

# Búsqueda de agonistas de PPAR $\gamma$ para el tratamiento de la enfermedad de Huntington

Silvia Calvo Serrano<sup>a</sup>, Daniel Gutiérrez Tejedor<sup>b</sup>, Lorena Peracho Benito<sup>c</sup>,  
Laura Ramos Hernández<sup>d</sup>, Belén Sánchez Gómez<sup>e</sup>, Rebeca Sandoica Expósito<sup>f</sup>

Máster en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular, Investigación y Desarrollo. Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá. 28871, Alcalá de Henares, Madrid. España.

a. silcalser@gmail.com b. danielgutierreztejedor@gmail.com c. lorenaperacho95@gmail.com  
d. laura.lrhz@gmail.com e. belensg.88@gmail.com f. rebecca.sandoica@gmail.com

**Palabras clave:** enfermedad de Huntington; huntingtina; PPAR $\gamma$ ; diana terapéutica; ensayos HTS

## Resumen

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza por un deterioro neurológico progresivo. Es uno de los trastornos hereditarios monogénicos más comunes en países occidentales, y el tiempo de supervivencia medio es de 15-20 años tras la manifestación de los primeros síntomas [1]. Actualmente no se ha desarrollado ningún fármaco que permita la remisión de la enfermedad, solo existen tratamientos paliativos. La fisiopatología de esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de más de 35 repeticiones de trinucleótidos CAG (cola poliQ) en el gen que codifica para la proteína huntingtina (Htt). La presencia de Htt mutada da lugar a la acumulación de agregados intracelulares tóxicos y a la alteración de diferentes procesos celulares: desregulación de la expresión génica, alteración de la degradación y el plegamiento de proteínas, interrupción de la señalización sináptica y alteración del metabolismo energético, donde tiene un papel importante el receptor nuclear PPAR $\gamma$  [2]. En base a estos procesos, sugerimos dos dianas moleculares que aparecen principalmente alteradas en EH: Htt y PPAR $\gamma$ . Existen fármacos antidiabéticos agonistas de PPAR $\gamma$  que han demostrado efectos neuroprotectores en modelos experimentales de EH, como la Rosiglitazona, retirado por cardiotoxicidad [3]. Por tanto, proponemos iniciar una búsqueda de agonistas de PPAR $\gamma$  mediante la obtención de una colección de nuevas moléculas y la síntesis de compuestos derivados de la Rosiglitazona, con el fin de disminuir su cardiotoxicidad. Estas moléculas se someterían a un cribado de alto rendimiento mediante dos ensayos in vitro: uno de activación de PPAR $\gamma$ , y otro de paso de barrera hematoencefálica. Por último, habría que realizar ensayos preclínicos adicionales para determinar la eficacia y los posibles efectos secundarios de los fármacos seleccionados.

**Cita:** Calvo Serrano, Silvia; Gutiérrez Tejedor, Daniel; Peracho Benito, Lorena; Ramos Hernández, Laura; Sánchez Gómez, Belén; Sandoica Expósito, Rebeca (2018) Búsqueda de agonistas de PPAR $\gamma$  para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. *dianas* 7 (1): e201803c11fp. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e201803c11fp](http://journal.dianas.e201803c11fp). URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** ©2018 Calvo-Serrano S, Gutiérrez-Tejedor D, Peracho-Benito L, Ramos-Hernández L, Sánchez-Gómez B, Sandoica-Expósito R. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad autosómica dominante y se caracteriza por un deterioro neurológico progresivo con trastornos motores, cognitivos y psiquiátricos asociados [1]. Aunque la EH se considera una enfermedad rara, es uno de los trastornos hereditarios monogénicos más comunes. Se estima que afecta a 5 - 7 de cada 100.000 personas en países europeos occidentales, aunque la prevalencia es menor en otros países orientales y grupos raciales. La enfermedad afecta a hombres y mujeres por igual. Además, cabe destacar que la sintomatología no se manifiesta hasta los 30 - 45 años de edad [2] y que el tiempo de supervivencia medio de los pacientes es de 15 - 20 años tras la manifestación de los primeros síntomas [3].

El diagnóstico clínico de la EH es complicado. Normalmente se lleva a cabo un análisis genético para determinar si el paciente porta el gen mutado y, con ello, la predisposición de individuos asintomáticos a padecer dicha enfermedad. Sin embargo; la naturaleza inestable de la mutación, la falta de tratamientos efectivos, la edad media de inicio de la enfermedad y la existencia de trastornos con la misma presentación clínica, pero diferente etiología, complican las pruebas diagnósticas [2].

En función de la sintomatología, la EH se puede dividir en varias etapas. La etapa inicial se caracteriza por fallos sutiles en la coordinación, trastornos motores leves y cambios en la personalidad y humor. La etapa intermedia comprende trastornos motores que causan trastornos funcionales. En estadios avanzados de la enfermedad, la corea empeora, afectando al equilibrio y movimientos voluntarios [4]. No obstante, en cualquiera de las etapas, la sintomatología puede agravarse por la pérdida de peso y de músculo

esquelético que suelen sufrir estos pacientes. Esta pérdida de peso puede llegar a ser una complicación importante que debe ser contrarrestada mediante el ajuste de la dieta [5].

En este trabajo se destacan los recientes avances en la investigación de la EH, y se proponen nuevos ensayos de búsqueda y selección de compuestos para el tratamiento farmacológico de esta patología.

### Fisiopatología

Tradicionalmente, la EH se ha definido como una condición causada por la neurodegeneración selectiva de los ganglios basales, principalmente en la región del cuerpo estriado, y la corteza cerebral [6], aunque estos procesos patogénicos pueden ocurrir en todo el sistema nervioso central [7].

La EH está causada por la acumulación un determinado número de repeticiones del trinucleótido CAG en el exón 1 del gen IT15, que codifica para la proteína huntingtina (Htt), localizado en el brazo corto del cromosoma 4 [1]. Este gen se expresa abundantemente en el cerebro y su producto resulta necesario para que se completen con normalidad las primeras fases del desarrollo embrionario y el proceso de la neurogénesis, para el tráfico vesicular axonal, la regulación de la expresión génica y la supervivencia celular [8].

