

# INTRODUCCIÓN



## 4. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la demencia más común en la población anciana, siendo el primer síntoma clásico la pérdida de la memoria reciente. La primera descripción de la enfermedad data de principios de siglo, pero no ha sido hasta hace apenas 30 años cuando la enfermedad se ha relacionado con la mayoría de casos de demencia que sufren personas de edad avanzada.

### 4.1. *Historia*

Cuando Alois Alzheimer publicó sus hallazgos sobre el caso de Auguste D., ya estaba definiendo en su estudio las características clínicas y anatomopatológicas de la enfermedad que llevaría su nombre (Alzheimer 1907). En ese estudio describía en la paciente lo que él denominó “degeneración neurofibrilar”. El nombre de enfermedad de Alzheimer (EA) fue acuñado por Kraepelin, maestro de Alois, en su Manual de Psiquiatría en 1910. El hecho de ser descrita en una persona de edad no excesivamente avanzada contribuyó a calificar la enfermedad como un desorden degenerativo presenil.

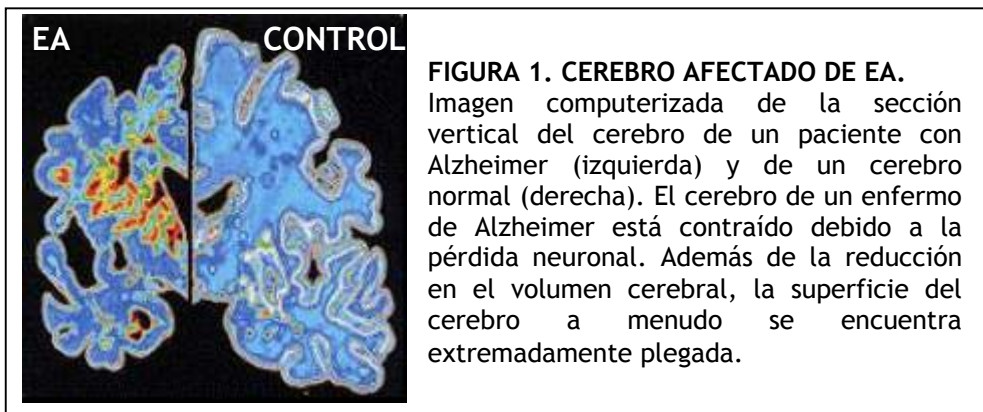
Alzheimer publicó su estudio en 1907 en un trabajo de un par de páginas. En realidad, se trata del resumen de una breve comunicación al XXXVII Congreso de Psiquiatras del Sudoeste alemán del año anterior. Alzheimer fue tan conciso porque, probablemente, su intención no era ni siquiera la de comunicar un caso clinicopatológico completo, ni mucho menos la de describir una nueva enfermedad, sino sólo la de presentar el hallazgo de unas alteraciones neuronales que no había visto previamente. Por otra parte, parece ser que los asistentes al congreso, claramente orientados ya hacia el naciente psicoanálisis, prestaron poco interés al trabajo de Alzheimer. El caso clínico era el de una mujer de 51 años que comenzó a sufrir un delirio de celos contra su marido, seguido de una pérdida de memoria y de un rápido declive cognitivo, desorientación, actividades sin sentido llevando las cosas de un lado a otro o escondiéndolas, agresividad, delirio de persecución, llanto y alteraciones del sueño, que falleció en estado de total invalidez tras cuatro años y medio de evolución. Las anomalías neuronales motivo de la comunicación las describió el propio Alzheimer de la siguiente manera: “En el interior de una célula, que parece normal, una o varias fibrillas destacan más nítidamente por su especial grosor e impregnabilidad...”

La EA fue considerada durante muchas décadas una anomalía rara de escasa presencia en la población. Este concepto sobre la EA se mantuvo durante casi 70 años. Al cabo de ese tiempo se observó que la demencia que afectaba a la mayoría de personas de edad avanzada con declive cognitivo global era equivalente clínica y patológicamente a la descrita por Alois Alzheimer. Así lo que durante muchos años se consideró una anomalía poco frecuente pasó a ser un problema notable para la salud pública.

## 4.2. Aspectos generales de la EA

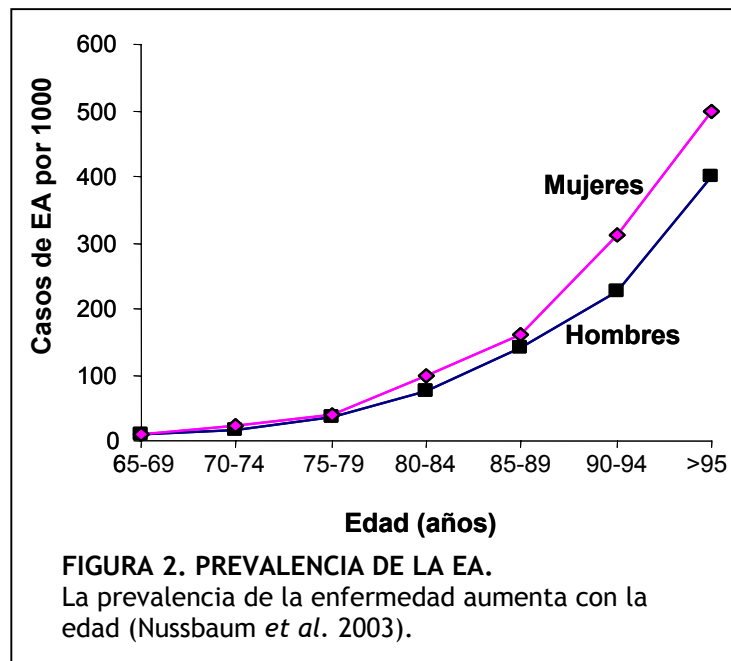
La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común ya que es responsable de aproximadamente dos de cada tres casos de demencia (esta cifra puede variar, según diferentes estudios representa entre el 42 y el 81% de todas las demencias) (Nussbaum *et al.* 2003).

Los primeros síntomas de la enfermedad están asociados a episodios de pérdida de memoria y dificultad con el lenguaje, seguido de disfunciones visuales, espaciales y de comportamiento. La EA se caracteriza clínicamente por la alteración progresiva e irreversible de las funciones cognitivas, y anatomopatológicamente por la pérdida neuronal y la presencia de placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares. En la **figura 1** se puede observar como estas modificaciones afectan al cerebro de un paciente con EA. La enfermedad puede desarrollarse a lo largo de décadas de vida. La mortalidad en la EA es una consecuencia indirecta, debida principalmente a las secuelas negativas derivadas de la pérdida de autonomía, siendo la desnutrición y la aparición de infecciones los sucesos más perjudiciales.



El diagnóstico *in vivo* de la EA se basa en exámenes neurológicos, pruebas neuro-fisiológicas y toma de imágenes del cerebro ("*brain imaging*"). El grado de fiabilidad de este diagnóstico no es absoluto ya que únicamente la detección *post-mortem* de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares permiten el diagnóstico definitivo y la exclusión de otros tipos de demencia (Espinosa *et al.* 1991; Chui *et al.* 1993; Bacskai *et al.* 2002).

La prevalencia de la enfermedad es difícil de determinar de forma definitiva porque la medida depende de varios factores: el criterio de diagnóstico usado, la edad de la población superviviente e incluso factores geográficos y étnicos pueden interferir (Hy *et al.* 2000; Hendrie *et al.* 2001). Si se excluyen personas con demencia clínicamente cuestionable, la EA tiene una prevalencia aproximada del 1% de las personas entre 65 y 69 años. Este porcentaje aumenta con la edad llegando a alcanzar el 40-50% entre personas de 95 años o más (Hy *et al.* 2000). En la **figura 2** se muestra la prevalencia por sexos.

