden y col., 1999) y se mantiene a niveles moderados durante la etapa postnatal hasta la edad adulta (Horger y col., 1998; Naveilhan y col., 1998; Akerud y col., 1999). La expresión de neurturina se detecta en el núcleo estriado a P0 y se mantienen los mismos niveles hasta la edad adulta (Horger y col., 1998; Naveilhan y col., 1998; Akerud y col., 1999; Marco y col., 2002a). En cambio en la corteza cerebral se empieza a detectar a E14 con niveles bajos de expresión, a P15 presenta los niveles máximos y después disminuye hasta niveles adultos (Holm y col., 2002). La expresión de artemina no se detecta durante el desarrollo embrionario del SNC de rata, pero sí en el núcleo estriado y la sustancia negra de cerebro humano (feto y adulto; Baloh y col., 1998a). Finalmente, mediante RT-PCR (del inglés, *reverse transcriptase-PCR*), se ha demostrado la existencia de niveles moderados de persefina en el núcleo estriado, mesencéfalo y corteza cerebral a P0 (Jaszai y col., 1998). Tanto en el mesencéfalo como en el núcleo estriado se empieza a detectar ya a E15, aunque el pico máximo de expresión es diferente, a E19 y a P0, respectivamente (Akerud y col., 2002).

Respecto a los receptores de la familia del GDNF, Ret y GFR α 1 se expresan en la etapa adulta en la sustancia negra y en el núcleo estriado pero no en la corteza cerebral (Nosrat y col., 1997; Widenfalk y col., 1997; Glazner y col., 1998; Burazin y Gundlach, 1999; Pérez-Navarro y col., 1999; Marco y col., 2002a). Durante el desarrollo del núcleo estriado, aunque los niveles de GFR α 1 son muy bajos se pueden detectar por hibridación *in situ* (Nosrat y col., 1997; Widenfalk y col., 1997; Golden y col., 1999). Las neuronas estriatales de proyección expresan niveles máximos de GFR α 1 entre P10 y P14 (Cho y col., 2004). En la sustancia negra *pars compacta* y en el área tegmental ventral se detectan niveles altos de GFR α 1 durante el desarrollo embrionario y postnatal, hasta el adulto (Nosrat y col., 1997; Glazner y col., 1998; Horger y col., 1998; Yu y col., 1998; Burazin y Gundlach, 1999; Golden y col., 1999; Marco y col., 2002b). El GFR α 2 se expresa a niveles bajos en el núcleo estriado (Naveilhan y col., 1998; Marco y col., 2002a). El ARNm de GFR α 2 también se ha detectado en el mesencéfalo ventral durante el desarrollo embrionario hasta la edad adulta (Widenfalk y col., 1997; Horger y col., 1998; Burazin y Gundlach, 1999; Golden y col., 1999; Marco y col., 2002b), así como en la corteza cerebral (Widenfalk y col., 1997; Wang y col., 1998; Burazin y Gundlach, 1999; Golden y col., 1999). El GFR α 3 se ha detectado en el cerebro de ratón durante su desarrollo embrionario, mediante ensayo de riboprotección (Naveilhan y col., 1998), y el GFR α 4 se ha detectado también durante el desarrollo embrionario así como en el adulto (Massure y col., 2000).

-Familia de las BMP: Cada vez se conoce más acerca de la función de las BMP durante el desarrollo del SNC. Se ha observado la expresión de diversas BMP y de sus receptores en varias regiones del cerebro durante el desarrollo, con un patrón de expresión tiempo-espacio muy complejo (Graham y col., 1994; Schluesener y Meyermann, 1994; Mehler y Kessler, 1994; Tomizawa y col., 1995; Gross y col., 1996; Soderstrom y col., 1996; Charytoniuk y col., 2000). Concretamente, la BMP-2 presenta un pico de expresión a E16 en la corteza cerebral así como en el núcleo estriado, aunque en este último también se detecta a P4 (Mehler y col., 1997; Hattori y col., 1999). El pico máximo de expresión de BMP-4 en ambos núcleos se encuentra a P4 y el de la BMP-6 a E18 en el núcleo estriado y a P1 en la corteza cerebral. Tanto la BMP-5 como la BMP-7 en el núcleo estriado se detectan en el adulto, y por el contrario, en la corteza cerebral la BMP-5 se detecta a E18 y también en edad adulta, mientras que la BMP-7 alcanza el pico de expresión a P1 (Mehler y col., 1997).