Las repeticiones del trinucleótido CAG se traducen a una serie de residuos de glutamina consecutivos dando lugar a un tramo de poliglutamina (poliQ) en el extremo amino de la proteína Htt. En los individuos sanos, el número de repeticiones del trinucleótido CAG es menor de 35, mientras que, si el número de repeticiones es superior a 40 CAG, los individuos desarrollan la enfermedad dentro de la vida humana típica. Por otra parte, si el número de repeticiones oscila entre 36-39 CAG, la penetrancia se reduce pudiendo no manifestarse como una enfermedad clínica [9, 10].

El exceso de poliQ en la huntingtina mutada (mHtt) induce cambios conformacionales en la Htt, formando agregados intracelulares. Se ha demostrado que la activación de las caspasas 3 y 6 promueven la proteólisis del extremo N-terminal de la proteína Htt lo que genera fragmentos tóxicos y la formación de agregados que son resistentes a los procesos normales de recambio proteico, culminando en toxicidad celular y neurodegeneración [11]. La formación de los agregados promueve a la vez la activación de otras proteasas de cisteína como la calpaína, que proteolizan la mHtt aumentando los niveles de agregación. Tras los cortes de estas proteasas se generan dos fragmentos Cp-A y Cp-B, siendo el Cp-A el que migra hacia el núcleo de la célula y forma ahí los agregados nucleares, y el Cp-B permanece en el citoplasma donde forma los agregados citoplasmáticos [12]. Además, los agregados de mHtt extracelulares pueden ser internalizados por las células, lo que plantea la posibilidad de propagación de mHtt entre las células y las regiones durante la progresión de la enfermedad [1].

### Procesos celulares alterados

La presencia de mHtt, que da lugar a la acumulación de agregados intracelulares tóxicos, provoca, en última instancia, la alteración de diferentes procesos celulares. Sin embargo, a pesar de conocer la base genética de la EH, todavía se están dilucidando las vías fisiopatológicas que conducen a la disfunción celular y la pérdida de neuronas.

#### Alteración de la neurotransmisión

La alteración de la actividad neuronal es el principal proceso que conlleva el deterioro cognitivo y físico de los enfermos de EH. La mHtt afecta drásticamente a la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico. El glutamato, principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, es liberado de forma descontrolada en esta patología. De forma fisiológica, la unión de este neurotransmisor con el Receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) en la neurona post-sináptica, es transitoria. Sin embargo, un exceso de glutamato extracelular puede conducir a la estimulación continua de NMDAR. El aumento de actividad de los NMDAR permite la entrada exacerbada de calcio [13].

Además, el glutamato estimula la activación de la vía de la fosfolipasa C (PLC). La PLC participa en la generación de inositol trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El IP $_3$  es soluble y se difunde por el citosol para interactuar con receptores específicos de IP $_3$  (IP $_3$ R) en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Esta interacción causa la liberación de Ca $^{2+}$  al citosol, incrementando su concentración intracelular. La mHtt, interaccionando con los IP $_3$ R, potencia la salida de Ca $^{2+}$  del RE.

La entrada exacerbada de Ca $^{2+}$  vía NMDAR y la salida de Ca $^{2+}$  del RE conducen a la acumulación anómala de Ca $^{2+}$  intracelular (Figura 1A). Este fenómeno, denominado excitotoxicidad, desencadena la activación de caspasas, lo que culmina en la apoptosis neuronal [1, 13].