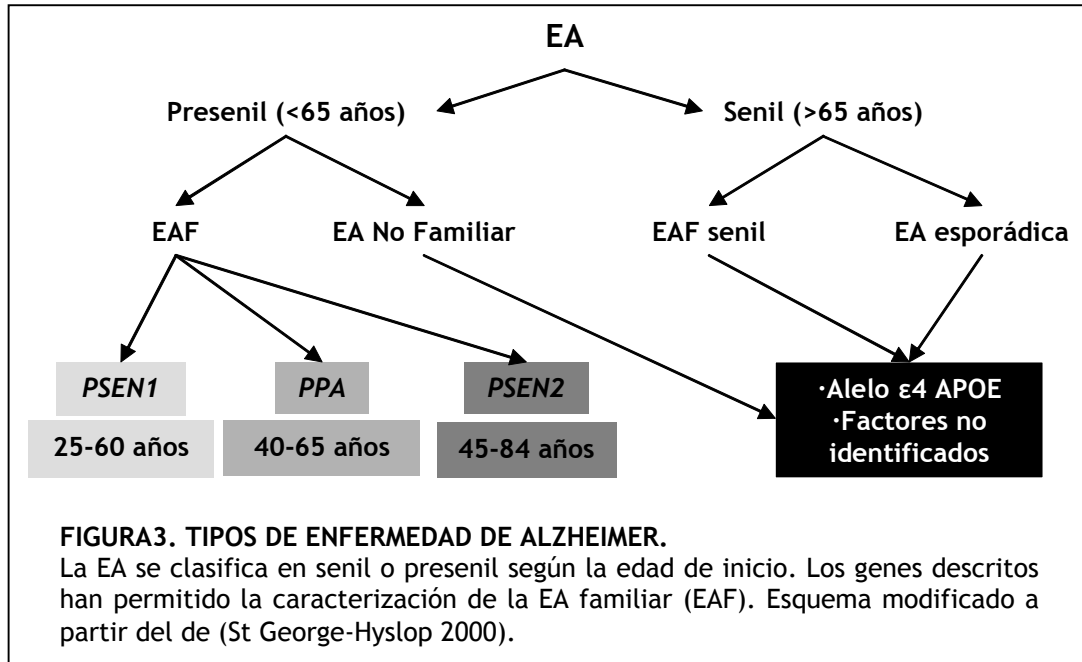


### 4.3. EA familiar y EA esporádica

Clásicamente se distinguen dos tipos de EA según la edad de inicio. Cuando la enfermedad aparece antes de los 65 años de edad se denomina EA de inicio temprano o precoz (“presenil”), mientras que la forma de EA de inicio tardío (“senil”) se da en pacientes mayores de 65 años. Además de iniciarse antes, en la forma de inicio precoz se produce un deterioro cognitivo acelerado en comparación a la de inicio más tardío.

Existen casos de EA presenil que presentan herencia autosómica dominante. A esta forma de EA se le denomina EA familiar (EAF). Estudios en familias con al menos 3 pacientes en 3 generaciones diferentes han evidenciado un patrón de herencia autosómica dominante. Se han identificado tres genes con una penetrancia cercana al 100% cuyas mutaciones causan la EAF. Estos genes codifican para la proteína precursora amiloide (PPA), la presenilina 1 (PSEN1) y la presenilina 2 (PSEN2). De todas maneras los casos de EA que se transmiten con una herencia mendeliana representan sólo el 5% del total de casos de EA (Shastry *et al.* 1999). Por tanto son casos raros, pero su importancia en el estudio de la enfermedad es mucho mayor que su frecuencia. Gracias a estudios con familias afectadas de EAF ha sido posible identificar algunos de los mecanismos patogénicos críticos de la enfermedad. La descripción de Alois Alzheimer correspondía a un caso de EA presenil. Debe mencionarse que la clasificación de la EA en demencia presenil (inicio temprano) y senil (inicio tardío) no es equivalente a EAF (heredada) y EA no familiar puesto que existen casos de EA pre-senil en los que no se ha descrito mutaciones en esos tres genes y no presentan historial familiar. La **figura 3** pretende reflejar la clasificación de los tipos de EA que existen.

La mayoría de casos de EA son no familiares de inicio tardío que se presentan de forma esporádica. Este tipo de EA esporádica (EAE) muestra una etiología compleja debida a factores ambientales y genéticos que individualmente serían insuficientes para desarrollar la enfermedad. El



gen de la apolipoproteína E (*APOE*) ha sido identificado como el mayor factor de riesgo para estas formas complejas de EA aunque sólo el 50% de los casos no familiares de EA son portadores del alelo  $\epsilon 4$ , la variante genética que predispone a padecer la EA.

No existen rasgos clínicos o patológicos que distingan la EAF de la EAE, exceptuando la edad de inicio. Esta falta de rasgos distintivos indica que la influencia de diferentes factores ocasiona un proceso patogénico similar.

#### 4.4. Placas seniles y ovillos neurofibrilares

En la figura 4 se pueden observar las dos características patológicas fundamentales del cerebro de un paciente con EA: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Estas dos agregaciones proteicas permiten el diagnóstico definitivo de EA en la autopsia. Muchos de los síntomas clínicos *in vivo* pueden ser también observados en otras enfermedades neurológicas.



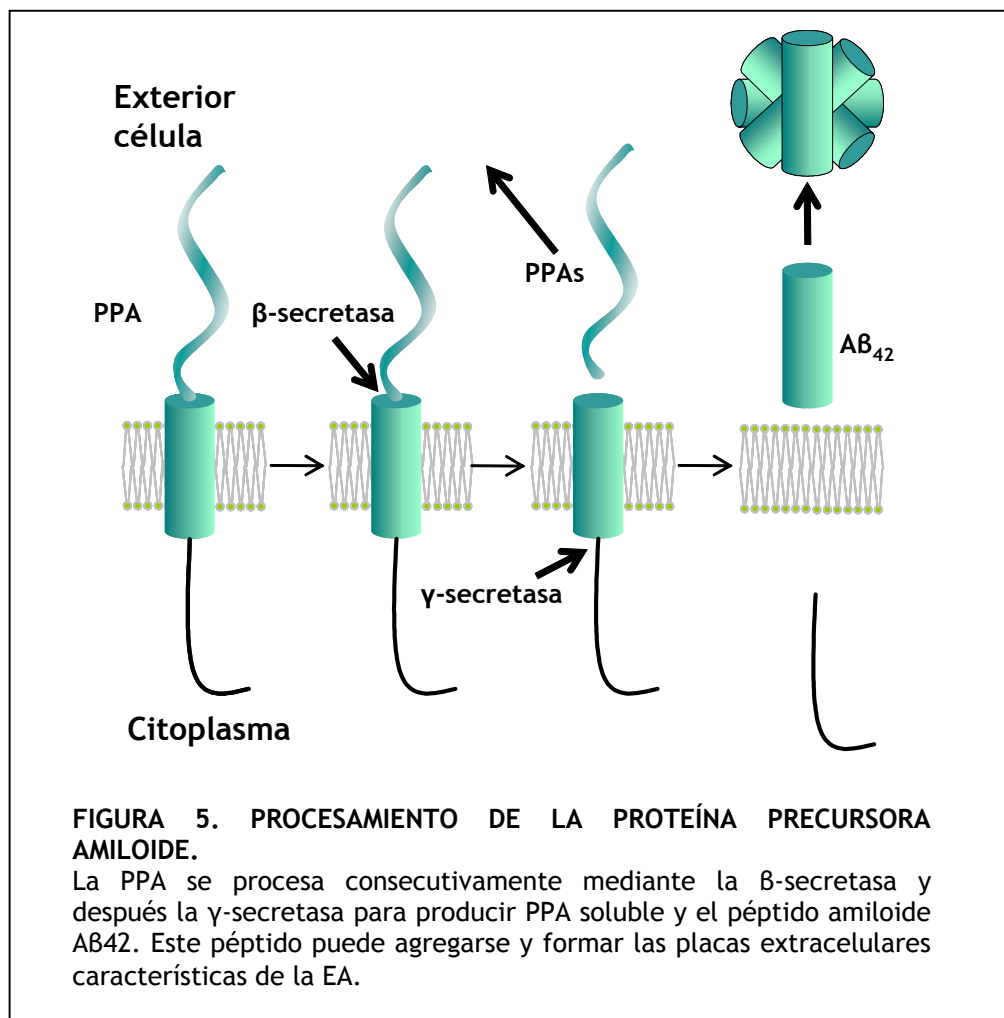
El papel de placas y ovillos en la etiología de la EA no está totalmente aclarado, pero juntos constituyen los marcadores clásicos de la enfermedad. Las placas y los ovillos se hallan predominantemente en los lóbulos temporal y frontal, incluyendo el hipocampo (estructura cerebral

implicada en la memoria y la orientación visual y espacial). En casos muy avanzados de EA estas modificaciones se extienden a otras regiones del córtex, incluyéndose entonces los lóbulos parietal y occipital. La neurodegeneración y pérdida sináptica características de la EA se observan principalmente en las regiones que contienen gran cantidad de placas y ovillos (Ray *et al.* 1998).

#### 4.4.1. Las placas seniles

Las placas seniles son depósitos extracelulares insolubles formados por la agregación del llamado péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Las placas seniles pueden ser clásicas o difusas; las difusas son agregados amorfos de péptido  $A\beta$  que no se encuentran asociados con neuronas distróficas o neuritas anormales. Las placas neuríticas clásicas contienen densos agregados fibrilares de péptido  $A\beta$  y generalmente están asociados a degeneración y pérdida de células neuronales. También se ha indicado que estos dos tipos de placas reflejan el estadio de la enfermedad: las placas difusas se encuentran en estados iniciales de la enfermedad y las clásicas son placas “maduras”, consecuencia del avance de la enfermedad (Behl 1999).

