

Revisión

Almaguer-Mederos Luis E,¹
Almaguer-Gotay Dennis,¹
Cuello-Almarales Dany,¹
Aguilera-Rodríguez Raúl¹

¹Centro para la Investigación
y Rehabilitación de las Ataxias
Hereditarias (CIRAH), Holguín,
Cuba.

Autofagia en enfermedades poliglutamínicas: Roles e implicaciones terapéuticas

Autophagy in polyglutamine disorders: Roles and therapeutic implications

Resumen

Introducción: Las enfermedades poliglutamínicas constituyen un grupo de afecciones neurodegenerativas aún incurables, causadas por la expansión de repeticiones CAG. En los últimos años se ha demostrado que la autofagia forma parte del proceso fisiopatológico asociado a enfermedades poliglutamínicas.

Objetivos: Revisar los hallazgos más recientes en torno a la asociación de la autofagia al proceso fisiopatológico en enfermedades poliglutamínicas, destacando el alcance de estos descubrimientos para la concepción y desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes afectados.

Métodos: Se realizó una búsqueda de investigaciones publicadas en las bases de datos PubMed, HINARI, EBSCO y Highwire Press, a través del uso de palabras clave relevantes al tema.

Resultados: Se incluye una actualización de los estudios publicados que han analizado distintos aspectos de la autofagia en el contexto de enfermedades poliglutamínicas. Se abordan los mecanismos implicados y la utilidad de la estimulación de la autofagia como estrategia terapéutica potencial.

Conclusiones: La diversidad de vías a través de las cuales la autofagia puede ser estimulada, incrementa las probabilidades de éxito de la modulación de la autofagia como estrategia terapéutica para enfermedades poliglutamínicas; no obstante, la eficacia y seguridad de los candidatos terapéuticos identificados para el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas deben ser evaluadas con mayor profundidad.

Palabras clave

Agregación proteica, autofagia,
enfermedades poliglutamínicas,
proteinopatías.

Abstract

Introduction: Human polyglutamine disorders encompass a group of still incurable neurodegenerative diseases caused by the pathogenic expansion of CAG repeat sequences in the coding regions of novel genes. Recently, it has been showed autophagy as part of the pathophysiologic process associated with polyglutamine disorders.

Objective: To review recent findings relative to the association of autophagy and the pathophysiologic process of polyglutamine disorders, highlighting the significance of such discoveries for the design and implementation of therapeutic strategies focused on the treatment of affected patients.

Methods: A search for research papers was made in PubMed, HINARI, EBSCO and Highwire Press databases by using key words relevant to the topic.

Results: A review of research concerning different aspects of autophagy and in the context

of polyglutamine disorders is here provided. The involved molecular mechanisms and the potential therapeutic usefulness of the stimulation of autophagy are discussed.

Conclusions: The diversity of pathways through which autophagy can be stimulated; increases the probabilities of succeed by using autophagy modulation as a therapeutic strategy for polyglutamine disorders. Nevertheless, further research should be conducted to assess the efficacy and safety of autophagy modulating candidate drugs for the treatment of polyglutamine disorders.

Keywords

Autophagy, polyglutamine disorders, protein aggregation, proteinopathies.

Correspondencia:

Luis E Almaguer-Mederos.
Edificio 14; Apto. 17; Rpto. Nuevo Holguín, Holguín, Cuba. C.P: 80100.
Correo electrónico: leam@cristal.hlg.sld.cu; lalmaguermederos@gmail.com

Introducción

Las proteinopatías como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, las taupatías, la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades poliglutamínicas, comparten varias características patogénicas entre las que destaca la formación de agregados proteicos extra o intracelulares. Dichos agregados proteicos están constituidos esencialmente por proteínas mutantes con plegamiento inadecuado y aparecen en las poblaciones neuronales que resultan preferencialmente afectadas como derivación del proceso patológico.¹ En particular, las enfermedades poliglutamínicas (poliQ) como enfermedad de Huntington (HD), Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA), Atrofia Dentatorubral-Páldolusiana (DRPLA), Ataxias Espinocerebelosas (SCAs) tipos 1, 2, 3 o enfermedad de Machado-Joseph (MJD), tipos 6, 7 y 17, se caracterizan por ser eminentemente neurológicas, por seguir un patrón neuropatológico específico y por mostrar inclusiones citoplasmáticas o intranucleares como característica histopatológica unificadora. Dada la comunidad de rasgos que caracterizan a estas enfermedades, se presume que compartan mecanismos fisiopatológicos similares.^{1,2}

Recientemente se ha implicado a la autofagia en los procesos fisiopatológicos de varias enfermedades poliglutamínicas.

Esta revisión persigue el objetivo de sistematizar los hallazgos más recientes en torno a la asociación de la autofagia al proceso fisiopatológico en enfermedades poliglutamínicas y evaluar el alcance de estos descubrimientos para la concepción y desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes afectados.

Autofagia: definición, tipos, maquinaria y rutas de regulación

El término autofagia hace referencia a todos los procesos en los cuales el material intracelular es degradado dentro del complejo lisosoma/vacuola donde se reciclan los constituyentes

macromoleculares.³ La autofagia es un mecanismo conservado en el curso de la evolución en células eucariotas. Si bien en levaduras la autofagia es un proceso activo solamente bajo condiciones de inanición, en mamíferos ocurre de modo constitutivo. De hecho, en la mayoría de las células de mamíferos existe un nivel basal de autofagia, que probablemente refleje su rol en el reciclaje de proteínas de larga duración y en la degradación de estructuras dañadas, y que pudiera ser responsable del rol anti-envejecimiento de la autofagia.⁴

Se han identificado y caracterizado tres tipos de procesos autofágicos: micro-autofagia, autofagia mediada por chaperonas y autofagia clásica o macro-autofagia. En la micro-autofagia la propia membrana lisosomal se invagina o evagina para engullir porciones del citosol, inclusiones u organelos; a diferencia de la macro-autofagia, no existe formación de una doble membrana citoplasmática para el secuestro del material a degradar. Por su parte, la autofagia mediada por chaperonas es selectiva para un grupo de proteínas citosólicas solubles que contienen la secuencia de aminoácidos KFERQ, reconocida por la chaperona HSP70 y co-chaperonas relacionadas; a diferencia de la macro-autofagia, la autofagia mediada por chaperonas no requiere la formación de vesículas intermediarias.⁵ La macro-autofagia (autofagia, propiamente dicho) es un mecanismo vacuolar de auto-digestión, responsable de la eliminación lisosómica de proteínas de larga duración, más del 90% de las proteínas celulares, agregados macromoleculares y organelos dañados. Aún cuando la autofagia fue inicialmente descrita como un mecanismo de degradación inespecífico, se han identificado varias formas selectivas de autofagia que son específicas para el retículo endoplásmico (REfagia), ribosomas (ribofagia), mitocondrias (mitofagia) o agregados proteicos (agrefagia).³