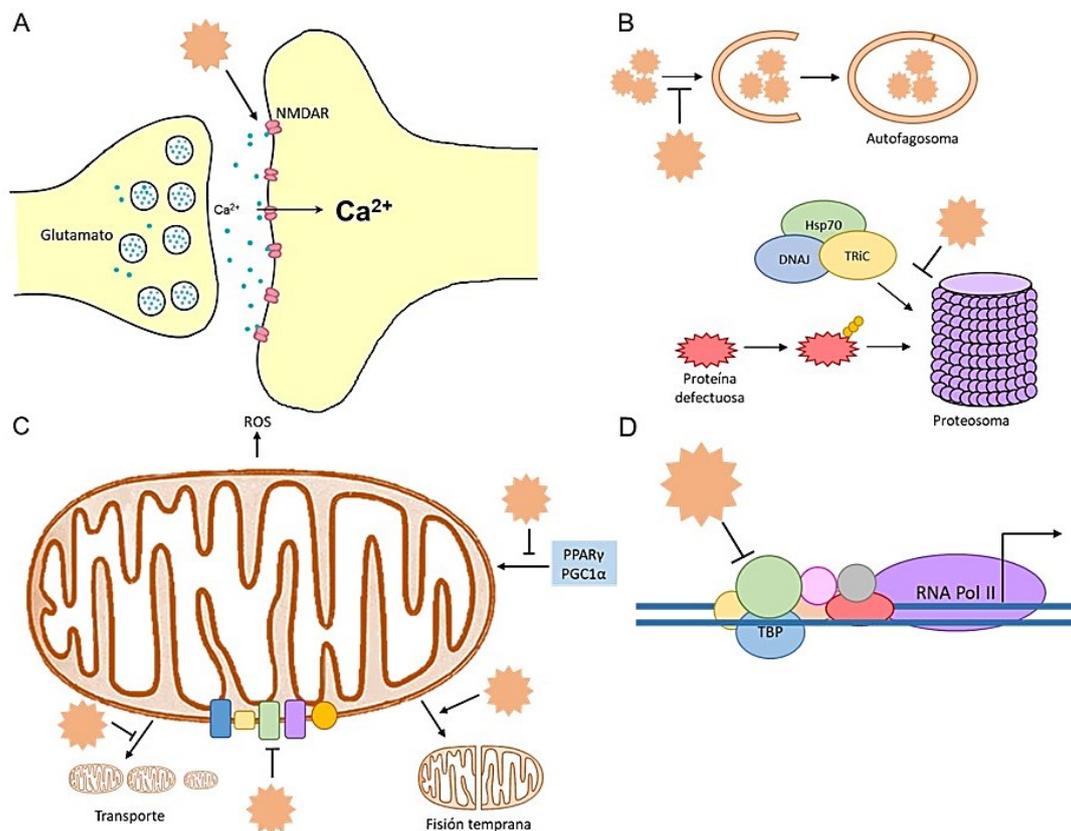


Figura 1.- Procesos celulares alterados en la enfermedad de Huntington (EH). Los agregados de mHtt intracelulares dan lugar a la alteración de diferentes procesos celulares. Representamos de forma simplificada una visión panorámica de las vías patogénicas de la EH, en concreto la alteración de la neurotransmisión (A), la alteración del plegamiento y degradación de las proteínas (B), la desregulación del metabolismo energético (C) y la desregulación transcripcional (D). A pesar de que las representaciones son individuales, realmente la alteración de los procesos es un fenómeno complejo en el que todas las vías están interrelacionadas.

### Alteración del plegamiento y degradación de las proteínas

La función celular está dictada en última instancia por las propiedades funcionales del proteoma, el conjunto de proteínas expresadas en la célula bajo condiciones y etapas de desarrollo específicas. En los últimos años se han estado realizando análisis proteómicos de la red de interacciones proteína-proteína (interactoma) de la mHtt, que han demostrado que múltiples familias de chaperonas como Hsp90, TRiC, Hsp70 y DNAJ están asociadas con mHtt [14]. Estas observaciones sugieren que la sobreexpresión de las vías reguladoras de chaperonas podría suprimir la toxicidad por mHtt, reduciendo la formación de agregados y promoviendo la degradación de mHtt [15].

El sistema ubiquitín proteosoma ha sido recientemente foco de estudios en la EH debido a que los agregados de mHtt se identificaron como ubiquitín-positivos, es decir, que producen una acumulación de cadenas de ubiquitina en el tejido cerebral [16]. Sin embargo, el mecanismo por el cual la mHtt causa la alteración del proteosoma es aún desconocida. Los estudios sugieren que es la desorganización de la red de homeostasis de proteínas, a causa de la mHtt, lo que da lugar a una acumulación de proteínas mal plegadas que sobrecargan el proteosoma (Figura 1B). Debido a que la modificación de proteínas por poliubiquitinación regula muchos procesos celulares esenciales como la degradación proteica, ciclo celular y transcripción, es posible que la acumulación de cadenas de ubiquitina tenga graves consecuencias en la función y supervivencia neuronal [17].

Por otro lado, la mHtt también tiene efectos sobre la autofagia. Mientras que la formación del autofagosoma y la fusión de los lisosomas no parecen verse afectados por la mHtt, la captura del material citoplasmático (carga) por los autofagosomas se ha visto alterada, posiblemente debido a interacciones entre las cadenas de poliubiquitina de las proteínas y mHtt. Las células que presentan una alteración de la autofagia no pueden despejar los agregados, lo que provoca daño y muerte neuronal [18].

### Alteración del metabolismo energético

Los defectos en el metabolismo energético son debidos a la acumulación de mHtt. Esta proteína conduce al deterioro de la cadena de transporte de electrones, lo que da lugar a una disminución en la producción de energía y a un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) [1].

Por otro lado, la mHtt bloquea el tráfico mitocondrial a lo largo de los axones, tanto retrógrado como anterógrado, dando lugar a una desregulación en la homeostasis. Además, la mHtt también es la causante de fenómenos como la fragmentación temprana de las mitocondrias y la incorrecta biogénesis de las mismas (Figura 1C). De hecho, la mHtt reduce los niveles de genes importantes en la regulación de la biogénesis mitocondrial, tales como el receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) y su coactivador 1- $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ). Todos estos procesos promueven el fenotipo de la patología [19-23].

### Alteración transcripcional

La desregulación de la expresión génica es un fenómeno clave en la EH. La mHtt interactúa y desensambla los componentes principales de la maquinaria transcripcional, impidiendo la accesibilidad al promotor y el reclutamiento de la RNA polimerasa II (Figura 1D) [24]. En esta patología, los niveles de expresión de genes implicados en diferenciación neuronal, supervivencia neuronal, neurotransmisión y homeostasis se ven reducidos [25].

En la EH hay una reducción especial de los niveles de expresión de PPAR $\gamma$ . Este dato podría ser interesante de abarcar puesto que PPAR $\gamma$  está implicado en la regulación de genes relacionados con el metabolismo energético. Además, PPAR $\gamma$  no sólo se localiza a nivel cerebral, sino también en tejidos periféricos, lo cual podría explicar la fatiga crónica característica de los enfermos y los modelos murinos que padecen la enfermedad [25].

Por otro lado, en la EH no solo hay una alteración a nivel transcripcional, sino que las alteraciones epigenéticas también están implicadas en la progresión de la enfermedad. Esto tiene como resultado una degeneración de las neuronas. Sin embargo, el mecanismo por el cual la alteración epigenética lleva a una alteración transcripcional no está del todo claro [26].

## Diana terapéutica

A la vista de los procesos celulares alterados y de los tratamientos que existen actualmente para la EH, se proponen como posibles dianas terapéuticas dos moléculas que aparecen implicadas en la patogénesis de la EH. La primera de ellas es la Htt, debido a que la presencia de agregados de mHtt da origen a la alteración de la mayoría de procesos celulares. La segunda es el receptor nuclear PPAR $\gamma$ , que posee un papel neuroprotector importante y que se ve implicado en la disfunción mitocondrial. No obstante; antes de elegir una diana terapéutica, se procede a realizar una breve revisión de los tratamientos actuales y de aquellos en desarrollo para determinar qué molécula candidata es la mejor diana farmacológica para el tratamiento de la EH.