El péptido  $A\beta$  es una combinación heterogénea de péptidos que van de 39 a 43 aminoácidos de tamaño, siendo los de 42 y 43 aminoácidos las especies primarias del péptido amiloide depositado



## Introducción

en las placas seniles. El péptido A $\beta$  deriva del procesamiento de la PPA llevado a cabo por una serie de proteasas, las secretasas - $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$  (Hutton *et al.* 1998b). La secretasa- $\gamma$  parece ser la responsable del origen de un péptido A $\beta$  específico, el A $\beta_{42}$  (figura 5). Este péptido de 42 aminoácidos de tamaño tiene gran importancia patogénica, puesto que puede formar agregados fibrilares tóxicos insolubles. La acumulación de este péptido se ha observado en placas seniles aisladas a partir de muestras de cerebro de pacientes con EA (Iwatsubo *et al.* 1994; Esler *et al.* 2001).

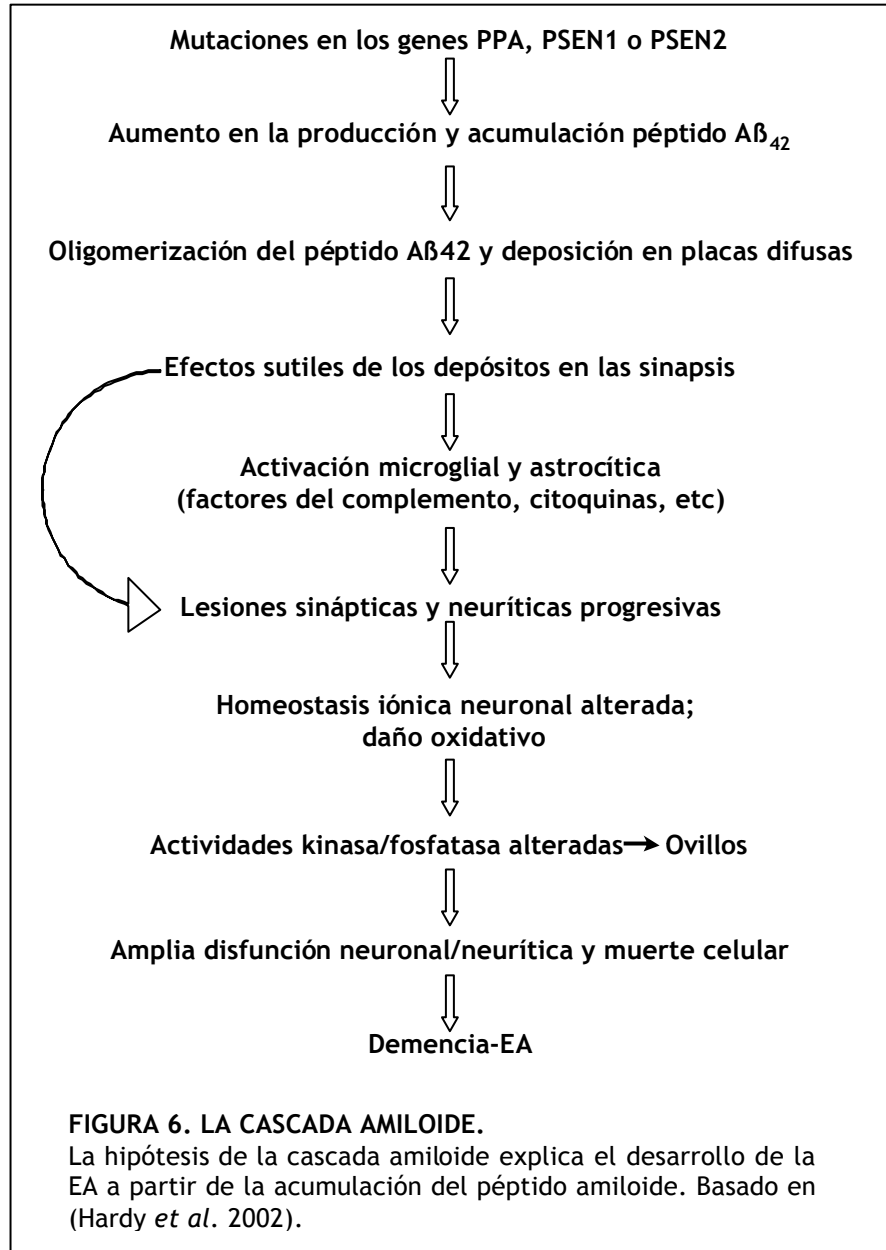
Como el péptido A $\beta$  soluble se agrega espontáneamente en fibrillas que son indistinguibles de las que se encuentran *in vivo* en pacientes con EA, se ha considerado que las placas pueden ser el resultado de la presencia de cantidades elevadas de péptido A $\beta$  (Lendon *et al.* 1997; Selkoe 2002). Esta hipótesis está sustentada con el estudio de ratones transgénicos que sobre-expresan PPA mutante. En estos ratones se halló una concentración de péptido A $\beta$  muy elevada y la presencia de grandes depósitos en las mismas regiones que en humanos con EA (Lendon *et al.* 1997). Estos ratones también demostraban que los depósitos de péptido A $\beta$  no dependen sólo de la concentración de péptido A $\beta$ , ya que animales con una concentración alta de péptido A $\beta$  en algunas regiones cerebrales no desarrollaban placas, por lo tanto debe haber otros factores que intervengan en la aparición de los depósitos amiloides característicos de las placas seniles.

La agregación del péptido A $\beta$  es considerada por muchos autores la principal causa de la patogénesis de la EA. El papel del péptido A $\beta$  parece ser fundamental en la EA y es objeto de las principales hipótesis que explicarían el desarrollo de la EA. Al menos en la EAF su contribución parece decisiva ya que los genes descritos se encuentran implicados en los mecanismos de producción del péptido A $\beta$ . No obstante, el mecanismo por el cual el péptido A $\beta$  causaría la neurodegeneración está en discusión (Abramov *et al.* 2004). En la figura 6 se muestra la hipótesis de la cascada amiloide que explicaría el proceso de neurodegeneración a partir de la acumulación del péptido A $\beta$ . Por otro lado la controversia sobre si las placas y ovillos son causa o efecto ha propiciado diversas teorías, como la que propone que la acumulación de péptido A $\beta$  en la EAE sería una respuesta protectora al daño oxidativo originado por una disfunción mitocondrial (Smith *et al.* 2002). Esta hipótesis se comenta en otros apartados de esta memoria con mayor detalle.

La relación entre depósitos y concentración de péptido A $\beta$  en la EAE es más confusa. Si los aumentos crónicos del péptido contribuyen a la mayoría de casos de EA, entonces sería esperable que el fluido cerebro-espinal (CSF) de pacientes con EAE contuviese elevadas cantidades del péptido. Existen estudios que muestran en pacientes con EAE que la cantidad de péptido A $\beta$  no aumenta ni disminuye en comparación con controles (Tamaoka *et al.* 1996). También existen estudios que demuestran que sólo alrededor del 12% de los pacientes con EAE presentan cantidades elevadas de péptido A $\beta$  en plasma (Ray *et al.* 1998). La interpretación de estos resultados está limitada por la falta de datos sobre los cambios en la cantidad del péptido A $\beta$  durante el desarrollo de la enfermedad. Es plausible que la cantidad de péptido A $\beta$  soluble disminuya después de alcanzar una concentración crítica en la que el péptido A $\beta$  precipitaría y formaría los depósitos. Si esto ocurriera así se encontrarían cantidades de péptido A $\beta$  elevadas previas a la presentación clínica



que no podrían ser detectadas en estos estudios. Para mejorar los conocimientos sobre la dinámica del péptido A $\beta$  sería necesario realizar estudios longitudinales en los que se midiese la cantidad de péptido A $\beta$  soluble y se correlacionase con el riesgo de padecer demencia tardía.



#### 4.4.2. Los ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares compuestos principalmente por la proteína microtubular *tau* (Strittmatter *et al.* 1996). Los ovillos se forman debido a la hiperfosforilación de tau mediante mecanismos que provocan la disociación de tau de los microtúbulos y la formación

## Introducción

espontánea de filamentos insolubles. Los mecanismos que desencadenan el inicio de este proceso no están completamente identificados. Se han podido inducir marcadores antigénicos de hiperfosforilación de tau y depósitos limitados de tau en neuronas *in vitro* mediante tres vías diferentes: aumento de la concentración intracelular de calcio, reducción de la energía disponible, y aumento de la concentración de glutamato. Para los autores esto indica que los ovillos aparecen secundariamente al estrés neuronal (Mattson 1994). Los filamentos anómalos que se producen contribuyen a la formación de inclusiones en los cuerpos celulares (ovillos) y conllevan profundos cambios en el citoesqueleto de las células afectadas.

La patofisiología de la enfermedad es compleja, sobretodo en su forma esporádica, y muy probablemente implica diferentes vías de daño neuronal que se solapan. La prueba de que este hecho puede ser así es que además de las placas y ovillos el cerebro de un paciente con EA muestra otra serie de alteraciones en mayor o menor medida: pérdida sináptica, gliosis, activación de microglía, señales de inflamación y daño oxidativo (Masliah *et al.* 2000).