El proceso de autofagia consta de cuatro etapas: iniciación (inducción), nucleación (formación de la membrana de aislamiento), expansión (elongación de los autofagosomas), y maduración del autofagosoma

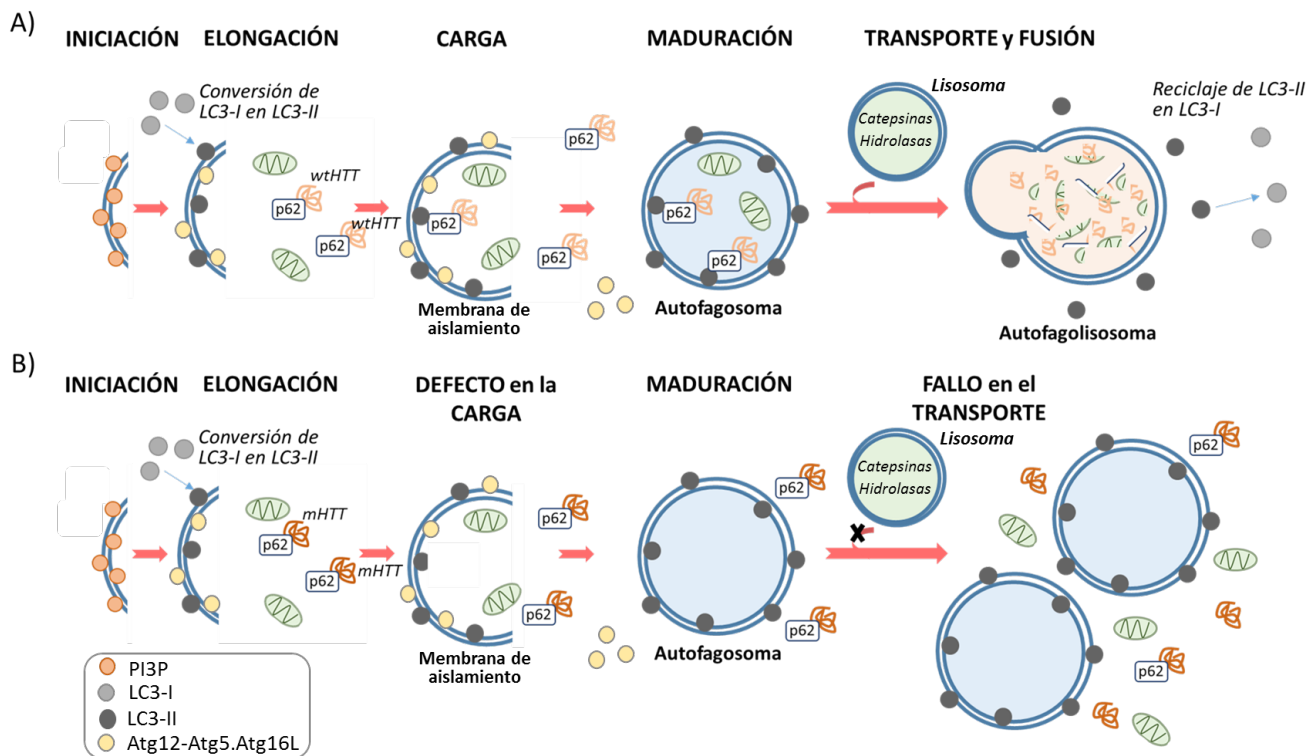


Figura 1. Proceso de autofagia.

(Figura 1A). La autofagia es inducida por una serie de estímulos entre los que se incluyen señales nutricionales, factores de crecimiento, Ca^{2+} , ATP, cAMP, hormonas y la acumulación de proteínas bajo condiciones fisiológicas o patológicas y su iniciación puede transcurrir por una ruta dependiente de la proteína diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR), la cual es un sensor central del estado energético celular, de factores de crecimiento y de señales nutricionales, o por una ruta alternativa independiente de mTOR que involucra a la ruta de señalización cAMP/Epac (proteína de intercambio directamente activada por cAMP)/Rap2 (GSTasa semejante a Ras)/PLC (fosfolipasa C) o a la inhibición de la calpaína.^{3,5} La regulación del pH a través de las proteínas NHE1 y NHE5 también tiene un rol en la regulación de los niveles basales de autofagia, lo que pudiera ser mediado por mecanismos similares a los implicados en la autofagia inducida por déficit energético a nivel celular.⁶

Durante la fase de iniciación, la mTOR es inhibida en el complejo mTORC1, que consiste además de la proteína interactiva de mTOR contentiva del

dominio DEP (DEPTOR), la proteína reguladora asociada a mTOR (RAPTOR), PRAS40 y GβL. Como resultado, la ULK1 fosforila a las proteínas FIP200 y ATG13 miembros del complejo ULK y regula el tráfico de la ATG9 y la translocación del complejo de la fosfatidil-3-inositol quinasa clase III (PIK3C3) desde los microtúbulos hasta el retículo endoplasmático rugoso, a través de la fosforilación de AMBRA1. El complejo Beclina 1/PIK3C3, que incluye además a las proteínas AMBRA1, p150, UVRAG y ATG14, tiene un rol central durante la fase de nucleación. El fosfatil-inositol-3-fosfato (PI3P) inducido por la PIK3C3 recluta otras proteínas ATG (DP1, WIPI 1-4, mATG2, VMP1 y ATG9) en el sitio de ensamblaje del fagóforo o membrana de aislamiento. La beclina 1 promueve la actividad quinasa de la PIK3C3 a través de su interacción con Atg14, UVRAG o con Bif1 a través de UVRAG, y también regula negativamente la autofagia a través de su interacción con las proteínas anti-apoptóticas BCL2 y BCL-XL. La elongación del fagóforo alrededor del cargo es regulada por dos sistemas de conjugación semejantes a ubiquitina: ATG12-ATG 5-ATG16L1 (ATG12, ATG7, ATG10, ATG5 y