### Tratamientos farmacológicos actuales y en desarrollo

Aunque se trata de una enfermedad monogénica, la EH presenta una fisiopatología compleja. Por este motivo, a día de hoy no se ha desarrollado ningún fármaco que permita la remisión completa o parcial de la enfermedad, sino que tan sólo existen medicamentos paliativos para controlar algunos de los síntomas [10]. Los síntomas motores son tratados mediante la administración de compuestos dirigidos a la señalización por glutamato, como la Amantidina y la Lamotrigina, y a la señalización colinérgica, como la Rivastigmina. Además, también es necesario el tratamiento del deterioro cognitivo para lo que se emplean benzodiazepinas [10].

Actualmente se están investigando como posibles vías de intervención de la enfermedad, entre otras estrategias, la terapia génica dirigida contra la mHtt y el abordaje farmacológico de la disfunción mitocondrial. El abordaje farmacológico frente a la mHtt se hace prácticamente inviable, puesto que el gen que la codifica sufre una pérdida y ganancia de función [27]. Sin embargo, la terapia génica se ha convertido en una alternativa prometedora. Así, varios estudios han demostrado la eficacia y seguridad del tratamiento de la EH mediante silenciamiento génico de mHtt empleando virus adenoasociados (AAV) [27, 28].

Por otro lado, para el tratamiento de la disfunción mitocondrial se ha probado la Rosiglitazona, un compuesto perteneciente al grupo de fármacos de las tiazolidinedionas (TZDs), como agonista específico de PPAR $\gamma$ . Este fármaco ya había sido previamente desarrollado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (DMT2) por sus efectos hipoglucemiantes en diversos tejidos, aunque tuvo que retirarse del mercado debido a los graves problemas de cardiotoxicidad que presentaba en algunos pacientes [10]. Más tarde, ciertos experimentos *in vitro* en células de neuroblastoma de ratón Neuro2a (N2A) han demostrado que la Rosiglitazona provoca una reducción del número de agregados de mHtt y tiene un efecto protector frente a la disfunción mitocondrial [29]. Esto puede deberse a que, según se ha visto en otros estudios [30], la activación de PPAR $\gamma$  por la Rosiglitazona podría estimular la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y prevenir la muerte neuronal debido al estrés oxidativo. Además, ensayos *in vivo* con modelos murinos de la EH, también han dado a conocer que el tratamiento con Rosiglitazona aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  y normaliza la expresión de genes regulados por este

receptor nuclear (incluyendo factores transcripcionales, como PGC-1 $\alpha$ , y distintos genes implicados en la función mitocondrial) [31-33].

### Selección de la diana terapéutica

La mHtt es el principal agente etiológico de la EH y una excelente diana para la terapia génica [27], sin embargo; es inviable de abordar desde un punto de vista farmacológico. Por el contrario, el factor de transcripción PPAR $\gamma$  presenta amplias actividades biológicas que han sido respaldadas por múltiples estudios [30-33], además de haber sido considerado una diana validada desde el punto de vista clínico [10]. Esto hace que PPAR $\gamma$  pueda ser tenido en cuenta como una diana farmacológica válida para la búsqueda y el desarrollo de fármacos para la EH.

## Desarrollo de los ensayos HTS

En primer lugar, se pretende obtener una colección de compuestos mediante el uso de programas de diseño estructural *de novo* y técnicas de síntesis de química médica. A su vez, dado que la Rosiglitazona tiene potente actividad como agonista de PPAR $\gamma$ , se plantea iniciar una síntesis de compuestos derivados de su estructura, con el fin de mejorar algunas de sus propiedades farmacológicas y disminuir la cardiotoxicidad. De esta quimioteca de potenciales agonistas de PPAR $\gamma$  se seleccionarán aquellos compuestos que consigan activar la diana de interés. Para ello, se ha diseñado un ensayo de cribado de fármacos de alto rendimiento, o *high throughput screening* (HTS), *in vitro*.

### Ensayo de activación de PPAR $\gamma$

Para detectar la activación de PPAR $\gamma$ , se plantea un ensayo de bioluminiscencia con un gen reportero. Para la realización de este experimento, se emplearía la línea celular N2A, una línea establecida de neuronas de rápido crecimiento. Estas células serían transfectadas con un vector que contendría los genes de PPAR $\gamma$  (*PPARG*) y del receptor RXR $\alpha$  (*RXRA*) con el que heterodimerizaría [34]. Estos genes se encontrarían regulados por un promotor inducible por ponasterona A (*PonA*). El vector plasmídico también contendría un gen de selección de resistencia a blasticidina (*BSD*) [35], y el gen de la luciferasa (*luc*) de *Photinus pyralis* regulado por un promotor con un elemento de respuesta a PPAR $\gamma$  (*PPRE*) (Figura 2A).

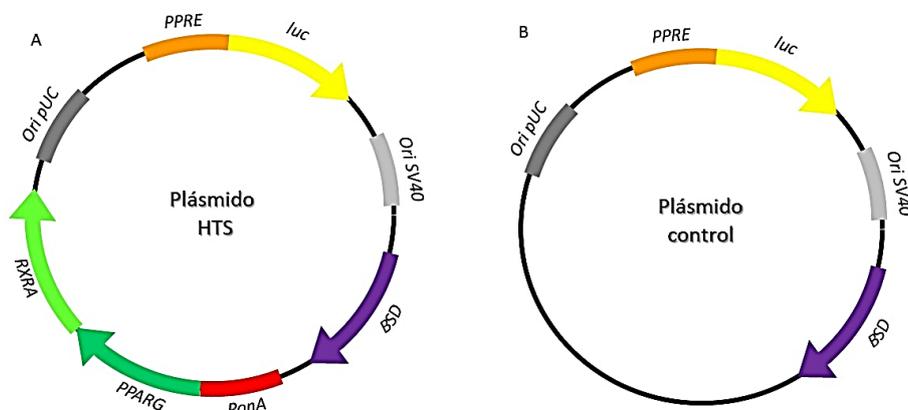


Figura 2.- Vectores plasmídicos empleados en el ensayo HTS de activación de PPAR $\gamma$ . El plásmido HTS (A) contiene un origen de replicación en células de mamífero (*Ori SV40*), un origen de replicación en *E. coli* (*Ori pUC*), un gen de resistencia a blasticidina (*BSD*), el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (*luc*) regulado por un promotor con un elemento de respuesta a PPAR $\gamma$  (*PPRE*), y los genes de PPAR $\gamma$  (*PPARG*) y RXR $\alpha$  (*RXRA*) regulados por un promotor inducible por ponasterona A (*PonA*). El vector control (B) se compone de los mismos elementos, exceptuando los genes *PPARG* y *RXRA*, y el promotor *PonA*.