### 4.5. Genes implicados en la EA

De entre todos los factores genéticos que han sido relacionados con la EA (tabla 1) sólo unos pocos se consideran causantes de la enfermedad y han sido identificados gracias al estudio de casos de EAF. En la EAE, que representa a la mayoría de casos de EA, los factores genéticos que se han

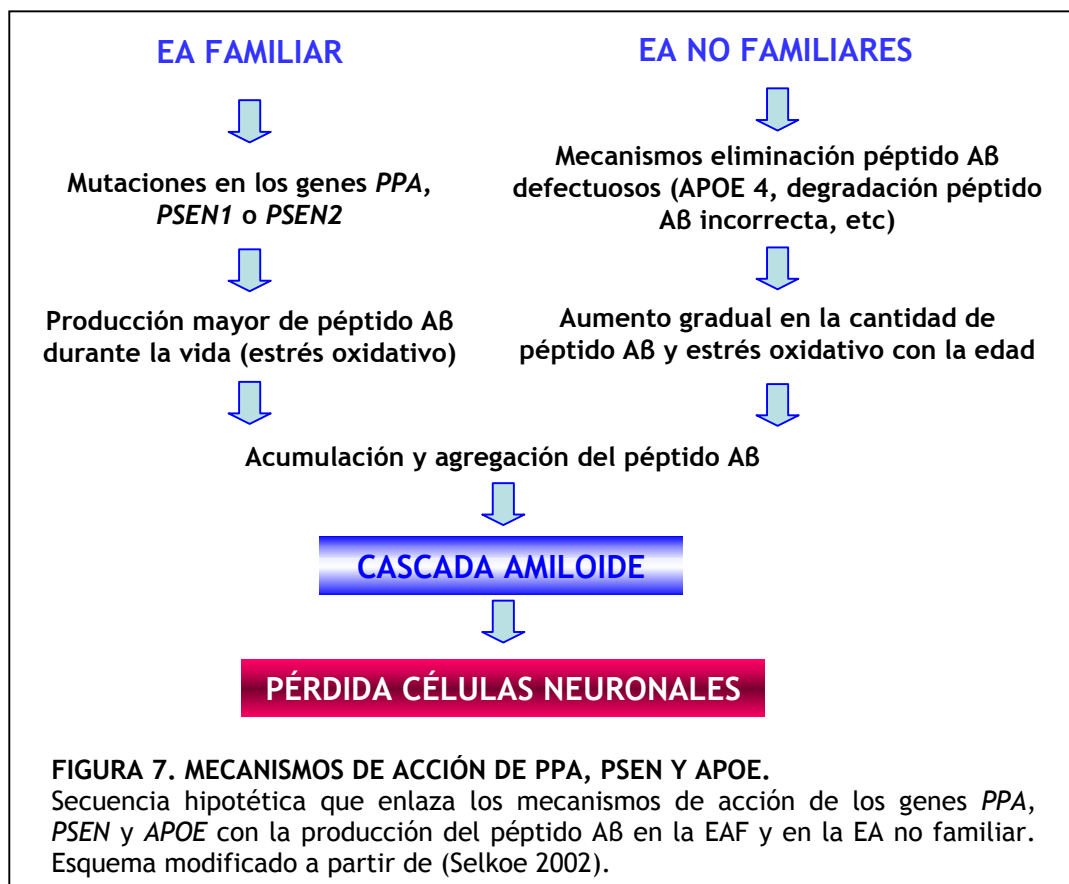
TABLA 1. GENES IMPLICADOS EN LA EA

Nombre	Localización cromosómica	Inicio	Familiar y/o esporádica	Implicación en la EA
<b>PPA</b>	21q21.3-q22.05	Precoz	F	<b>Confirmado</b>
<b>PSEN1</b>	14q24.3	Precoz	F	<b>Confirmado</b>
<b>PSEN2</b>	1q31-q42	Precoz	F	<b>Confirmado</b>
<b>APOE</b>	19q32.2	Tardío	E y F	Confirmado
<b>a2M</b>	12p	Tardío	E	Incierto
<b>LRP</b>	12	Tardío	E	Incierto
<b>LBP-1c/CP2/LSF</b>	12	Tardío	E	Incierto
<b>ACE</b>	17q23	Tardío	E	Incierto
<b>VLDL-R</b>	9pter-p23	Tardío	E	Incierto
<b>BChE</b>	3q26.1-q26.2	Tardío	E	Incierto
<b>ACT</b>	14q32.1	Tardío	E	Incierto
<b>IDE</b>	10q23-q25	Tardío/precoz	E y F (?)	Incierto
<b>Tf C2</b>	3q21	Tardío	E	Incierto
<b>cat D</b>	11p15.5	Tardío/precoz	E y F	Incierto
<b>BH</b>	17q11.2-q11.2	Tardío/precoz	E	Incierto
<b>TGF-B1</b>	19q13.1-q13.3	Tardío	E	Incierto
<b>5-HTT</b>	17q11.1-q12	Tardío	E	Incierto
promotor <b>APOE</b>	19q32.2	Tardío/precoz	E	Incierto
<b>NOS3</b>	7q35	Tardío	E	Incierto
<b>CST3</b>	20p11.2	Tardío	E	Incierto
promotor <b>PSEN1</b>	14q24	Precoz	E y F	Incierto

En **negrita** se encuentran los genes implicados en la EA de inicio presenil, el resto son genes de susceptibilidad (Rocchi *et al.* 2003).

identificado son meros factores de susceptibilidad que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad respecto a población general.

Probablemente estos factores de predisposición interactúan con otros factores ambientales o intervienen en determinadas situaciones patológicas o fisiológicas para ocasionar un efecto patogénico. Asimismo la interacción entre ellos puede facilitar la inducción de la enfermedad mediante un efecto sinérgico. Tanto los genes causantes de la enfermedad como los de susceptibilidad referidos en la **tabla 1** están en su mayoría relacionados con el procesamiento de la PPA y/o con la degradación y eliminación del péptido Aβ. El mecanismo de acción de los genes asociados a la EA se puede observar en la **figura 7**.



#### 4.5.1. *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2*

Los genes más estudiados en la EA son los 3 genes causantes de la EAF (*PPA*, *PSEN1* y *PSEN2*) y el gen de susceptibilidad *APOE*. Mutaciones en estos tres genes provocan la aparición de la forma de EA presenil. Mediante estudios de asociación y secuenciación del DNA se han identificado las mutaciones responsables de esta forma de EA autosómica dominante.

El gen *PPA* está situado en el cromosoma 21, mientras que *PSEN1* se encuentra en el cromosoma 14 y *PSEN2* en el 1. Se estima que las mutaciones en *PPA* representan hasta el 5% de casos de EAF, mientras que mutaciones en los dos genes de presenilinas se estima que explicarían un 80% de los casos. Son más comunes las mutaciones en *PSEN1* que en *PSEN2*. Estos porcentajes varían en función

## Introducción

del estudio consultado, por ejemplo en un estudio realizado en Francia (Campion *et al.* 1999) se determinó una prevalencia de la EAF de 41/100.000. El 16% de las familias con EAF tenían mutaciones en *PPA*, el 50% de las familias presentaban mutaciones en *PSEN1*, no se detectaron mutaciones en *PSEN2*. En el 30% de familias restantes no se pudo identificar un gen responsable. Existen al menos dos bases de datos en internet que recopilan las mutaciones descritas en estos genes (<http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations> y <http://www.alzforum.org>).

En general, el efecto que tienen las mutaciones halladas en estos 3 genes está relacionado con un aumento en la producción de péptido A $\beta$ , como consecuencia de modificaciones en la vía de procesamiento de la PPA mostrada en la **figura 5**, al cambiar los lugares de procesamiento y favorecer la acción de la secretasa- $\gamma$ . Esto haría aumentar la producción del péptido A $\beta_{42}$  en detrimento del péptido A $\beta_{40}$  no patogénico.

### 4.5.1.1. La proteína precursora amiloide

El gen *PPA* consta de 18 exones y produce al menos 8 isoformas de la proteína mediante “*splicing*” alternativo. Las isoformas de PPA más frecuentes en las neuronas proceden de RNA que contienen el exón 15 y poseen mayor capacidad para originar un metabolismo amiloide como el que se muestra en la **figura 5** que las formas no expresadas en la neurona. La isoforma más grande es un polipéptido transmembrana de 770 aminoácidos, con un segmento extracelular N-terminal largo y una cola C-terminal pequeña. Existen al menos dos lugares de proteólisis de la PPA en todas las células. Uno de ellos involucra la acción de la secretasa- $\alpha$  asociada a membrana, la cual corta la PPA por el dominio A $\beta$  y la parte N-terminal extracelular de la PPA es secretada en forma soluble. Esta vía no origina placas amiloides ya que el corte de PPA mediante la secretasa- $\alpha$  impide la formación del péptido A $\beta_{42}$ . La otra vía de procesamiento se da en el compartimento endosomal-lisosomal e involucra a la secretasa- $\beta$ , la cual corta entre los residuos 671 y 672 de la PPA y produce la liberación de la parte N-terminal del péptido A $\beta$ . Además la PPA puede ser procesada en un tercer lugar de corte por acción de secretasa- $\gamma$  cerca del residuo 712, proporcionando la parte C-terminal del péptido A $\beta$ . La combinación de las actividades secretasa- $\beta$  y - $\gamma$  provoca la liberación del péptido A $\beta_{42}$ . El lugar de corte de la secretasa- $\gamma$  es de una importancia crítica puesto que pueden generarse péptidos de diferentes tamaños: el de 40 aminoácidos es el péptido más común producido por el sistema endosomal-lisosomal gracias al corte entre los residuos 712-713, este péptido no tiene carácter amiloidogénico. Los péptidos A $\beta$  de 42 o 43 aminoácidos (A $\beta_{42}$ , A $\beta_{43}$ ) son generados mediante el corte en residuos posteriores al 714 y tienen mayores propiedades fibrillogénicas y neurotóxicas.