ATG16L1) y LC3-PE (LC3, ATG4, ATG7 y ATG3).⁷ Durante la fase de maduración, los autofagosomas resultantes del proceso de elongación del fagóforo alrededor del cargo, se fusionan con los complejos vacuola/lisosomas en cuyo interior es degradado su contenido por hidrolasas ácidas. Esta fusión depende de varias proteínas como LAMP2, el complejo Rubicon-UVRAG, SNAREs, HOPS, Rab, ESCRT y LC3.⁷

Así como el mecanismo de supervivencia celular, la autofagia también puede ser un mecanismo de muerte celular, que puede ocurrir en ausencia de señales detectables de apoptosis (a través de la muerte celular por autofagia) o concomitante con la apoptosis u otras formas de muerte celular como la necrosis, necroptosis, piroptosis y NETosis.⁵ La interrelación entre la autofagia y la muerte celular se hace evidente a partir de la extensa red de interacciones moleculares existente entre proteínas de la ruta autofágica y proteínas de rutas de muerte celular. Varias proteínas de la ruta autofágica, como la Atg4D, Atg5, Beclina-1, Atg7 y Atg12-Atg3, tienen funciones pro-apoptóticas. Asimismo, varias proteínas de la ruta apoptótica regulan la autofagia; p. ej. la proteína Bcl-2 es un inhibidor de apoptosis e interactúa directamente con la Beclina-1 para inhibir la actividad autofágica de esta última.⁷ La proteína HMGB1 participa en este proceso a través de su unión a la beclina-1 y disociación de la Bcl-2, co-localizándose con LC3B, molécula marcadora de autofagia.⁸ La interconexión entre muerte celular y autofagia es por tanto muy compleja y resulta crítica para el destino final de la célula.

Autofagia en enfermedades poliglutamínicas

La eliminación de proteínas tóxicas es particularmente importante para el adecuado funcionamiento de células post-mitóticas, en las que la acumulación de proteínas mutantes no puede ser diluida a través de la división celular. Existen dos sistemas o rutas principales en las células de mamíferos para la eliminación de proteínas mutantes o dañadas: ubiquitina-proteasoma y lisosoma-autofagia.⁵

La actuación del sistema ubiquitina-proteasoma en la degradación de proteínas con poliglutamina

expandida está bien documentada. Se ha demostrado que si bien el proteasoma es capaz de degradar proteínas monoméricas con dominios poliglutamínicos expandidos, no puede fragmentar el dominio poliQ.⁹ En consecuencia, la degradación de proteínas poliQ expandidas por el proteasoma resultará en la generación de péptidos poliQ que pueden tener una tendencia mayor a la agregación y toxicidad en comparación con las proteínas poliQ íntegras.⁹ Adicionalmente, los proteasomas no son eficientes en la degradación de complejos proteicos, agregados u oligómeros; por ejemplo, se ha comprobado que los agregados de ataxina-3 expandida son hasta tres veces más resistentes a la degradación por el proteasoma que la misma proteína no agregada.⁹ Estas limitantes del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma pueden ser superadas por la macro-autofagia, proceso que puede degradar agregados proteicos.

Los roles de la autofagia en el proceso patofisiológico de enfermedades poliglutamínicas han sido mejor estudiados en la enfermedad de Huntington, aunque también existen evidencias que asocian este mecanismo de supervivencia/muerte celular a la ataxia espinocerebelosa tipo 3, la ataxia espinocerebelosa tipo 7, la atrofia muscular espinobulbar y la atrofia dentatorubral-páldoluysiana.

Enfermedad de Huntington (HD)

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de una secuencia repetida de CAG en el gen HTT, que luego es traducido para producir la huntingtina (htt), proteína nuclear y citoplasmática de 3,144 aminoácidos y 348 kDa. La htt contiene una secuencia poliglutamínica en su extremo N-terminal que, una vez expandida por encima de las 35 repeticiones, resulta neurotóxica particularmente para las neuronas espinosas medias en el cuerpo estriado. La htt mutada tiende a formar agregados intrayperinucleares, y es ubiquitinada por la proteína SYVN1, lo que promueve su degradación por el proteasoma. Se ha comprobado que la acumulación intracelular de htt mutante provoca una citotoxicidad dependiente del contexto que resulta crítica para el proceso patológico característico de la HD.² La htt

tiene similitudes estructurales y funcionales con mTOR, elemento regulador central de la autofagia. Tanto la htt como la mTOR son translocadas hacia y desde el núcleo, siendo exportadas a través de la ruta Crm-1/exportina y contienen un gran número de secuencias ricas en leucina -HEAT- en el extremo amino-terminal que se emplean para reconocer de modo específico estructuras membranosas.^{10,11} El que la htt pueda asociarse reversiblemente al retículo endoplásmico (RE) y a vesículas autofágicas, unido a su capacidad para ser transportada al núcleo, favorecen su función en la comunicación RE-Núcleo en respuesta a situaciones de estrés del RE.¹¹ El extremo N-terminal de la htt co-localiza con Rab7 y con endosomas y lisosomas tardíos positivos para la LC3. El que la Rab7 sea requerida para la progresión de la autofagia en células de mamíferos, unido a que el estrés del RE desencadena autofagia, sostiene que la htt puede tener un rol importante en la autofagia desencadenada por estrés del RE.¹² Este rol es particularmente importante para las neuronas al requerir de una autofagia constitutiva para su supervivencia.¹³ La htt también tiene importantes similitudes con varias proteínas requeridas para la autofagia selectiva en la levadura. La secuencia de aminoácidos 1-586 en la htt es similar a la Atg23 de levadura, contiene la secuencia repetida de glutaminas, actúa en el tráfico de vesículas, se localiza en los microtúbulos e interactúa con las proteínas HAP-1, Optineurina, p53, Sp1, Akt, CBP, SH3GL3, RasGAP, PSD-95, HIP-1, HYP-J, PACIN y actina. Por su parte, la secuencia de aminoácidos 807-1653 en la htt es similar a la Vac8 de levadura, que actúa como proteína de señalización en respuesta a daño al ADN e interactúa con la proteína Cdk5. Además, la secuencia de aminoácidos 1743-3144 en la htt es similar a la Atg11 de levadura, que tiene la función de regular la movilidad de endosomas tempranos e interactúa con el complejo HAP50/Rab5.¹⁴