Una vez que se consigan líneas celulares estables transfectadas con el vector, se procede a cambiarles el medio de cultivo a uno suplementado con D-luciferina, el sustrato de la luciferasa. Después se añadiría PonA, para inducir la expresión de los receptores nucleares PPAR $\gamma$  y RXR $\alpha$ , y cada uno de los compuestos diseñados. De esta forma, si hay un agonista de PPAR $\gamma$  presente en el medio, este podría inducir la expresión de luciferasa. Esta última podría ser detectada y cuantificada mediante una reacción de oxidación de D-luciferina a oxiluciferina, emitiéndose bioluminiscencia (Figura 3).

Como control negativo de transfección, se emplearía un vector plasmídico que contuviera tan sólo el gen *BSD* y el gen *luc* regulado por el promotor con el elemento *PPRE* (Figura 2B). De este modo, se podría determinar si la emisión de luz se debe tan sólo a la activación de PPAR $\gamma$  o también a otros factores. En base a los resultados positivos obtenidos de este ensayo HTS, se seleccionarían aquellos compuestos que fueran agonistas de PPAR $\gamma$  para continuar con los experimentos.

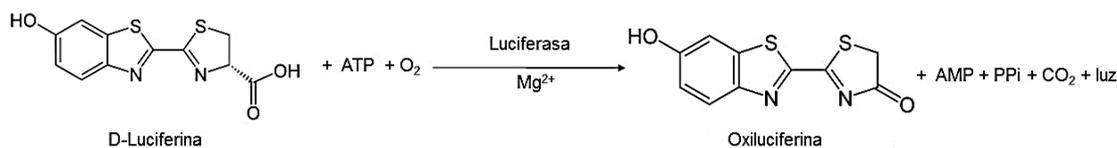


Figura 3.- Reacción de bioluminiscencia catalizada por la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*).

### Cribado y selección de compuestos cabeza de serie

A continuación, basándonos en información de bases de datos y de la estructura molecular de los compuestos seleccionados, se desestimarían aquellos que puedan tener dificultades para atravesar las membranas celulares por su composición hidrofóbica y sus constituyentes, los que sean demasiado promiscuos en su interacción molecular y los que sean demasiado pesados.

Aquellos compuestos que no sean descartados, serían los cabezas de serie, a partir de los cuales se podrían obtener compuestos derivados con distintas propiedades farmacológicas y toxicológicas. Sería necesario examinar cada uno de estos derivados químicos para determinar si tendrían mayor o menor eficacia, potencia, especificidad y toxicidad, y descartar aquellos que no sean interesantes desde un punto de vista farmacológico.

### Ensayo *in vitro* de penetración de la barrera hematoencefálica

Para determinar si los compuestos seleccionados en el ensayo HTS previamente descrito pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) se podría realizar un segundo ensayo *in vitro* previamente validado por otros trabajos [36, 37]. Para la automatización y estandarización de las condiciones experimentales de este ensayo, se emplearían kits comerciales de modelos *in vitro* de BHE (BBB Kit, Pharmaco-cell Company Ltd., Japón) (Figura 4), que consisten en un co-cultivo triple de células endoteliales, pericitos y astrocitos perivasculares (EPA) de rata Wistar, y presentan mayor resistencia eléctrica transendotelial (menor permeabilidad).

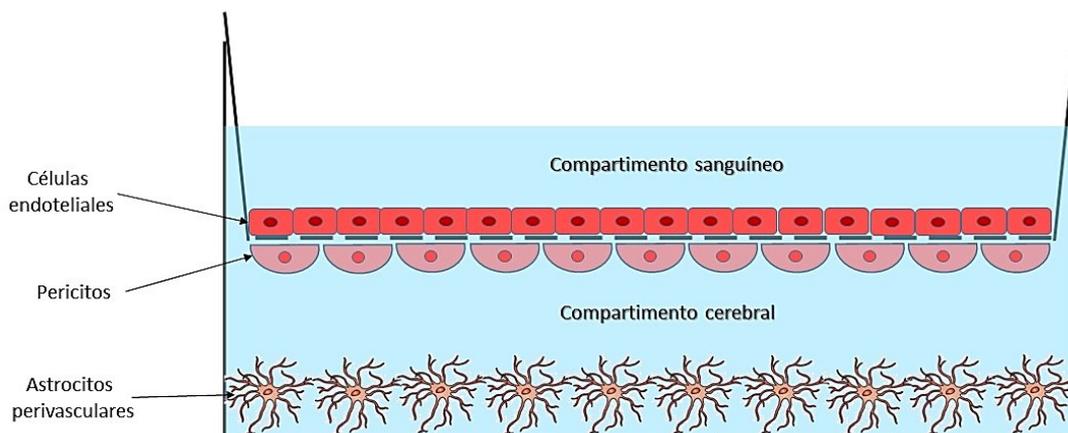


Figura 4.- Modelo *in vitro* tipo EPA que reproduce las características anatómicas y fisiológicas reales de la BHE. Cada pocillo de la placa está estructurado en dos compartimentos, separados por una membrana semipermeable. El lado superior representa el “compartimento sanguíneo”, mientras que el inferior simula el “compartimento cerebral”. Se haría crecer una monocapa de células endoteliales en el lado sanguíneo de la membrana y una monocapa de pericitos en el lado cerebral, mientras que en el fondo del compartimento inferior se haría crecer una monocapa de astrocitos perivasculares.