Respecto las diferentes subunidades de receptores para las BMP, se ha localizado BMPR-IA, BMPR-IB y BMPR-II a E16 en el núcleo estriado (Hattori y col., 1999). En la corteza cerebral también se han detectado las tres subunidades, aunque la BMPR-II se expresa de manera preferencial en la etapa adulta (Soderstrom y col., 1996). Ensayos de riboprotección han demostrado que la expresión de las distintas subunidades del receptor es mayor durante el desarrollo embrionario, y que disminuye durante la etapa postnatal (Soderstrom y col., 1996).

3.3.- LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

El núcleo estriado es el área cerebral más afectada en la enfermedad de Huntington. Esta enfermedad neurodegenerativa es de origen genético y se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas estriatales aunque en etapas más avanzadas también se halla afectada la corteza cerebral. A nivel funcional, la pérdida de las neuronas del núcleo estriado produce disfunciones motoras, mientras que la atrofia de las neuronas corticales sería la responsable de la pérdida cognitiva observada en los enfermos de Huntington (Martin y Gusella, 1986; Ross, 2002). Las neuronas de proyección del núcleo estriado están severamente afectadas (Reiner y col., 1988; Richfield y col., 1995), y en menor grado las interneuronas (Dawbarn y col., 1985; Ferrante y col., 1985; Cicchetti y col., 2000). Las dos subpoblaciones de neuronas de proyección no están afectadas por igual, así, las que proyectan al globo pálido externo son las que primero degeneran (Reiner y col., 1988), y posteriormente, las que proyectan al globo pálido interno y a la sustancia negra *pars reticulata* (Richfield y col., 1995). En estadios avanzados de la enfermedad, se produce una degeneración cortical que se caracteriza por la atrofia de las neuronas piramidales de la capa III, V y VI de la corteza motora y asociativa (Cudkowicz y Kowall, 1990; Difiglia y col., 1997; MacDonald y Halliday, 2002).

La enfermedad de Huntington está causada por la expansión del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) en el gen que codifica para la huntingtina, localizado en el brazo corto del cromosoma 4, traducéndose en una repetición de poliglutaminas (polyQ) en el extremo N-terminal de la proteína (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). En individuos normales el gen presenta entre 9-34 repeticiones del triplete CAG, mientras que cuando el número de repeticiones es mayor a 35, el gen codifica para una forma mutada de la huntingtina que da lugar a la

enfermedad (Petersen y Brundin, 1999; McMurray, 2001; Alberch y col., 2004). La proteína y el ARNm de la huntingtina son ubicuos, pues están ampliamente distribuidos en todos los tejidos (Landwehrmeyer y col., 1995; Sharp y col., 1995; Bhide y col., 1996). Sin embargo, el núcleo estriado no se caracteriza por ser una zona donde la huntingtina se exprese en grandes cantidades, ya que contiene menos proteína que otras partes del cerebro (Landwehrmeyer y col., 1995). Actualmente todavía no se conoce con exactitud la función que desempeña la huntingtina normal, aunque se sabe que tiene un papel importantísimo en el desarrollo, ya que los ratones KO para esta proteína mueren antes de E7.5 (Duyao y col., 1995; Nasir y col., 1995). Además, también se ha descrito que es esencial para la hematopoyesis y la neurogénesis (White y col., 1997; Metzler y col., 2000). A la huntingtina se le han atribuido distintas funciones, como es su (1) papel anti-apoptótico, actuando a un nivel inferior de las proteínas pro-apoptóticas de la familia de la Bcl-2 y a un nivel superior de la activación de la caspasa-3 (Rigamonti y col., 2000), o bien interaccionando con diferentes proteínas que bloquean la apoptosis inducida por la caspasa 8 (Gervais y col., 2002). Además, la sobre-expresión de huntingtina protege frente a una privación de suero o a un tratamiento con la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP; Rigamonti y col., 2001). La huntingtina se puede encontrar en el citoplasma, y puede actuar como (2) reguladora de la endocitosis asociándose con varias estructuras vesiculares (DiFiglia y col., 1995; Gutekunst y col., 1995; Velier y col., 1998; Metzler y col., 2001), así como participar en el transporte de orgánulos dependiente de microtúbulos y el reciclaje de la membrana plasmática (Li y col., 1998; Engqvist-Goldstein y col., 1999; Singaraja y col., 2002; Gauthier y col., 2004). Sin embargo, la huntingtina también puede localizarse en el núcleo (De Rooij y col., 1996; Kegel y col., 2002) y (3) regular factores de transcripción, como por ejemplo los que controlan la expresión de BDNF (Zuccato y col., 2001, 2003). Además de la huntingtina mutada, pueden estar implicados otros mecanismos que participan en la severidad e inicio de la enfermedad, como son la excitotoxicidad, una alteración del metabolismo energético o bien una deficiencia de factores tróficos (Alberch y col., 2004).