La función de la PPA está poco caracterizada. Estudios *in vitro* indican que la secreción de PPA puede actuar como señal autocrina para estimular la proliferación y adhesión celular y apoyar el crecimiento nervioso en células PC12 (Saitoh *et al.* 1989; Milward *et al.* 1992; Villa *et al.* 2001). En otros estudios se ha señalado un posible papel en la transducción de señales (Nishimoto *et al.* 1993) o, en asociación con otras proteínas, en la regulación de la transcripción (Cao *et al.* 2001).

Desde la descripción por parte de Goate y colaboradores de la primera mutación en el gen *PPA* (Goate *et al.* 1991) han ido apareciendo numerosos trabajos describiendo nuevas mutaciones, incluso una de ellas fue hallada en un paciente con EAE, la cual representa la única mutación en *PPA* implicada en EAE (Peacock *et al.* 1994). Todavía no se conoce con precisión el mecanismo de acción de las mutaciones en el gen *PPA* para provocar la EA. Algunas de las mutaciones deben ser responsables de la alteración del metabolismo de la PPA, ya que se encuentran muy próximas a las secuencias del péptido AB flanqueadas por los lugares de corte de las secretasas (Suzuki *et al.* 1994; De Jonghe *et al.* 2001; Nilsberth *et al.* 2001).

#### 4.5.1.2. Presenilinas

Los genes *PSEN1* y *PSEN2* codifican dos proteínas transmembrana de elevada homología (67% de identidad) llamadas presenilina 1 (PSEN1) y 2 (PSEN2) de 467 y 468 aminoácidos respectivamente. Las PSEN muestran un grado de conservación entre especies muy grande. Cada gen consta de un total de 13 exones, 10 de los cuales (exones 3-12) comprenden la secuencia codificadora, mientras que los exones restantes codifican regiones no traducidas (Clark *et al.* 1996; Prihar *et al.* 1996). Hasta la fecha se han identificado más de 130 mutaciones diferentes en el gen *PSEN1*, mientras que en *PSEN2* sólo se han identificado nueve mutaciones de pérdida de sentido (Bertoli-Avella *et al.* 2004).

La estructura de las PSEN contiene 8 dominios transmembrana y una región intracelular hidrofílica en forma de lazo; en condiciones fisiológicas cada PSEN forma un complejo multiproteico con otras proteínas. Su localización principal es el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la membrana nuclear (Kovacs *et al.* 1996). Las PSEN sufren proteólisis fisiológica que genera fragmentos N- y C-terminales estables. En cerebro de mamíferos las PSEN se encuentran principalmente como fragmentos procesados, si bien el significado de este suceso en la función de las PSEN es incierto. Algunas hipótesis sobre la función de las PSEN basadas en modelos animales señalan una implicación en el desarrollo morfogénico (Shen *et al.* 1997). También ayudarían al procesamiento proteolítico de proteínas específicas: hay muchas evidencias que indican que PSEN1 posee actividad  $\gamma$ -secretasa o al menos es cofactor de secretasa- $\gamma$ , enzima implicado en la proteólisis de PPA y Notch (Haass *et al.* 1999; Berezovska *et al.* 2000; Amtul *et al.* 2002). Otros estudios proponen un papel importante de las PSEN en la regulación de la muerte celular programada, en concreto se ha observado que el fragmento C-terminal de PSEN2 puede inhibir la apoptosis (Walter *et al.* 1999).

El mecanismo molecular por el cual una proteína mutada PSEN1 ejercería su efecto patogénico no está completamente dilucidado. En líneas celulares transfectadas con *PSEN1* mutado se ha detectado grandes cantidades de péptidos AB (Citron *et al.* 1997). Experimentos *in vivo* indican que las proteínas PSEN1 mutadas influyen en el procesamiento mediado por secretasa- $\gamma$  de PPA en el extremo C-terminal, favoreciendo el depósito de péptido AB (Borchelt *et al.* 1996; Wolfe *et al.* 1999). Otros estudios demuestran que PSEN1 mutadas provocan el aumento de cantidad de péptido

## Introducción

AB<sub>42</sub> de elevado poder fibrilogénico en el retículo endoplasmático y en compartimentos del aparato de Golgi (Sudoh *et al.* 1998).

Una de las mutaciones descritas en el intrón 8 de *PSEN1* se ha encontrado en cuatro familias asociada a la aparición de una forma de EA de características neuropatológicas peculiares. En estos casos las placas seniles analizadas aparecían como difusas y morfológicamente diferentes a aquellas observadas normalmente en un cerebro con EA (Crook *et al.* 1998). Estas placas no mostraban depósitos fibrilares amiloides en su núcleo y no se encontraban asociadas a neuritas distróficas circundantes ni a reacciones inflamatorias. Estos hechos sugieren que el depósito del péptido AB no sería el suceso clave en la patogénesis de la EA. No obstante, el efecto neurotóxico de AB<sub>42</sub> ocurriría previamente a su agregación extracelular, probablemente al afectar a la homeostasis del calcio, o aumentando la producción de radicales libres, o alterando alguna vía de señalización intracelular (Hardy 1997). Estos procesos son completamente ajenos a la formación de placas y podrían contribuir a explicar la ausencia de correlación entre neuropatología de la EA y distribución de placas amiloides observada en muchos casos.

Otro aspecto interesante es la relación de las PSEN y de la PPA con las caspasas (proteasas aspartil-cisteína capaces de procesar PSEN y PPA). Parece ser que mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* facilitan el procesamiento mediante caspasas. Este hecho demuestra el nexo de unión entre caspasas y apoptosis en la patogénesis molecular de la EA. También se ha descrito que el procesamiento de la PPA mediante caspasas contribuiría a producir toxicidad amiloide (Pellegrini *et al.* 1999; Weidemann *et al.* 1999).

La identificación de mutaciones en *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2* en la EAF no solamente indica un mecanismo común por el que estas mutaciones ejercerían su efecto dañino (por ejemplo el aumento en la producción o reducción en la eliminación de péptido AB<sub>42</sub> y formación de agregados proteicos). Estos datos evidencian una implicación directa del péptido AB<sub>42</sub> y las PSEN en la patogénesis de la EAF (Hardy *et al.* 2002). Sin embargo, no se han identificado mutaciones en el gen de la proteína *tau* en familias con EAF, aunque sí han sido detectadas en otro proceso neurodegenerativo muy raro, que se presenta con degeneración fronto-temporal y parkinsonismo (Lynch *et al.* 1994; Hutton *et al.* 1998a).

### 4.5.2. Apolipoproteína E

El gen *APOE* está localizado en el cromosoma 19, en concreto en la región 19q. La apolipoproteína E consta de 299 aminoácidos y su dominio amino-terminal (residuos 1-191) tiene una forma globular estable en la que reside el sitio de unión al receptor. La parte carboxi-terminal (residuos 216-299) es helicoidal, menos estable, y contiene las zonas de unión a lipoproteína (Weisgraber 1994).

La apolipoproteína E (APOE) es una glicoproteína plasmática de 34.200 Da de masa molar. Principalmente se sintetiza en el hígado, en neuronas y astrocitos de cerebro y también en otros tipos celulares como por ejemplo macrófagos y monocitos (Siest *et al.* 1995). La proteína está implicada en la movilización y redistribución del colesterol durante el crecimiento neuronal y

después de alguna lesión (Mahley 1988). También participa en procesos como la regeneración nerviosa, inmunoregulación y en la activación de algunas enzimas lipolíticas (Mahley *et al.* 2000; Vancea *et al.* 2000).

Utermann y colaboradores describieron por primera vez un polimorfismo de APOE en suero humano (Utermann *et al.* 1979). Posteriormente, Zannis y colaboradores identificaron mediante isoelectroenfoque las tres isoformas mayoritarias de APOE (APOE2, APOE3 y APOE4) y concluyeron que un único locus con tres alelos ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ) era el responsable de este modelo (Zannis *et al.* 1981). Las isoformas APOE2, APOE3 y APOE4 difieren en los residuos 112 y 158 de su secuencia de aminoácidos (figura 8).