En muestras de cerebro humano, la acumulación de htt mutante es altamente sensible a la expresión de Beclina-1, un gen esencial para la autofagia. Incluso, la htt mutante recluta Beclina-1 e interrumpe el reciclaje, mediado por Beclina-1, de proteínas de larga vida. Por tanto, el secuestro de Beclina-1 en la población neuronal vulnerable en la HD podría disminuir la función fisiológica de la Beclina-1 y

la degradación por autofagia de la htt mutante.¹⁵ La expresión de Beclina-1 en cerebros humanos disminuye con la edad. Dado que el gen Beclina-1 es haplo-insuficiente en la regulación de la función autofágica, se ha propuesto que la disminución con el avance de la edad de la expresión del Beclina-1, puede conducir a la disminución de la actividad autofágica durante el envejecimiento, lo que en cambio favorecería la acumulación de htt mutante y la progresión de la enfermedad.¹⁵

Se ha encontrado un incremento temprano y sostenido de la expresión de LC3 en ratones *knock-in* en modelos para la HD, lo que sugiere que alteraciones en la ruta autofágica son un componente importante y temprano en la respuesta neuronal a la expresión de htt mutante.¹⁶ En otros modelos celulares y ratones *knock-in* 111Q- para la HD, y en tejido encefálico humano, se identificó un defecto primario en la capacidad de las vacuolas autofágicas para reconocer las proteínas citosólicas a ser degradadas en células HD. Se comprobó que en células HD la formación de vacuolas autofágicas es normal e incluso incrementada, y que estas son adecuadamente eliminadas por los lisosomas; sin embargo, fallan en secuestrar eficientemente en su lumen a las proteínas a ser degradadas. A partir de estos resultados, se ha propuesto que la ineficiencia de los autofagosomas en engullir componentes citosólicos es responsable de la lenta eliminación y consecuente acumulación de htt mutante en células HD. Adicionalmente, la htt mutante muestra una disminución en su interacción con el complejo optineurina/Rab8, conducente a alteraciones en la dinámica autofagosoma/lisosoma (*Figura 1B*).¹⁷ También se han obtenido evidencias en favor de un vínculo funcional entre la autofagia y la HD a partir del estudio del rol de la chaperona HspB8 en la degradación de htt expandida (43Q) en cultivos celulares de células HeLa, HEK-293T y COS-1. La sobreexpresión de la HspB8 en cultivos celulares previno la acumulación de htt43Q, y este efecto fue intrínsecamente dependiente de Bag3, miembro de una familia de proteínas que contienen un dominio semejante a la ubiquitina, previene la degradación de la Hsp70, provoca la acumulación de sustratos ubiquitinados y puede facilitar la eliminación de proteínas a través de la estimulación de autofagia.¹⁸

La sobreexpresión de Bag3 provocó la degradación acelerada de la htt43Q, mientras que su subexpresión previno la degradación de la htt43Q inducida por la HspB8.¹⁸ Adicionalmente, la disminución de los niveles de la Bag3 redujo los niveles de LC3-II, mientras que la sobreexpresión de Bag3 o de HspB8 estimuló la formación de LC3-II, sugiriendo que el complejo HspB8-Bag3 puede estimular la degradación de la htt43Q por macroautofagia. De hecho, el tratamiento de los cultivos celulares con inhibidores de la macroautofagia provocó una disminución significativa de la degradación de htt43Q inducida por la HspB8 y Bag3.¹⁸ La expresión de htt carente de su secuencia poliglutamínica (DQ-htt) en ratones *knock-in* de la HD (Hdh140Q/DQ), redujo significativamente la formación de agregados de la htt mutante, disminuyó los déficits motores y de comportamiento, y extendió la duración de la vida en comparación con ratones Hdh140Q/+. El alivio del proceso neurodegenerativo estuvo acompañado de la normalización de los niveles de lipofusina en el cerebro y de un incremento de los niveles estacionarios de la LC3-II. La expresión de DQ-htt *in vitro* incrementó la síntesis de autofagosomas y estimuló la eliminación dependiente de Atg5 de los agregados de la htt mutante. Los ratones HdhDQ/DQ vivieron mucho más tiempo que los controles salvajes, lo que sugiere que la estimulación de la autofagia podría resultar beneficiosa en enfermedades causadas por proteínas con tendencia a la formación de agregados intracelulares tóxicos y para la prolongación de la vida en mamíferos.¹⁹

Estudios genéticos realizados en humanos también han demostrado la implicación de componentes de la maquinaria autofágica en la fisiopatología de la HD. Específicamente, se encontró que el polimorfismo V471A en la Atg7 tiene un efecto significativo sobre la edad de inicio de la enfermedad y está asociado a un inicio cuatro años más temprano que lo esperado.²⁰ La Atg7 facilita la formación de autofagosomas actuando en los dos sistemas de conjugación semejantes a la ubiquitina, que median la elongación de las vesículas durante la biogénesis de los autofagosomas, y su sobreexpresión rescata el fenotipo de ojo en mosaico causado por la expresión de una proteína poliglutamínica (41Q) en *Drosophila*.²¹ Aunque no se conoce cuál es el efecto

funcional del polimorfismo V471A sobre la actividad de la Atg7, se ha propuesto que su presencia podría alterar los mecanismos autofágicos para la degradación de la htt mutante, lo que conduciría al incremento de la htt mutante soluble y agregada, incrementando la posibilidad de que la célula sucumba a la apoptosis.²⁰

Más recientemente se ha demostrado que solamente la htt miristoilada (htt a la que se añadió miristato a un residuo de glicina expuesto en un fragmento resultante de la acción de la caspasa-3 induce la formación de autofagosomas, y se acumula en varios tipos celulares en estructuras autofago/lisosómicas anormalmente grandes. Estas observaciones han sugerido que la acumulación de htt miristoilada en las células, puede alterar la tasa de producción de autofagosomas o de su eliminación a través de procesos de fusión autofagosómico/lisosómico heterotípicos.²²

Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3)

La SCA3 es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de una secuencia repetida de CAG en el gen ATXN3, que luego es traducido para producir la ataxina-3, una proteína de 376 aminoácidos y 43 kDa, que se localiza predominantemente en la matriz nuclear y que interactúa con las proteínas RAD23A y RAD23B que actúan como reparadoras de ADN. A través de su interacción con varios factores transcripcionales (CBP, p300 y PCAF), la ataxina-3 actúa como represor transcripcional. También funciona como regulador transcripcional a través de su interacción con proteínas histónicas, y actúa además como enzima desubiquitinante. La ataxina-3 mutada es neurotóxica y tiende a formar agregados intra y perinucleares.²³

En un sistema modelo para la SCA3 establecido en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se demostró que la inactivación de una serie de genes vinculados al proceso de autofagia intensificó la toxicidad de fragmentos poliQ expandidos en neuronas y músculo, a la vez que la inactivación de CeTor homólogo en *C. elegans* del mTOR en mamíferos redujo la toxicidad poliglutamínica y mejoró el desempeño motor.²⁴ Estas observaciones demuestran que la autofagia es

parte del proceso fisiopatológico en la SCA3, y que la estimulación farmacológica de la autofagia podría reportar beneficios terapéuticos.

Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7)

La SCA7 es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de una secuencia repetida de CAG en el gen ATXN7, que luego es traducido para producir la ataxina-7, una proteína de 892 aminoácidos y 95kDa, que se localiza predominantemente en el núcleo, nucléolo y matriz nuclear, y que interactúa con las proteínas SORBS1, PSMC1 y CRX.²³ Es un homólogo de la proteína Sgf73p de levaduras, un componente del complejo de remodelación de cromatina SAGA (Spt/Ada/Gcn5/acetiltransferasa). Aunque su función exacta se desconoce, se sabe que actúa en los complejos humanos STAGA (SPT3-TAF(II)31-GCN5L acetilasa) y TFTC (GCN5 y TRRAP).²⁴ La expansión poliglutaminica mutante afecta la función normal de la ataxina-7 en estos complejos y confiere una ganancia de función concomitante con la formación de agregados proteicos poliglutaminicos intranucleares.²⁴

En células HEK293T transfectadas para la expresión de un fragmento N-terminal de la ataxina-7, el bloqueo de la ruta autogálica con 3-metiladenina provoca un significativo incremento en los niveles estacionarios de ataxina-7. A su vez, el bloqueo de la macro-autofagia en cultivos primarios de neuronas que expresaban ataxina-7 resulta en un incremento similar de los niveles de ataxina-7. Adicionalmente, en tejido cerebeloso de ratones MoPrP-flag-SCA7-92Q-myc, modelo para la SCA7, se encontró un marcaje significativo para la proteína LC3, mientras que en ratones transgénicos controles MoPrP-flag-SCA7-10Q-myc o en ratones no manipulados genéticamente no se encontró marcaje para la LC3.²⁵ En un nuevo modelo PC12 inducible, la expresión de ataxina-7 mutante produjo una toxicidad que fue agravada por la inhibición de la ruta autofágica; también se obtuvo que la activación farmacológica de la autofagia redujo la toxicidad inducida por la ataxina-7.²⁶ Tomados en conjunto, estos hallazgos fundamentan la propuesta de un rol primario para la autofagia en la degradación de fragmentos poliglutaminicos de ataxina-7.

Atrofia muscular espinobulbar (SBMA)

La SBMA es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de una secuencia repetida de CAG en el gen que codifica para el receptor de andrógeno (AR). El AR es una proteína nuclear de 919 aminoácidos y 99 kDa que se une al ADN en forma homodimérica y forma parte de un complejo ternario que incluye además a las proteínas DJBP y PARK7. A través de la región poliglutaminica en el extremo N-terminal, el AR se une a la proteína Ran de lo que resulta la estimulación de la transactivación mediada por el AR; la afinidad con que esta interacción tiene lugar disminuye con el incremento en longitud de la secuencia poliglutaminica. La expansión patológica de la secuencia poliglutaminica confiere una ganancia de función concomitante con la formación de agregados proteicos poliglutaminicos intranucleares; el que el AR mutante tenga un efecto tóxico requiere de su localización nuclear y de la presencia de su ligando: testosterona o dihidrotestosterona.²⁷

En cultivos primarios de neuronas motoras que expresan un fragmento N-terminal del AR con 112 glutaminas, se ha demostrado que el AR mutante retenido en el citoplasma falla en inducir toxicidad porque es eliminado por autofagia e induce la formación de puntos autofágicos citoplasmáticos que contienen LC3B.²⁸ Como el AR es una proteína nuclear, es de esperar que las neuronas motoras con AR nuclear sean refractarias a la inducción de autofagia, por cuanto este es un proceso eminentemente citoplasmático. Sin embargo, en cultivos primarios de neuronas motoras se ha comprobado que la inducción farmacológica de autofagia rescata completamente a las neuronas motoras de los efectos tóxicos del AR mutante localizado en el núcleo.²⁸ No obstante, existen contradicciones en cuanto a si la autofagia ejerce sus efectos beneficiosos a través de la disminución de los niveles del AR mutante monomérico o agregado. En un estudio inicial realizado en un modelo de la SBMA en *Drosophila melanogaster*, se comprobó que la activación de la autofagia suprimió la toxicidad del AR mutante a través de la reducción de especies monoméricas y agregadas del AR mutante.²⁹ Un estudio posterior realizado en cultivos primarios de neuronas motoras no reportó

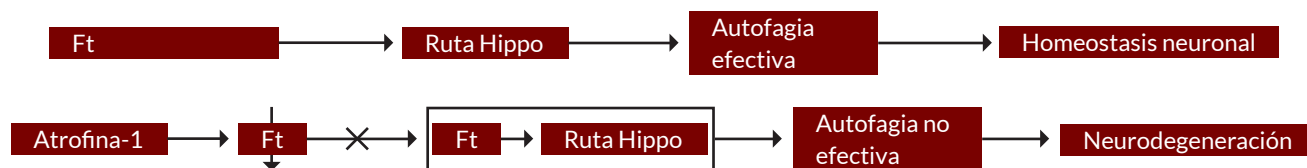


Figura 2. Proceso neurodegenerativo.

cambios en los niveles de AR mutante después de la activación farmacológica de la autofagia, o a través de la inhibición de la autofagia endógena.²⁷ La heterogeneidad de estos resultados podría deberse a diferencias entre los sistemas experimentales empleados. Pudiera ocurrir, por ejemplo, que en el modelo en *Drosophila*, en comparación con células de mamíferos, el AR mutante permaneciera durante más tiempo en el citoplasma, lo que conduciría a una mayor accesibilidad a su degradación por autofagia. De modo semejante a lo reportado para la htt,¹⁸ se ha comprobado que la eliminación por autofagia del AR mutante es facilitada por la HspB8, miembro de la familia de proteínas de choque térmico pequeñas.³⁰

Atrofia dentatorubral-páldoluisiana (DRPLA)