3.3.1.- Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington

- Excitotoxicidad: El núcleo estriado recibe un elevado número de proyecciones glutamatérgicas excitadoras principalmente de la corteza cerebral (Calabresi y col.,

1996). Además de la función fisiológica que ejerce en la transmisión sináptica, la hiperactividad de los receptores del glutamato puede mediar la muerte celular por excitotoxicidad (Choi, 1988) debida a una excesiva entrada de calcio. El glutamato puede ejercer su acción a través de varios receptores, (1) los ionotrópicos, que están ligados a canales iónicos, y que se dividen en NMDA, AMPA y kainato; y (2) los metabotrópicos, los cuales están unidos a un sistema de segundo mensajero vía proteínas G (Hollmann y Heinemann, 1994). En principio, los receptores ionotrópicos son los que dan lugar a los efectos neurotóxicos más pronunciados, aunque los metabotrópicos podrían también contribuir a dicho efecto. La expresión de los receptores glutamatérgicos en el núcleo estriado ha sido caracterizada tanto durante el desarrollo (Wenzel y col., 1997) como en el adulto (Standaert y col., 1996), y diferentes subunidades de receptores, así como distintas combinaciones de ellas, han sido caracterizadas en las diferentes subpoblaciones estriatales (Landwehrmeyer y col., 1995; Chen y Reiner, 1996; Bernard y col., 1997; Gotz y col., 1997). El descubrimiento de que las inyecciones intraestriatales de KA (Coyle y Schwarcz, 1976) o de un agonista del receptor NMDA del glutamato, el ácido quinolínico (QUIN; Beal y col., 1986) eran capaces de reproducir en ratas la misma degeneración estriatal característica de la enfermedad de Huntington hizo posible disponer de un modelo animal de la enfermedad para su experimentación.

Estudios recientes han demostrado que los genes que codifican para las distintas subunidades de los receptores NMDA, concretamente la NR2A y la NR2B, pueden influir en la variabilidad del inicio de la enfermedad (Arning y col., 2005). Además, las neuronas estriatales *in vitro* presentan mayor sensibilidad que las neuronas del hipocampo frente a la excitotoxicidad inducida por dosis agudas de glutamato o de NMDA, debido a la menor expresión de ciertos transportadores del glutamato (Brustovetsky y col., 2004). El uso de diferentes modelos de ratones transgénicos de la enfermedad ha permitido también relacionar la mutación de la huntingtina con la excitotoxicidad (Gines y col., 2003; Li y col., 2004; Zeron y col., 2002, 2004).