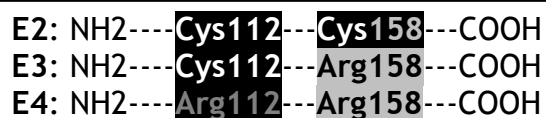


FIGURA 8. POLIMORFISMOS EN APOE.

Las frecuencias alélicas de  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  se estima que son 0,11; 0,72 y 0,17, respectivamente (Zannis *et al.* 1981). El análisis de la distribución alélica en diversas poblaciones demuestra que el alelo  $\epsilon 3$  es el más frecuente en cualquier grupo humano. La frecuencia alélica de  $\epsilon 4$  es mayor en mujeres que en hombres (Payami *et al.* 1996).

La asociación entre el alelo  $\epsilon 4$  y los casos de EA esporádicos y familiares de inicio tardío ha sido demostrada en diversos trabajos. Uno de los primeros y de mayor importancia es el realizado por Corder *et al.*, en el que se describe que el efecto de  $\epsilon 4$  es “dosis-dependiente”: El riesgo de padecer la EA aumenta de 20 a 90% y la media de edad de inicio disminuye de 84 a 68 años cuando hay dos alelos  $\epsilon 4$  (Corder *et al.* 1993). Estas observaciones han llevado a pensar que el efecto primario de  $\epsilon 4$  es el cambio en la edad de inicio de la EA. En familias con EAF se ha observado un efecto similar de  $\epsilon 4$  asociado a mutaciones en el gen PPA (Levy-Lahad *et al.* 1995; Sorbi *et al.* 1995). Familias con EAF causada por mutaciones en el gen PSEN1 no mostraron un efecto significativo del genotipo APOE sobre la edad de inicio de la enfermedad (Van Broeckhoven *et al.* 1994), aunque los mecanismos moleculares por los cuales los diferentes alelos de APOE modifican la edad de inicio de la EA no son conocidos por completo. El alelo  $\epsilon 4$  más bien es un factor de riesgo que un causante definitivo de la EA.

Estudios realizados con personas de edad centenaria han revelado que el alelo  $\epsilon 4$ , el cual además promueve aterosclerosis prematura, es menos frecuente en estos individuos que en controles. La frecuencia del alelo  $\epsilon 2$  se encuentra aumentada de forma significativa en personas centenarias (Schachter *et al.* 1994). El alelo  $\epsilon 2$  parece ser característico de personas longevas y conferiría protección contra la EA (Corder *et al.* 1994).

Las distintas propiedades de unión de las isoformas de APOE al péptido AB (Strittmatter *et al.* 1993) y a la proteína tau (Strittmatter *et al.* 1994) pueden indicar la manera mediante la cual APOE interviene en el desarrollo de la EA. La isoforma APOE4 se une al péptido AB con mayor rapidez que la isoforma APOE3. APOE4 unido a péptido AB forma nuevas monofibrillas que precipitan en estructuras densas (Sanan *et al.* 1994). APOE4 no se une a la proteína tau *in vitro*, al contrario que APOE2 y APOE3 (Weisgraber 1994). Es posible que la interacción entre APOE3 y tau sirva de

protección contra la fosforilación de *tau* y por consiguiente evite la formación de ovillos neurofibrilares (Strittmatter *et al.* 1994).

## 4.6. Otros genes

La investigación sobre los genes *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2* ha permitido conocer muchos aspectos moleculares de la EA. El descubrimiento de formas mutadas de *PPA* y *PSEN* en la EAF refuerza el papel patogénico del péptido A $\beta$ , pero la falta de un mecanismo preciso bien definido de patogénesis ha suscitado la formulación de otras hipótesis para explicar el desarrollo de la enfermedad, sobretodo en lo que respecta a la EA esporádica. Esos tres genes únicamente explican la aparición de la EAF, la cual sólo representa alrededor del 5% de todos los casos de EA, además aproximadamente un 15 % de casos de EAF no presenta mutaciones ni en *PPA* ni en los genes de las presenilinas (tabla 3). La EAE representa la gran mayoría de casos de EA y posee una etiología muy compleja, seguramente debida a que no es producto de la alteración de un único gen. La producción elevada del péptido amiloide, que parece ser la base de la EAF causada por mutaciones en *PPA* o *PSEN*, no se ha observado directamente en la patogénesis de la EAE. Además el alelo  $\epsilon 4$  de *APOE* no se halla en todos los casos de EAE; aproximadamente el 40-60% (dependiendo del grupo étnico) de los pacientes de EA desarrollan la enfermedad en ausencia del alelo  $\epsilon 4$  (Farrer *et al.* 1997). No existe un gen o un mecanismo unificado que explique el origen de la EA esporádica. Se han realizado numerosos estudios de asociación de la enfermedad con diversos genes (tabla 1) pero su papel en la enfermedad no está confirmado. Además de la búsqueda de nuevos genes, se trata de averiguar la interacción entre ellos y otros factores implicados en la EA.

TABLA 3. DISTRIBUCIÓN CASOS EA		
% CASOS TOTALES	GEN RESPONSABLE	% DE CASOS
EA esporádica ~ 90-95 %	<i>APOE4</i>	~ 40-50 %
	¿?	~ 50-60 %
EA familiar ~ 5-10 %	<i>PPA</i>	~ 5 %
	<i>PSEN1</i>	~ 80 %
	<i>PSEN2</i>	~ 15 %
	¿?	

Se ha estudiado la disfunción mitocondrial como uno de los elementos que contribuye al progreso de la EAE. En la mitocondria se desarrollan vías esenciales del metabolismo intermedio, síntesis de aminoácidos, oxidación de ácidos grasos, regulación del calcio, metabolismo esteroide, producción de energía, producción de radicales libres, procesos relacionados con la apoptosis... En el caso de las enfermedades neurodegenerativas el papel de la mitocondria en el metabolismo energético oxidativo es de vital importancia para la célula. Se han descrito numerosas alteraciones



mitocondriales en pacientes con EAE, incluyéndose alteraciones morfológicas, estructurales, bioquímicas y genéticas. Todas estas alteraciones tienen potencialmente la capacidad de influir en un conjunto de funciones cruciales para la célula. La caracterización de estas alteraciones y su interacción con otros mecanismos moleculares puede ayudar a explicar muchos de los defectos descritos en las neuronas de pacientes con EAE.

#### **4.7. La vacuna**

La observación efectuada por Schenk *et al.* de que la aparición los depósitos amiloides podía prevenirse mediante la vacunación con péptido A $\beta$  abrió un campo nuevo en el estudio de la EA (Schenk *et al.* 1999). Estos experimentos con transgénicos se confirmaron en otros laboratorios (Janus *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2000). Se identificaron anticuerpos del péptido A $\beta$  asociados a depósitos amiloides en el cerebro, estableciendo que los anticuerpos atravesaban la barrera hemato-encefálica (Bard *et al.* 2000). Además también se descubrió que la administración pasiva del anticuerpo A $\beta$  que no cruzaba la barrera era efectiva ya que ayudaba al flujo de péptido A $\beta$  desde el cerebro (DeMattos *et al.* 2001), aunque también se observó que si los depósitos pre-existentes eran abundantes, la vacunación era incapaz de reducir su cantidad (Das *et al.* 2001). La relativa facilidad con la que se podía prevenir el depósito de péptido A $\beta$  mediante anticuerpos en los ratones transgénicos llevó a pensar que se podía aplicar una estrategia similar en pacientes con EA. Se inició un ensayo clínico en humanos usando la vacuna llamada AN-1742. Al cabo de unos pocos meses el ensayo se canceló por culpa de la aparición de complicaciones inflamatorias graves en el 5% de los pacientes y la muerte de uno de ellos. Estas complicaciones no se habían observado en los ratones. Al no ser la PPA una proteína propia del ratón, la vacunación con péptido A $\beta$  humano no debería producir una reacción autoinmune. Además el componente C1q de ratón reconoce el péptido A $\beta$  humano pobremente, así que la activación de la cascada del complemento es mucho más débil en ratones que en pacientes con EA. La vacunación incrementa la activación del complemento a través de la formación de complejos antígeno-anticuerpo y esto favorece la fagocitosis en ratones. En pacientes con EA, en los que el complemento ya se encuentra sobreactivado y las placas seniles son relativamente insolubles, esta estimulación aumentaría la destrucción de neuronas (McGeer *et al.* 2003).

#### **4.8. El tratamiento farmacológico de la EA**

El uso de fármacos para tratar los síntomas o para evitar el progreso de la EA se inició en la década de los 90 con la comercialización de los inhibidores de la enzima colinesterasa (O'Brien *et al.* 2001). El principio de estos medicamentos es aumentar la concentración de acetil colina en el cerebro. Las cuatro drogas comerciales más usadas actualmente (tacrina, donezepilo, galantamina y rivastigmina) se basan en ese objetivo. El inconveniente de estos tratamiento es que su administración no puede proporcionar una solución definitiva al problema (Palmer 2002). Estos

## Introducción

compuestos representan tratamientos sintomáticos que han demostrado que contribuyen a mejorar la función cognitiva, el estado general y la realización de actividades de la vida diaria. El cese en su administración provoca el empeoramiento clínico. No existen datos clínicos convincentes que indiquen que estas drogas son capaces de modificar el desarrollo de la enfermedad (O'Brien *et al.* 2001).