La DRPLA es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión de una secuencia repetitiva de CAG en el gen ATN1 que codifica para la atrofina-1, proteína nuclear de 1185 aminoácidos y 125 kDa. Se han identificado como interactores de la atrofina-1 a las proteínas BAIAP2, WWP1, WWP2, WWP3 y RERE (atrofina-2). Se ha comprobado que la atrofina-1 actúa como co-represor de la expresión de receptores nucleares, y también se ha asociado a la represión de la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en *Drosophila melanogaster*. Fragmentos truncos de atrofina-1 expandida forman agregados intranucleares tanto en ratones transgénicos modelos de DRPLA como en tejido encefálico de pacientes fallecidos por DRPLA.³¹ En un modelo de DRPLA en *Drosophila melanogaster* se comprobó que la expresión de atrofina-1 mutante promovió la formación de vacuolas autofágicas raramente encontradas en la retina de animales controles. La atrofina-1 mutante indujo la formación de numerosos autofagosomas típicos, agrupados y fusionados con compartimientos lisosomales electrodensos para formar grandes autofagolisosomas. La presencia de organelos autofágicos fue confirmada por inmunohistoquímica

con la detección del marcador autofágico GFPH-Atg8a.³² También en este modelo se comprobó que el bloqueo de la señal inductora de autofagia a través de la generación de clones mutantes para la atg1 D3D, condujo a un incremento en la degeneración causada por la Atrofina-1 mutante, sugiriendo que la autofagia endógena es citoprotectora.³² Sin embargo, la adición de rapamicina a la dieta condujo a una significativa y altamente reproducible disminución en el número de células fotorreceptoras en las moscas que expresaban una atrofina-1 mutante con 75 glutaminas. Estos resultados indicaron que aunque la autofagia endógena tiene un rol crucial en la atenuación de la toxicidad inducida por la atrofina-1 mutante, no es capaz de rescatar la neurodegeneración en este modelo en *Drosophila* para la DRPLA.³² Adicionalmente, se ha demostrado que la incapacidad de la autofagia para rescatar el proceso neurodegenerativo se debe a que la atrofina-1 bloquea la digestión lisosomal, lo que revela un mecanismo tóxico específico para la atrofina-1 mutante.³² Estos resultados sugieren que el proceso neurodegenerativo en moscas modelo de DRPLA resulta de una inhibición parcial o retardo de la digestión autofágica similar a lo que ocurre en enfermedades por almacenamiento de materiales parcialmente digeridos en los lisosomas. Más recientemente se demostró que la acción incapacitante de la atrofina-1 sobre la autofagia es mediada por la ruta de señalización Fat/Hippo (Figura 2).³³

Potenciales aplicaciones terapéuticas de la estimulación de la autofagia en enfermedades poliglutaminicas

La inducción farmacológica de la autofagia pudiera tener relevancia terapéutica para el tratamiento de enfermedades poliglutaminicas. En particular, se ha propuesto a la rapamicina o sus análogos, como compuestos terapéuticos promisorios que eliminan

los agregados proteicos tóxicos a través de la activación de la autofagia.³⁴ Se ha comprobado que la administración de temsirolimus (inhibidor 779 del ciclo celular, éster de la rapamicina) seis semanas antes del inicio de la sintomatología, reduce el número de agregados proteicos y las alteraciones del comportamiento en ratones transgénicos que expresan un fragmento de huntingtina mutante.³⁵ De modo similar, el tratamiento con temsirolimus mejoró el desempeño motor de ratones transgénicos modelos de la ataxia espinocerebelosa tipo 3; el tratamiento redujo el número de agregados proteicos y los niveles de ataxina-3 mutante soluble en cerebros de ratones transgénicos, mientras que los niveles de ataxina-3 salvaje permanecieron inalterados.³⁶ Tomando en consideración que el temsirolimus es un fármaco diseñado para uso prolongado en humanos, se ha sugerido su empleo como posible estrategia terapéutica para el tratamiento de la HD y la SCA3.³⁶

El efecto beneficioso de la inhibición de la proteína mTOR pudiera no estar exclusivamente vinculado a la eliminación por autofagia de agregados poliglutamínicos y de proteínas poliglutamínicas expandidas solubles. Se ha demostrado en un modelo celular para la HD que la rapamicina disminuyó significativamente la agregación de htt mutante tanto en células con capacidad autofágica como en aquellas deficientes para la autofagia (fibroblastos embrionales murinos con silenciamiento de la expresión del gen *atg5*). Se comprobó que la rapamicina reduce los niveles de proteínas poliQ solubles a través de una modesta inhibición de la síntesis de proteínas. Hipotéticamente, una modesta reducción en la síntesis de htt por la rapamicina pudiera conducir a la disminución en la probabilidad de alcanzar la concentración crítica necesaria para la nucleación y subsiguiente agregación de la htt expandida. Luego, además de reducir la agregación y toxicidad de proteínas poliglutamínicas expandidas siguiendo la ruta autofágica, la rapamicina puede aliviar la severidad del proceso patológico a través de un efecto global sobre la síntesis de proteínas.³⁷ De modo similar, se ha comprobado en ratones transgénicos modelos de la SBMA, que además de la degradación de AR mutante citoplasmático por autofagia, la inducción de la ruta de autofagia

dependiente de mTOR mediante la rapamicina, protege a las neuronas motoras de los efectos tóxicos de AR mutante nuclear, aunque esto no afecta significativamente los niveles nucleares del AR expandido, ni su agregación en el núcleo. Estos resultados han sugerido que la intervención terapéutica para inducir autofagia pudiera tener potenciales beneficios para el tratamiento de pacientes afectados por la SBMA, incluso cuando esta protección sea independiente de un efecto directo sobre el AR mutante.²⁸ Aun cuando se han obtenido resultados alentadores con la estimulación de la autofagia a través de la inhibición de la proteína mTOR, se plantean varios inconvenientes. La ruta mTOR se ha identificado como un nexo para la integración de rutas de nutrición y crecimiento, y su inhibición por rapamicina no solo induce autofagia sino que también bloquea la expresión de numerosas proteínas, provoca inmunosupresión, bloquea el ciclo celular y modifica el tamaño celular.³⁷ Estos efectos secundarios podrían invalidar cualquier efecto terapéutico beneficioso dependiendo de su magnitud.