- Disminución del metabolismo energético: La administración crónica de animales con 3-NP, una toxina que inhibe de manera irreversible la enzima succinato deshidrogenasa, integrante del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, causa la degeneración selectiva de las neuronas GABAérgicas de proyección (Beal y col.,

1993; Brouillet y col., 1995; Guyot y col., 1997). Además, se han observado disfunciones locomotoras tales como corea, distonia y disquinesia en monos lesionados con el 3-NP (Brouillet y col., 1995; Palfi y col., 1996). Debido a la similitud tanto a nivel histológico como patológico entre el modelo animal de 3-NP y la enfermedad de Huntington, se propuso como un modelo alternativo de esta enfermedad (Beal y col., 1993; Koutouzis y col., 1994).

En relación a la muerte y a la alteración mitocondrial que produce esta toxina, se ha demostrado que una anomalía del metabolismo energético puede contribuir a la degeneración neuronal específica observada en la enfermedad de Huntington (Beal, 2000). Así pues se ha observado que se produce un déficit mitocondrial debido a (1) concentraciones anormales de metabolitos energéticos (Koroshetz y col., 1997; Lodi y col., 2000), (2) deficiencias en la actividad del complejo II/III mitocondrial del núcleo estriado, y también a una pequeña disminución del IV (Butterworth y col., 1985; Browne y col., 1997; Tabrizi y col., 1999), (3) incremento del estrés debido a la despolarización mitocondrial (Sawa y col., 1999; Panov y col., 2002), y (4) aumento de la producción de radicales libres asociados al daño oxidativo (Butterworth y col., 1985; Browne y col., 1997).

El mecanismo a través del cual el 3-NP produce selectivamente la degeneración de las neuronas estriatales no se conoce en profundidad, aunque la toxicidad del 3-NP parece implicar dos mecanismos, uno necrótico dependiente de la activación excesiva de los receptores NMDA del glutamato y uno apoptótico, más lento, independiente de la activación de estos receptores (Pang y Geddes, 1997). Recientemente se están realizando varios estudios intentando analizar qué proteínas de señalización intracelular de procesos de muerte están implicadas en la apoptosis inducida por el 3-NP (Andreassen y col., 2000; Vis y col., 2001; Garcia y col., 2002; Bizat y col., 2003a, b).

- Ratones transgénicos para la huntingtina: La identificación del gen responsable de la enfermedad de Huntington ha facilitado la generación de modelos animales con mutaciones específicas en dicho gen. Una ventaja de estos modelos animales es que permiten la manifestación temprana de la mutación, y por tanto, se puede estudiar la progresión de la enfermedad. Se han construido varios modelos genéticos que reproducen de distinta manera la enfermedad, entre los que se encuentran los ratones transgénicos y los ratones *knock-in*. Actualmente existen varios modelos de ratones

transgénicos (Hickey y Chesselet, 2003), por ejemplo, los que expresan el exón 1 del gen de la huntingtina humana con 115 (R6/1) o 145 (R6/2) repeticiones CAG (Mangiarini y col., 1996), o bien otro modelo que expresa un cromosoma artificial de levadura que contiene el gen de la huntingtina entero con 72 repeticiones CAG (YAC72; Hodgson y col., 1999), desarrollando ambos modelos una patología neurológica progresiva. Existe también un modelo transgénico condicional regulado por un sistema *tet* (Yamamoto y col., 2000). Por último, los ratones *knock-in* tienen insertado el gen humano de la huntingtina mutada con distintas repeticiones CAG, y se ha observado que presentan anomalías en el comportamiento motor antes de cualquier neuropatología detectable (Menalled y col., 2002).

3.4.- NEUROPROTECCIÓN POR FACTORES TRÓFICOS

Los factores tróficos han demostrado ser buenos agentes neuroprotectores ante las lesiones que afectan a las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y a las neuronas GABAérgicas estriatales. La regulación de la actividad trófica es un mecanismo neuroprotector que se da después de un estímulo excitotóxico, entre otros (Lindvall y col., 1994; Alexi y col., 2000). Los diferentes factores tróficos y sus ligandos se expresan de manera distinta en las subpoblaciones estriatales, lo que sugiere que puede haber una respuesta trófica concreta para diferentes estímulos.