El futuro de los tratamientos farmacológicos se dirige claramente a dianas biológicas diferentes, algunas de estas drogas se muestran en la **tabla 2**. Estas nuevas dianas se encuentran relacionadas con la patofisiología de la enfermedad. Esto significa que los fármacos tienen que prescribirse en el inicio o lo más pronto posible del curso de la enfermedad.

TABLA 2. LA FARMACOLOGÍA DE LA EA	
● <b>Inhibidores acetilcolinesterasa</b>	Tacrina, donezepilo, galantamina, rivastigmina
● <b>Antagonistas receptores glutamato NMDA</b>	MK 801; memantina
● <b>Antioxidantes</b>	Vitamina E, Gingko biloba, melatonina, idebenona (CoEnz Q)
	AntiColinesterasas ( $\zeta$ )
	Inhibidores mono-amino oxidasa (MAO-B)
● <b>Agentes que afectan la secreción de PPA</b>	Receptores acetilcolina muscarínicos (acetilcolina, nicotina, carbachol)
	Receptores acetilcolina nicotínicos (ABT-418; galantamina)
	Inhibidores acetilcolinesterasa
	Dehidroevodiamina
● <b>Agentes inhibidores de la agregación de derivados de la PPA</b>	Quelantes de metal: DFO (deferroxamina), clioquinol
	Fragmentadores hoja-B: $iA\beta_5$ , $iA\beta_{11}$
● <b>Vacunas/inmunización</b>	Efectos secundarios: ¿Encefalitis? ¿Hemorragia?
● <b>Inhibidores secretasa-<math>\beta</math></b>	OM99-1; OM99-2; OM00-3 (PPA $\rightarrow$ s $\beta$ -PPA $\rightarrow$ CFT- $\beta$ )
● <b>Inhibidores secretasa-<math>\gamma</math></b>	
	1. Peptídicos: DifluoroKetone (MW167); Naftoil.VF-CHO; ZLF-CHO; Z-LL (MG 132); Z-LL-CHO; Z-VF-CHO (MDL 28 170)
	2. No peptídicos: Inhibidores JK: JLK2; N- [N-(3,5 difluorfenacetil)-L-alanil]-S-fenglicina t-butil ester; L-685,458
● <b>Anti fosforilación de proteínas</b>	Estaurosporina; benzimidazoles, inhibidores de kinasas (glucógeno sintasa kinasa 3, kinasa 5 dependiente de ciclina); litio

(Allain *et al.* 2003)

Las principales áreas para el desarrollo de nuevas drogas en la EA abarcan diversas aproximaciones entre las que hay que destacar las siguientes:

### 4.8.1. Terapia de la complementación

El cerebro de un paciente con EA presenta una serie de deficiencias (hormonas, neurotransmisores, factores tróficos, etc.) las cuales “teóricamente” suponen una diana para la complementación farmacológica. En cualquier caso, es necesario determinar si existe correlación entre una deficiencia y un síntoma de la EA para postular esta complementación. Por ejemplo, la concentración de dihidroepiandrosterona disminuye con el tiempo y la edad pero no parece estar correlacionada con la función cognitiva; por el contrario, la molécula 17 $\beta$ -estradiol mejora las funciones cognitivas (Asthana *et al.* 2001), y protege del estrés oxidativo y de la toxicidad amiloide (Diaz Brinton *et al.* 1998). Estos hechos sugieren el uso de estrógenos o de moduladores selectivos de receptores de estrógeno como tratamiento preventivo de la alteración en la función cognitiva en mujeres. Sin embargo pruebas recientes indican que una vez la EA ha sido diagnosticada, dosis fisiológicas de estrógenos son ineficaces para revertir el defecto cognitivo o para prevenir el deterioro cognitivo característico de la EA (Mulnard *et al.* 2000; Sherwin 2002).

### 4.8.2. Componentes anti-apoptóticos

Uno de los mecanismos que se encuentra activado en la EA según numerosos estudios es la apoptosis. El conocimiento y comprensión de esta cascada bioquímica debería conducir a la determinación de sustancias capaces de bloquear la apoptosis. Las caspasas se encuentran en primera línea de investigación, en particular la caspasa-3. Esta caspasa siempre está presente en las placas seniles y en los ovillos. La caspasa 12 también es objeto de estudio, se localiza en el retículo endoplasmático, que controla la respuesta celular a diferentes tipos de estrés (agregación y plegamiento proteico, radicales libres, toxinas y toxicidad del péptido amiloide). La caspasa 9 (un componente que induce una forma de muerte celular no apoptótica) también ha sido estudiada, así como otros miembros de esta familia. La cascada de las caspasas conduce a la destrucción de proteínas (actina, tau, fodrina) y a la liberación de péptido amiloide. Mediante la destrucción de proteínas de citoesqueleto la cascada de caspasas parece ser responsable de la pérdida inicial de sinapsis y terminales dendríticas, hechos mencionados previamente como algunos de los pasos iniciales en la EA (Selkoe 2002).

### 4.8.3. Sustancias anti-amiloides

El concepto farmacológico para el tratamiento de la EA consiste en: o bien disminuir la síntesis del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, o bien promover su eliminación, papel que deberían llevar a cabo macrófagos y células microgliales, o también consiste en prevenir su depósito y agregación (Esiri 2001). El metabolismo de la proteína de membrana PPA y del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> es de gran complejidad. Los fármacos que influyan en esta cascada deben tener en cuenta la modulación que pueden realizar sobre otros factores: calcio, proteína quinasa C, neurotransmisores (acetilcolina, glutamato y sus receptores, factores tróficos (EGF, NGF), esteroides (algunos de ellos derivados del colesterol) o

## introducción

canales de iones, en concreto los canales de astrocitos (Rossner *et al.* 1998; Simons *et al.* 1998; Racchi *et al.* 1999).

El péptido A $\beta$  procede del procesamiento de la PPA mediante tres enzimas: secretasas  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -, auténticas dianas farmacológicas para moduladores de secretasas (Esler *et al.* 2001). La secretasa-  $\beta$  es la diana ideal para antagonistas de la enzima, en particular para aquellos que dependen de la enzima BACE1 (*Beta site-App-Cleaving Enzyme*) muy representada en el cerebro. Por el contrario el efecto de secretasa- $\alpha$  está asociado a la enzima TACE (*Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme*), el cual a su vez interviene en el metabolismo del receptor de NOTCH, esencial para determinar el destino celular, y también está asociado con otra metaloproteasa: ADAM 10, también implicada en la vía de NOTCH. La secretasa- $\gamma$  condiciona el ratio A $\beta_{40}$ /A $\beta_{41}$ , que parece ser clave en la patogénesis de la EA. Se conocen unos cuantos inhibidores de secretasa- $\gamma$ : péptidos aldehído (calpaina), difluoro-cetona, inhibidores de catepsina D, bloqueadores de catepsina Y, etc.

Otra aproximación es la dirigida a estimular respuestas inmunológicas contra antígenos específicos. Una de ellas es la que se ha mencionado en el apartado “La vacuna”, desarrollada por Schenk *et al.* en ratones y que al trasladar a humanos tuvo que ser suspendida por la aparición de encefalitis (Schenk *et al.* 1999). En la misma dirección, Pfeifer *et al.* han demostrado que la inmunización pasiva en ratones no sólo supone una reducción significativa del péptido amiloide difuso principal sino que también induce un aumento de microhemorragias cerebrales en los vasos cargados de amiloide (Pfeifer *et al.* 2002). Estos resultados reflejan el peligro de que aparezcan complicaciones neuro-inflamatorias con la inmunización con el péptido A $\beta$ .

### 4.8.4. Inhibición de la agregación proteica

Las proteínas que se agregan en las enfermedades neurodegenerativas adoptan una estructura de hoja- $\beta$  que las hace insolubles. Este proceso probablemente se debe a las chaperonas implicadas en la conformación tridimensional de las proteínas. Ciertas isoformas de Apo E pueden actuar promoviendo o estabilizando la disposición espacial en hoja- $\beta$  del péptido A $\beta$ .

Actualmente existen pocos fármacos que impidan la formación de hojas- $\beta$ . La estructura de proteínas, y el sistema proteosoma-ubiquitina en particular, es un campo de estudio prioritario para la EA y también para otras enfermedades neurodegenerativas. La molécula quinacrina, con efectos sobre la estructura tridimensional de ciertas proteínas, es objeto de evaluación en la EA, además esta molécula conserva una estructura similar a la tacrina, el primer producto usado en el tratamiento de la EA (Wiesniewski *et al.* 2001).