La demostración del vínculo existente entre la autofagia y enfermedades poliglutamínicas, ha impulsado la identificación de nuevos fármacos inductores de autofagia, varios de los cuales actúan siguiendo rutas independientes de mTOR (*Tabla 1*). De modo particular, se ha demostrado que la administración de rilmenidina atenúa los síntomas de enfermedad en ratones transgénicos modelos para la HD y disminuye los niveles de htt mutante.⁴⁴ Este fármaco usualmente se emplea para el tratamiento crónico de hipertensión, y actúa sobre receptores imidazolinicos I1 a nivel central y periférico;⁴⁵ su efecto como inductor de autofagia, unido a su excelente tolerabilidad,⁴⁶ la convierte en excelente candidato para el desarrollo de ensayos clínicos en individuos afectados por alguna enfermedad poliglutamínica. De hecho, actualmente se encuentra en ejecución un ensayo clínico fase I para evaluar la seguridad de la rilmenidina en pacientes con HD.⁴⁷

Una alternativa al tratamiento farmacológico tradicional parte de la capacidad del péptido 1 de unión a poliglutaminas (QBP1) para unirse de

No.	Estimulador de autofagia	Mecanismo de Acción	Efectos positivos en enfermedades neurodegenerativas	Ref.
1	Rapamicina	Inhibición de la proteína diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR).	Estimula la eliminación de htt y ataxina-3 mutantes; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; inhiben la vía intrínseca de la apoptosis.	35, 38
2	CCI-779			
3	Glucosa			
4	Glucosa-6-fosfato			
5	Litio	Inhibición de la IMPasa y disminución de los niveles de inositol y de inositoltrifosfato; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	39
6	L-690, 330			
7	Carbamazepina	Disminución de los niveles de inositol y de inositoltrifosfato; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	40
8	Valproato de sodio			
9	Verapamilo	Bloqueo de canales de Ca ²⁺ ; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	40, 41
10	Loperamida			
11	Amiodarona			
12	Nimodipina			
13	Nitrendipina			
14	Niguldipina			
15	Pimozida			
16	Calpastatina	Inhibición de calpaina; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	40
17	Calpeptina			
18	Clonidina	Agonistas de receptores Imidazólicos-1; reducción de cAMP; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	40, 41
19	Rilmenidina			
20	2'5'-dideoxiadenosina	Inhibición de la adenilciclase; reducción de cAMP; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	40
21	NF449	Inhibición de GS α ; independiente a mTOR.	Reducen el número de agregados de htt intracelulares.	40
22	Minoxidil	Estimulación de los canales de K ⁺ ATP; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados poliQ tóxicos; citoprotectora.	40
23	Penitren A	Inhibición de canales de K ⁺ de alta conductancia activados por Ca ²⁺ ; independiente a mTOR.	Reducen el número de agregados poliQ intracelulares.	42
24	Fluspirinilo	Antagonista de la dopamina; independiente a mTOR.	Reducen el número de agregados poliQ intracelulares.	42
25	Trifluoperazina			
26	Trealosa	Desconocido; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt mutantes; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados de htt; inhibe la vía intrínseca de la apoptosis; citoprotectora.	43
27	SMER10	Desconocido; independiente a mTOR.	Estimula la eliminación de htt mutantes; reducen los niveles de htt mutante y el número de agregados de htt; citoprotectora.	43
28	SMER18			
29	SMER28			

Tabla 1. Listado de estimuladores de autofagia y sus roles protectores en enfermedades poliglutámicas. Nota: "Ref", Referencias.

modo específico a la secuencia poliQ expandida de la htt mutante.⁴⁸ El marcaje de la htt mutante para degradación a través de la expresión de una molécula quimérica contentiva de dos copias de QBP1 y copias de dos motivos de empalme típicos de proteínas emparentadas con proteínas de shock térmico (HSC70), contribuyó a la degradación específica de htt mutante en cultivos celulares que expresaron el constructo, a través de autofagia mediada por chaperonas. La administración intraestriatal de un virus portador de la información para expresar la molécula quimérica suavizó el fenotipo de la enfermedad en ratones R6/2 modelo para la HD.⁴⁸

Se ha comprobado que el péptido Tat-beclina 1 es un potente inductor de autofagia que actúa a través de

su interacción con GAPR-1 (o GLIPR2), un regulador negativo de autofagia. La expresión de Tat-beclina 1 disminuye la acumulación de agregados poliglutamínicos in vitro, con potencial uso en el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas.⁴⁹

Recientemente se comprobó en cultivos de células de neuroblastoma SH-SY5Y, que el compuesto b-lap induce autofagia a través de la activación de Sirt1, lo que en consecuencia reduce los niveles intracelulares de agregados poliglutamínicos y su concomitante citotoxicidad. El b-lap es una orto-naftoquinona con potencial actividad anticancerígena.⁵⁰

Conclusión

Si bien existen numerosas evidencias que vinculan la autofagia al proceso fisiopatológico en enfermedades poliglutamínicas, aún quedan cuestiones básicas por esclarecer antes de introducir esta estrategia a la práctica clínica. Adicionalmente, debe ser evaluada con mayor profundidad la eficacia y seguridad de los candidatos

terapéuticos identificados para el tratamiento de enfermedades poliglutamínicas. La diversidad de vías a través de las cuales la autofagia puede ser estimulada, incrementa las probabilidades de éxito de la modulación de la autofagia como estrategia terapéutica para enfermedades poliglutamínicas.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran que en este estudio no existen conflictos de interés relevantes.

Fuentes de financiamiento

No existieron fuentes de financiamiento para la realización de este estudio científico.