Así, si se aplica una dosis concreta de cada compuesto en los compartimentos superiores de los pocillos y se deja transcurrir un tiempo determinado, algunos de los fármacos habrían podido atravesar la BHE, mientras que otros no. Para saber cuáles sí atraviesan la BHE, se tomaría una muestra del medio del compartimento inferior, se suministraría al medio de cultivo de las células N2A transfectadas en el ensayo HTS anterior y se analizaría la emisión de luz. La bioluminiscencia, en este caso, implicaría que en la muestra tomada estaría presente el fármaco y que, por lo tanto, este podría atravesar la BHE.

### Perspectivas futuras

Tras obtener una serie de agonistas de PPAR $\gamma$  con capacidad de atravesar la BHE, queda determinar en ellos otros parámetros en ensayos pre-clínicos: eficacia, farmacocinética, farmacodinamia, y toxicidad. En este estudio se realizan una serie de propuestas de posibles ensayos a tener en cuenta para analizar estos aspectos de cada uno de los fármacos durante la fase pre-clínica.

También hay que tener en cuenta que PPAR $\gamma$  no es un receptor nuclear exclusivo de tejido nervioso, sino que se localiza de forma ubicua en todo el organismo. Es por eso que una potenciación de su activación en otros tejidos podría entrañar efectos indeseables para la salud de los voluntarios y pacientes durante los ensayos clínicos o a largo plazo, tras la aprobación y comercialización del medicamento. Por ello, se ha visto conveniente recopilar los efectos secundarios más severos, para poder diseñar y seleccionar los fármacos con objeto de prevenirlos.

### Propuestas para ensayos pre-clínicos

Para determinar la eficacia mediante ensayos *in vitro*, se podrían medir los cambios en los niveles de agregados de mHtt en células N2A tras ser tratadas con distintos fármacos, del mismo modo que se ha hecho en otros trabajos [29]. Para ello, las células se transfectarían con un vector plasmídico que exprese una proteína de fusión Htt-(Q)<sub>109</sub> - GFP. Más tarde, las células transfectadas se tratarían con los agonistas de PPAR $\gamma$  y se analizarían los posibles cambios que afectasen al número y tamaño de agregados de mHtt por microscopía de fluorescencia. Como control negativo del experimento, se realizaría una transfección con un vector que exprese una proteína de fusión Htt-(Q)<sub>25</sub> - GFP ya que, al no tener tantas repeticiones de poliQ, se esperaría que no se formasen agregados.

Otra alternativa a tener en cuenta es medir los niveles de diferentes moléculas que se ven alteradas durante el transcurso de la EH, como pueden ser los niveles de ATP, de Ca<sup>2+</sup> citosólico y mitocondrial, y de ROS, para comprobar de qué manera se ven afectados tras la administración de los diferentes compuestos de interés. Para determinar los niveles de ATP se puede utilizar un ensayo de ATP comercial basado en la actividad luciferina/luciferasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Los niveles de ATP se normalizan en base al contenido de proteína en las muestras [29]. Para determinar los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico y mitocondrial, se realizarían dos ensayos de fluorescencia con una sonda que detectaría los cambios de los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Fluo-3) y otra para determinar la concentración de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (Rhod-2) [38]. Por último, la medición de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares se podría llevar a cabo mediante citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) [39].

Para determinar si los compuestos de interés tienen posibles efectos citotóxicos sobre las líneas celulares se podrían realizar ensayos colorimétricos de viabilidad celular, como el de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo (MTT) y el de medida de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) [29]. Además, los compuestos también deberían someterse a otras pruebas de toxicidad *in vivo*: toxicidad genética, teratogénesis, tumorigénesis, cardiotoxicidad, toxicidad hepática, etc. [40].

Para la realización de los ensayos *in vivo*, existen modelos murinos que reproducen la fisiopatología de la EH (R6/1 y R6/2), y que expresan en el exón 1 del gen humano *HTT* 115 y 150 repeticiones de CAG, respectivamente [41]. Con estos modelos, puede ser conveniente realizar un seguimiento y estudio de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los distintos agonistas seleccionados, realizar pruebas para comprobar si hay mejoría o empeoramiento cognitivo y motor en los modelos animales, y observar si se producen cambios debidos al tratamiento en su histología cerebral.

### Posibles reacciones adversas a los fármacos

Los fármacos agonistas de PPAR $\gamma$ , como aquellos de la familia de las TZDs pueden provocar desde efectos secundarios inocuos hasta reacciones adversas de gravedad. En este caso, se recogerán aquellas de carácter más severo. De entre los efectos adversos esperables se encuentra la obesidad, la retención de líquidos, los problemas cardíacos, la pérdida de masa ósea y la hipoglucemia [42, 43].

La ganancia de peso se atribuye fundamentalmente a la retención de líquidos y a la activación de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo subcutáneo, donde aumenta la captación y el almacenamiento de grasas [39]. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la activación de PPAR $\gamma$  en hipotálamo podría estar directamente implicada en la resistencia a leptina, una adipoquina anorexigénica, lo cual estimularía los procesos de hiperfagia y obesidad [44, 45].

La retención de líquidos viene dada por una reabsorción de agua y sodio alterada en el túbulo colector del riñón [46]. Reducir este efecto podría disminuir el riesgo de sufrir reacciones adversas más severas de tipo cardiovascular, como podría ser la insuficiencia cardíaca. Aun así, hay estudios que demuestran que fármacos como la Rosiglitazona pueden generar cardiotoxicidad por mecanismos independientes a la activación de PPAR $\gamma$ , fundamentalmente por estrés oxidativo [47, 48].

Otro efecto adverso, como consecuencia de la sobreactivación de PPAR $\gamma$ , sería un aumento del riesgo de sufrir fracturas óseas [38], ya que se ha demostrado que PPAR $\gamma$  participa en la inhibición de la diferenciación de osteoblastos y de la formación del hueso [49], mientras que promueve la diferenciación de osteoclastos y la reabsorción ósea [50].