Tras una lesión excitotóxica inducida por la inyección intraestriatal de agonistas del receptor del glutamato, las neurotrofinas BDNF, NT-3 y NGF, y sus respectivos receptores están regulados de manera diferencial (Canals y col., 1998, 1999). Además, se ha descrito también que existe una regulación trófica transneuronal en la corteza y en la sustancia negra después de una lesión excitotóxica en el núcleo estriado (Aliaga y col., 2000; Canals y col., 2001; Canudas y col., 2005). Aparte de las neurotrofinas, la expresión de algunos miembros de la familia del GDNF como el GDNF y la neurturina, y sus receptores específicos, también se regula después de una lesión excitotóxica (Bresjanac y Antauer, 2000; Marco y col., 2002a).

A nivel estriatal, todas las neurotrofinas presentan un efecto neuroprotector tanto de las neuronas GABAérgicas de proyección (Martinez-Serrano y Bjorklund, 1996; Alexi y col., 1997; Araujo y Hilt, 1997; Perez-Navarro y col., 1999a, 2000a) como de las interneuronas (Schumacher y col., 1991; Altar y col., 1992; Davies y Beardsall, 1992; Perez-Navarro y col., 1994; Venero y col., 1994; Alexi y col., 1997; Perez-

Navarro y Alberch, 1995; Araujo y Hilt., 1997; Gratacos y col., 2001c) frente a una lesión excitotóxica inducida por QUIN o KA. El GDNF y la neurturina también neuroprotegen a las neuronas estriatales de proyección e interneuronas frente a una lesión inducida por QUIN (Perez-Navarro y col., 1996, 1999b, 2000b; Marco y col., 2002c), o por KA (Gratacos y col., 2001c). El GDNF también rescata de la muerte a las neuronas estriatales de proyección lesionadas con 3-NP (Araujo y Hilt, 1998). Un estudio reciente realizado en el ratón KO para GFAP revela que éste presenta niveles de GDNF mayores que el animal control, y que estos niveles neuroprotegen a las células estriatales de una lesión con QUIN o bien con 3-NP (Hanbury y col., 2003).

Además, el BDNF protege a las neuronas dopaminérgicas de la muerte inducida por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Spina y col., 1992; Levivier y col., 1995; Shults y col., 1995) y el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP; Frim y col., 1994; Tsukahara y col., 1995). Por otro lado, todos los miembros de la familia del GDNF protegen a las neuronas dopaminérgicas frente a la lesión inducida por la 6-OHDA (Hoffer y col., 1994; Kearns y Gash, 1995; Bowenkamp y col., 1997; Lapchak y col., 1997; Milbrandt y col., 1998; Akerud y col., 1999; Rosenblad y col., 2000; Connor, 2001; Georgievska y col., 2002). El GDNF también evita la degeneración de esta población neuronal inducida por el MPTP (Tomac y col., 1995; Cheng y col., 1998) y por la lesión mecánica (Beck y col., 1995; Tseng y col., 1997).

Respecto a los miembros de la familia de las BMP, también se ha demostrado su capacidad neuroprotectora frente a diversas lesiones, aunque cabe destacar que no hay trabajos de neuroprotección por BMP en el núcleo estriado. Tanto la BMP-6 (Martinez y col., 2001; Wang y col., 2001) como la BMP-7 son capaces de neuroproteger a las neuronas corticales tras una isquemia cerebral en modelos *in vivo* (Perides y col., 1995; Chang y col., 2003) e *in vitro* (Esquenazi y col., 2002; Cox y col., 2004). Además, la BMP-7 es capaz de neuroproteger a las células de la sustancia negra tras la inyección de 6-OHDA en el núcleo estriado o en la sustancia negra (Zuch y col., 2004; Harvey y col., 2004). Contrariamente, en otro trabajo realizado en cultivos de mesencéfalo no observan ninguna protección por parte de la BMP-5, BMP-6 y BMP-7 ante el estrés oxidativo que produce la 6-OHDA (Brederlau y col., 2002). Por último, se ha observado que el pretratamiento de células mesencefálicas con la BMP-2 incrementa la supervivencia y la integración funcional del trasplante en el núcleo estriado lesionado previamente con 6-OHDA (Espejo y col., 1999).