Referencias

1. Orr HT. Polyglutamine neurodegeneration: Expanded glutamines enhance native functions. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22: 251-255.
2. Blum ES, Schwendeman AR, Shaham S. PolyQ disease: misfiring of a developmental cell death program? *Trends Cell Biol* 2013; 23: 168-174.
3. Klionsky DJ, Codogno P, Cuervo AM, Deretic V, Elazar Z, Fuego-Margareto J, et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy* 2010; 6: 438-448.
4. Komatsu M, Ueno T, Waguri S, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death and Differentiation* 2007; 14: 887-894.
5. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 2012; 22:43-61.
6. Togashi K, Wakatsuki S, Furuno A, Tokunaga S, Nagai Y, Araki T. Na⁺/H⁺ exchangers induce autophagy in neurons and inhibit polyglutamine-induced aggregate formation. *PLoS ONE* 2013; 8: e81313.
7. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12: 1509-1518.
8. Min HJ, Ko EA, Wu J, Kim ES, Kwon MK, Kwak MS, et al. Chaperone-like activity of high-mobility group box 1 protein and its role in reducing the formation of polyglutamine aggregates. *J Immunol* 2013; 190: 1797-1806.
9. Holmberg CI, Staniszewski KE, Mensah KN, Matouschek A, Morimoto RI. Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J* 2004; 23: 4307-4318.
10. Bachmann RA, Kim JH, Wu AL, Park IH, Chen J. A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 7357-7363.
11. Atwal RS, Xia J, Pinchev D, Taylor J, Epand RM, Truant R. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2600-2615.
12. Atwal RS, Truant R. A stress sensitive ER membrane-association domain in Huntingtin protein defines a potential role for Huntingtin in the regulation of autophagy. *Autophagy* 2008; 4: 91-93.
13. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Komkinami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441: 819-820.
14. Steffan JS. Does Huntingtin play a role in selective macroautophagy? *Cell Cycle* 2010; 9: 3401-3413.
15. Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, et al. Regulation of Intracellular Accumulation of Mutant Huntingtin by Beclin 1. *JBC* 2006; 281: 14474-14485.
16. Heng MY, Duong DK, Albin RL, Tallaksen-Greene SJ, Hunter JM, Lesort MJ, et al. Early autophagic response in a novel knock-in model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* 2010; 19: 3702-3720.
17. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature Neuroscience* 2010; 13: 567-76.
18. Carra S, Sivilotti M, Chávez Zobel AT, Lambert H, Landry J. HspB8, a small heat shock protein mutated in human neuromuscular disorders, has in vivo chaperone activity in cultured cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1659-69.
19. Zheng S, Clabough EBD, Sarkar S, Futter M, Rubinsztein DC, Zeitlin SO. Deletion of the Huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000838.
20. Metzger S, Saukko M, Van Che H, Tong L, Puder Y, Riess O, Nguyen HP. Age at onset in Huntington's disease is modified by the autophagy pathway: implication of the V471A polymorphism in Atg7. *Hum Genet* 2010; 128: 453-459.
21. Chen S-F, Kang M-L, Chen Y-Ch, Tang H-W, Huang Ch-W, Li W-H, et al. Autophagy-related gene 7 is downstream of heat shock protein 27 in the regulation of eye morphology, polyglutamine toxicity, and lifespan in *Drosophila*. *J Biomed Sci* 2012; 19: 52.
22. Martin DDO, Heit RJ, Yap MC, Davidson MW, Hayden MR, Berthiaume LG. Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of

- Huntingtin. *Hum Molec Genet* 2014; 23: 3166-3179.
23. Matilla-Dueñas A, Sánchez I, Corral-Juan M, Dávalos A, Alvarez R, Latorre P. Cellular and Molecular Pathways Triggering Neurodegeneration in the Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum* 2010; 9: 148-166.
24. McMahon SJ, Pray-Grant MG, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA. Polyglutamine-expanded spinocerebellar ataxia-7 protein disrupts normal SAGA and SLIK histone acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8478-8482.
25. Mookerjee S, Papanikolaou T, Guyenet SJ, Sampath V, Lin A, Vitelli C, et al. Post-translational modification of ataxin-7 at lysine-257 prevents autophagy-mediated turnover of an N-terminal caspase-7 cleavage fragment. *J Neurosci* 2009; 29: 15134-15144.
26. Yu X, Ajayi A, Boga NR, Ström A-L. Differential degradation of full-length and cleaved Ataxin-7 fragments in a novel stable inducible SCA7 model. *J Mol Neurosci* 2012; 47: 219-233.
27. Rusmini P, Bolzoni E, Crippa V, Onesto E, Sau D, Galbiati M, Piccolella M, Poletti A. Proteasomal and autophagic degradative activities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiology of Disease* 2010; 40: 361-369.
28. Montie HL, Cho MS, Holder L, Liu Y, Tsvetkov AS, Finkbeiner S, et al. Cytoplasmic retention of polyglutamine-expanded androgen receptor ameliorates disease via autophagy in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1937-50.
29. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 2007; 447: 859-63.
30. Rusmini P, Crippa V, Giorgetti E, Boncoraglio A, Cristofani R, Carra S, Poletti A. Clearance of the mutant androgen receptor in motoneuronal models of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol Aging* 2013; 34: 2585-2603.
31. Suzuki Y, Yazawa I. Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubralpallidoluysian atrophy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011; 4: 378-384.
32. Nisoli I, Chauvin JP, Napoletano F, Calamita P, Zanin V, Fanto M, Charroux B. Neurodegeneration by polyglutamine Atrophin is not rescued by induction of autophagy. *Cell Death and Differentiation* 2010; 1-11.
33. Napoletano F, Occhi S, Calamita P, Volpi V, Blanc E, Charroux B, et al. Polyglutamine Atrophin provokes neurodegeneration in *Drosophila* by repressing fat. *EMBO J* 2011; 30: 945-958.
34. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews* 2007; 6: 304-312.
35. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004; 36: 585-595.
36. Menzies FM, Huebener J, Renna M, Bonin M, Riess O, Rubinsztein DC. Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain* 2010; 133: 93-104.
37. Wyttenbach A, Hands S, King MA, Lipkow K, Tolkovsky AM. Amelioration of protein misfolding disease by rapamycin Translation or autophagy? *Autophagy* 2008; 4: 542-545.
38. Ravikumar B y Rubinsztein DC. Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: A step towards therapy? *Molecular Aspects of Medicine* 2006; 27: 520-527.
39. Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 170-178.
40. Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttofi EK, Saiki S, Siddiqi FH, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature Chemical Biology* 2008; 4: 295-305.
41. Renna M, Jimenez-Sanchez M, Sarkar S, Rubinsztein DC. Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases. *JBC* 2010; 285: 11061-11067.
42. Zhang L, Yu J, Pan H, Hu P, Hao Y, Cai W et al. Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19023-19028.
43. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2007; 282: 5641-5652.
44. Rose C, Menzies FM, Renna M, Acevedo-Arozena A, Corrochano S, Sadiq O, et al. Rilmenidine attenuates toxicity of polyglutamine expansions in a mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 2010; 19: 2144-2153.

45. Harron DW. Distinctive features of rilmenidine possibly related to its selectivity for imidazoline receptors. *Am. J. Hypertens* 1992; 5: 91S-98S.
46. Reid JL. Update on rilmenidine: clinical benefits. *Am. J. Hypertens* 2001; 14: 322S-324S.
47. WHO. International clinical trial registry platform: Huntington's Disease Rilmenidine Safety Trial. URL: <http://apps.who.int/trialsearch/Trial2.aspx?TrialID=EUCTR2009-018119-14-GB>. [22.01.2015].
48. Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nature Biotechnology* 2010; 28: 256-263.
49. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* 2013; 494: 201-206.
50. Shin BH, Lim Y, Oh HJ, Park SM, Lee S-K, et al. Pharmacological activation of Sirt1 ameliorates polyglutamine-induced toxicity through the regulation of autophagy. *PLoS ONE* 2013; 8: e64953.