Por último y no menos importante, cabe destacar que las TZDs se han empleado típicamente en el tratamiento de la DMT2, debido a que potencian la sensibilidad a la señalización por insulina en tejidos

como hígado, músculos y tejido adiposo [43]. En pacientes diabéticos no es habitual que experimenten hipoglucemia bajo tratamiento con un antidiabético de este tipo, aunque podría haber alguna pequeña fracción de personas que sí desarrollen hipoglucemia [51]. Sin embargo, en pacientes que no padecen DMT2 es esperable que un fármaco de estas características pueda provocar hipoglucemia con una frecuencia mucho mayor.

## Conclusiones

El receptor nuclear PPAR $\gamma$  puede ser una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la EH, debido a sus efectos neuroprotectores.

Con el objetivo de desarrollar un fármaco que actúe sobre PPAR $\gamma$ , habría que iniciar ensayos HTS como los que se proponen en este trabajo para realizar una búsqueda y selección automatizada de compuestos agonistas. Así mismo, es necesario realizar más estudios para analizar la eficacia farmacológica, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, la toxicidad o las posibles estrategias de administración, con el fin de desarrollar un compuesto que sea seguro y eficaz.

## Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a la Universidad de Alcalá, y en particular, a los profesores del máster en Dianas Terapéuticas en Señalización Celular, por la excelente formación recibida y haber hecho posible la realización de este trabajo. Mención especial merecen Alberto Domingo y Ana Bajo, por su inestimable ayuda y su encomiable labor a la hora de dirigir las líneas de nuestro trabajo en el ámbito de los ensayos HTS. Por último y no menos importante, agradecer a la empresa GlaxoSmithKline y a sus trabajadores por la conferencia “*Drug Discovery and Development*”, que nos inspiró para poder realizar este estudio.

## Bibliografía

1. Labbadia, J. and Morimoto, R.I. 2013. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. on *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8):378-85.
2. Huntington's disease WHO. 2018 (31 enero). World Health Organization. <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#HD>
3. Rubinsztein, D.C. and Carmichael, J. 2003. Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. on *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(20):1-21.
4. Rodríguez Pupo, J. M., Díaz Rojas, Y., Rojas Rodríguez, Y., Rodríguez Batista, Y., and Núñez Arias, E. 2013. Actualización en enfermedad de Huntington. on *Correo Científico Médico*, 17:546-57.
5. Van der Burg, J. M., Bjorkqvist, M. and Brundin, P. 2009. Beyond the brain: Widespread pathology in Huntington's disease. on *Lancet Neurology*, 8(8):765-74.
6. Walker, F.O. 2007. Huntington's disease. on *The Lancet*, 369(9557):218-28
7. Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D. and Richardson, E. P. Jr. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. on *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 44(6):559-77.
8. Schulte, J. and Littleton, J. T. 2011. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. on *Current Trends in Neurology*, 1(5):65-78.
9. Ho, L. W., Carmichael, J., Swartz, J., Wyttenbach, A., Rankin, J. and Rubinsztein, D. C. 2001. The molecular biology of Huntington's disease. on *Psychological Medicine*, 31: 3-14.
10. Dickey, A.S. and La Spada, A.R. 2018. Therapy development in Huntington disease: From current strategies to emerging opportunities. on *American Journal of Medical Genetics*, 176(4):842-61.
11. Li, S. H., Cheng, A. L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H. and Li, X. J. 2002. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. on *Molecular and Cellular Biology*, 22(5):1277-87.
12. Lunkes, A., Lindenberg, K. S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G. B., Mandel, J. L. and Trottier, Y. 2002. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. on *Molecular Cell*, 10(2):259-69.
13. Bezprozvanny, I. and Hayden, M. R. 2004. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. on *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4):1310-17

14. Shirasaki, D. I., Greiner, E. R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boonthueung, P., Geschwind, D. H., Botas, J., Coppola, G., Horvath, S., Loo, J.A. and Yang, X. W. 2012. Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. on *Neuron*, 75(1):41-57.
15. Labbadia, J., Novoselov, S. S., Bett, J. S., Weiss, A., Paganetti, P., Bates, G. P. and Cheetham, M. E. 2012. Suppression of protein aggregation by chaperone modification of high molecular weight complexes. on *Brain*, 135(4):1180-96.
16. Bennett, E. J., Shaler, T. A., Woodman, B., Ryu, K. Y., Zaitseva, T. S., Becker, C. H. and Kopito, R. R. 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. on *Nature*, 448(7154):704-8.
17. Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R. and Hodgson, R. 2017. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. on *Translational neurodegeneration*, 6(1):6.
18. Xie, W. and Zhou, J. 2018. Aberrant regulation of autophagy in mammalian diseases. on *Biology Letters*, 14(1):20170540.
19. Arun, S., Liu, L. and Donmez, G. 2016. Mitochondrial biology and neurological diseases. on *Current Neuropharmacology*, 14(2):143-54.
20. Kumar, A. and Ratan, R. R. 2016. Oxidative stress and Huntington's disease: The good, the bad, and the ugly. on *Journal of Huntington's Disease*, 5(3):217-37.
21. Ostojic, S. M. 2017. Impaired Bioenergetics in Clinical Medicine: A Target to Tackle. on *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 243(4):227-35.
22. Costa, V. and Scorrano, L. 2012. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. on *The EMBO Journal*, 31(8):1853-64.
23. Mochel, F. and Haller, R. G. 2011. Energy deficit in Huntington disease: why it matters. on *The Journal of Clinical Investigation*, 121(2):493-99.
24. Seredenina, T. and Luthi-Carter, R. 2012. What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease?. on *Neurobiology of Disease*, 45(1):83-98.
25. Le Gras, S., Keime, C., Anthony, A., Lotz, C., De Longprez, L., Brouillet, E., Cassel, J.C., Boutillier, A.L. and Merienne, K. 2017. Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature. on *Scientific reports*, 7:42875.
26. Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J. and Tabrizi, S. J. 2015. Huntington disease. on *Nature Reviews Disease Primers*, 1:15005.
27. Southwell, A. L. and Patterson, P. H. 2011. Gene Therapy in Mouse Models of Huntington Disease. on *Neuroscientist*, 17(2):153-62.
28. Samaranch, L., Blits, B., San Sebastian, W., Hadaczek, P., Bringas, J., Sudhakar, V., Macayan, M., Pivrotto, P. J., Petry, H. and Bankiewicz, K. S. 2017. MR-guided parenchymal delivery of adeno-associated viral vector serotype 5 in non-human primate brain. on *Gene Therapy*, 24:253-61.
29. Chiang, M. C., Cheng, Y. C., Nicol, C. J., Lin K. H., Chen, S. J. and Huang, R. N. 2015. Rosiglitazone activation of PPAR $\gamma$ -dependent signaling is neuroprotective in mutant huntingtin expressing cells. on *Experimental Cell Research*, 338(2):183-93.
30. Fuenzalida, K., Quintanilla, R., Ramos, P., Piderit, D., Fuentealba, R.A., Martinez, G., Inestrosa, N.C. and Bronfman, M. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. on *The Journal of Biological Chemistry*, 282(51):37006-15.
31. Jin, J., Alvertz, J., Guo, Z., Peng, Q., Rudow, G., Troncoso, J. C., Ross, C.A and Duan, W. 2013. Neuroprotective effects of PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. on *Journal of Neurochemistry*, 125(3):410-19.
32. Chiang, M. C., Chen, C. M., Lee, M. R., Chen, H. W., Chen, H. M., Wu, Y. S., Hung, C.H., Kang, J.J., Chang, C.P., Chang, C., Wu, Y.R., Tsai, Y.S. and Chern, Y. 2010. Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. on *Human Molecular Genetics*, 19(20):4043-58.
33. Chiang, M.C., Chern, Y. and Huang, R.N. 2012. PPARgamma rescue of the mitochondrial dysfunction in Huntington's disease. on *Neurobiology of Disease*, 45(1):322-28.

34. Chandra, V., Huang, P., Hamuro Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P. and Rastinejad, F. 2008. Structure of the intact PPAR- $\gamma$ -RXR- $\alpha$  nuclear receptor complex on DNA. on *Nature*, 456(7220):350-56.
35. Kimura, M., Takatsuki, A. and Yamaguchi, I. 1994. Blastocidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica acta*, 1219(3):653-59.
36. Deli, M.A., Honda, M., Hayashi, K., Kataoka, Y., Nakagawa, S., Nakao, S., Nakaoke, R., and Niwa, M. 2007. Pericytes from Brain Microvessels Strengthen the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. on *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27(6):687-94.
37. Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, Á., Tanaka, K. and Niwa, M. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. on *Neurochemistry International*, 54(3-4):253-63.
38. Fukumori, R., Takarada, T., Nakazato, R., Fujikawa, K., Kou, M., Hinoi, E., and Yoneda, Y. 2013. Selective Inhibition by Ethanol of Mitochondrial Calcium Influx Mediated by Uncoupling Protein-2 in Relation to N-Methyl-D-Aspartate Cytotoxicity in Cultured Neurons. on *PLoS ONE*, 8(7):e69718. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0069718>
39. Eruslanov, E. and Kusmartsev, S. 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. on *Methods in Molecular Biology*, 594:57-72.
40. Parasuraman, S. 2011. Toxicological screening. on *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2):74-9.
41. Li, J. Y., Popovic, N., and Brundin, P. 2005. The Use of the R6 Transgenic Mouse Models of Huntington's Disease in Attempts to Develop Novel Therapeutic Strategies. on *NeuroRx*, 2(3):447-64.
42. Kung, J. and Henry, R. R. 2012. Thiazolidinedione safety. on *Expert Opinion in Drug Safety*, 11(4):565-79.
43. Cariou, B., Charbonnel, B. and Staels, B. 2012. Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. on *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(5):205-15
44. Ryan, K. K., Li, B., Grayson, B. E., Matter, E. K., Woods, S. C., Seeley, R. J. 2011. A role for central nervous system PPAR- $\gamma$  in the regulation of energy balance. on *Nature Medicine*, 17(5):623-6.
45. Lu, M., Sarruf, D. A., Sharma, S., Li, P., Bandyopadhyay, G., Nalbandian, S., Fan, W., Gayen, J. R., Mahata, S. K., Webster, N. J., Schwartz, M. W. and Olefsky, J. M. 2011. Brain PPAR- $\gamma$  promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. on *Nature Medicine*, 17(5):618-22.
46. Zhang, H., Zhang, A., Kohan, D. E., Nelson, R. D., Gonzalez, F. J. and Yang, T. 2005. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. on *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9406-11.
47. He, H., Tao, H., Xiong, H., Duan, S. Z., McGowan, F. X., Mortensen, R. M. and Balschi, J. A. 2014. Rosiglitazone Causes Cardiotoxicity via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Independent Mitochondrial Oxidative Stress in Mouse Hearts. on *Toxicological Sciences*, 138(2):468-81.
48. Mishra, P., Singh, S. V., Verma, A. K., Srivastava, P., Sultana, S. and Rath, S. K. 2014. Rosiglitazone induces cardiotoxicity by accelerated apoptosis. on *Cardiovascular Toxicology*, 14(2):99-119.
49. Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., Kadowaki, T. and Kawaguchi, H. 2004. PPAR  $\gamma$  insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. on *The Journal of Clinical Investigation*, 113(6):846-855.
50. Wan, Y., Chong, L. W., Evans, R. M., 2007. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. on *Nature Medicine*, 13(12):1496-503.
51. Rizos, C.V., Elisaf, M.S., Mikhailidis, D.P. and Liberopoulos, E.N. 2009. How safe is the use of thiazolidinediones in clinical practice? on *Expert Opinion on Drug Safety*, 8(1):15-32.