### 4.8.5. Drogas que reducen la cantidad de lípidos

Los vínculos entre colesterol y EA se han estrechado gracias al descubrimiento del factor de riesgo Apo E4. Está demostrado que las estatinas, compuestos que disminuyen el colesterol, reducen el riesgo de desarrollar la EA a través de mecanismos que deben ser independientes del colesterol

(inducción de óxido nítrico sintasa, disminución de endotelina-1). El mecanismo propuesto de acción de las estatinas consistiría en que inhibirían la formación de péptido A $\beta$  gracias a que se daría prioridad a la actividad secretasa- $\alpha$  y se disminuiría las actividades  $\beta$ - y  $\gamma$ -. Desgraciadamente, el proyecto PROSPER (*Prospective Study of Pravastatin in Elderly at Risk*) sobre 5000 individuos reveló que la terapia con estatinas no ralentizaba el declive cognitivo a lo largo de 5 años de tratamiento (Shepherd *et al.* 2002). De todas formas, es probable que en el futuro se presenten otros compuestos que disminuyan la cantidad de lípidos como tratamientos preventivos de la EA o de demencias vasculares.

El futuro de los fármacos se dirige claramente a resolver la fisiopatología de la EA y por ello deberían ser curativos y administrados en las fases iniciales de la enfermedad, incluyendo la etapa MCI (*Mild Cognitive Impairment*) caracterizada por un déficit de memoria puro y aislado. Esto sería posible gracias a observaciones hechas con escáneres que realizan tomografías por emisión de positrones, según los cuales el hipometabolismo del córtex entorrinal se puede usar para predecir la futura transformación de individuos normales a MCI y que esos sucesos pueden reflejar de forma muy temprana la disfunción en la conectividad de las sinapsis.

#### 4.8.6. Substancias con impacto en la mitocondria

Resolver la disfunción mitocondrial es también un objetivo para el desarrollo de futuros medicamentos para tratar la EA. La mitocondria, especialmente en la neurona, participa en: 1) producción de la energía celular, 2) producción de radicales libres, 3) activación de ciertos sistemas enzimáticos (cascada de las caspasas por ej.) a través sobretodo del citocromo c, 4) consumo del oxígeno, 5) síntesis de proteínas pro-apotóticas (AIF, *Apoptosis Inducing Factor*), 6-síntesis de proteínas activadoras de caspasas endógenos (IAP, *Inhibitor of Apoptotic Proteins*) vía citocromo c. Otras moléculas asociadas a la mitocondria son la proteína TR3, responsable del control de la actividad génica en respuesta a hormonas esteroideas y que cuando se localiza en la mitocondria libera citocromo c. Miembros de la familia de proteínas BCL— como por ejemplo Bcl-2, un inhibidor de la apoptosis— interfieren con la síntesis mitocondrial de citocromo c. Aunque estos datos no han resultado en innovaciones farmacológicas, hay que señalar que existen en el mercado algunos medicamentos que de una forma más o menos directa normalizan o restauran la función mitocondrial, ya sea limitando la síntesis de productos intermedios citotóxicos, por ejemplo inhibidores de mono-amina oxidasa B, inhibidores de ciclooxigenasa II (anti-COX2), memantina —la cual además es un antagonista no competitivo de receptores de glutamato/NMDA— y muchas otras sustancias clasificadas como vasodilatadores cerebrales y oxigenadores o realizadores cognitivos: ginko biloba, piracetam, almitrine/raubasine, etc. (Hoyer *et al.* 1999). Estos compuestos no tóxicos se prescriben frecuentemente en pacientes de edad avanzada y promueven el metabolismo energético a través de vías intermedias que favorecen la disponibilidad de oxígeno y glucosa en la mitocondria. La mitocondria aparece como el enlace celular entre el oxígeno y otros mecanismos neuroquímicos esenciales de muerte celular como la ubiquitinación vía ubiquitina-E<sub>3</sub> ligasa. La mitocondria también es crucial en los procesos de fosforilación y desfosforilación, los cuales se

## introducción

encuentran en el centro de la fisiopatología de la EA. La enzima fosfatasa 2A que defosforila a la proteína tau tiene actividad reducida en pacientes con EA (Gong *et al.* 1993). La inactivación de esta enzima mediante ácido okadaico provoca la aparición de lesiones similares a las de la EA en animales (Arendt *et al.* 1998). Según estos hechos, los medicamentos que restauren la actividad fosfatasa 2A son otra posibilidad a tener en cuenta, así como los inhibidores de la hiperfosforilación de tau: diclorol (b-D-ribofuranosil) benzimidazol, derivados de estaurosporina, tenilsetam. Se han desarrollado numerosos antioxidantes teniendo en cuenta estos factores (Behl 1999), incluyendo la “*exifone*”, un potente antioxidante que desgraciadamente es tóxico para el hígado y se ha retirado rápidamente del mercado (Bentue-Ferrer *et al.* 1989; Allain *et al.* 1998). En la misma dirección se está realizando en Australia un ensayo clínico con clioquinol dirigido a prevenir la oxidación del péptido A $\beta$  y de metaloproteínas Cu/Zn. Estas proteínas son fácilmente oxidadas y adquieren propiedades neurotóxicas mayores.

## 5. La mitocondria

El término mitocondria (procedente de *mitos*: hilo, filamento y *chondros*: gránulo) fue introducido por Brenda por primera vez en 1898, pero su presencia ya había sido descrita 40 años antes. Kölliker las describió en 1856 y Altmann realizó los primeros estudios sobre su estructura y función en la célula, aunque no fue hasta décadas después cuando se detalló su papel fundamental en el metabolismo energético. En 1962 Luft *et al.* descubrieron una disfunción mitocondrial en un paciente que presentaba hipermetabolismo no tiroideo (Luft *et al.* 1962). Era la primera descripción de una enfermedad humana en la que se hallaba implicado un orgánulo celular.

### 5.1. Características principales

Las mitocondrias se encuentran en el citoplasma de todas las células eucariotas y también en algunos microorganismos (algas, hongos y protozoos). El tamaño medio de una mitocondria es de 0,3-1,0 por 5-10  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Tiene capacidad para desplazarse a través del citoplasma celular y su estructura básica la constituyen dos membranas que se diferencian en su función y su composición. La membrana interna se pliega en unas estructuras denominadas crestas. La membrana mitocondrial externa (MME) está constituida por una bicapa fosfolipídica compuesta por lípidos en casi un 50%. Esta bicapa contiene estructuras proteicas conocidas como porinas que le

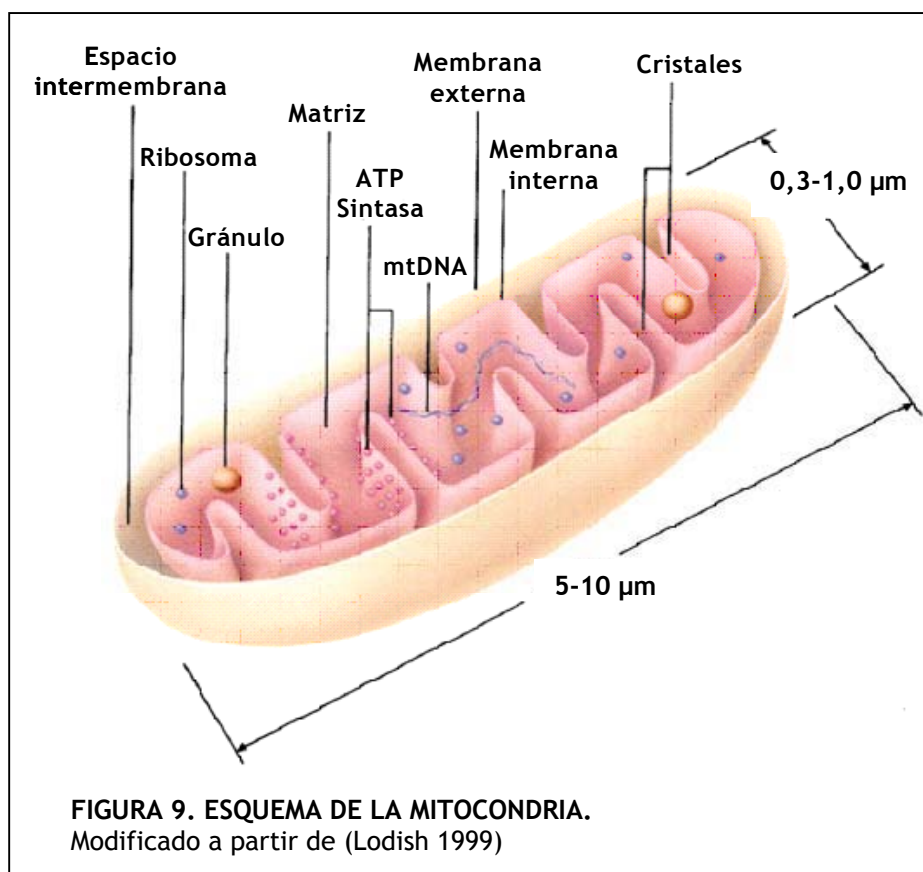


FIGURA 9. ESQUEMA DE LA MITOCONDRIA.  
Modificado a partir de (Lodish 1999)

## introducción

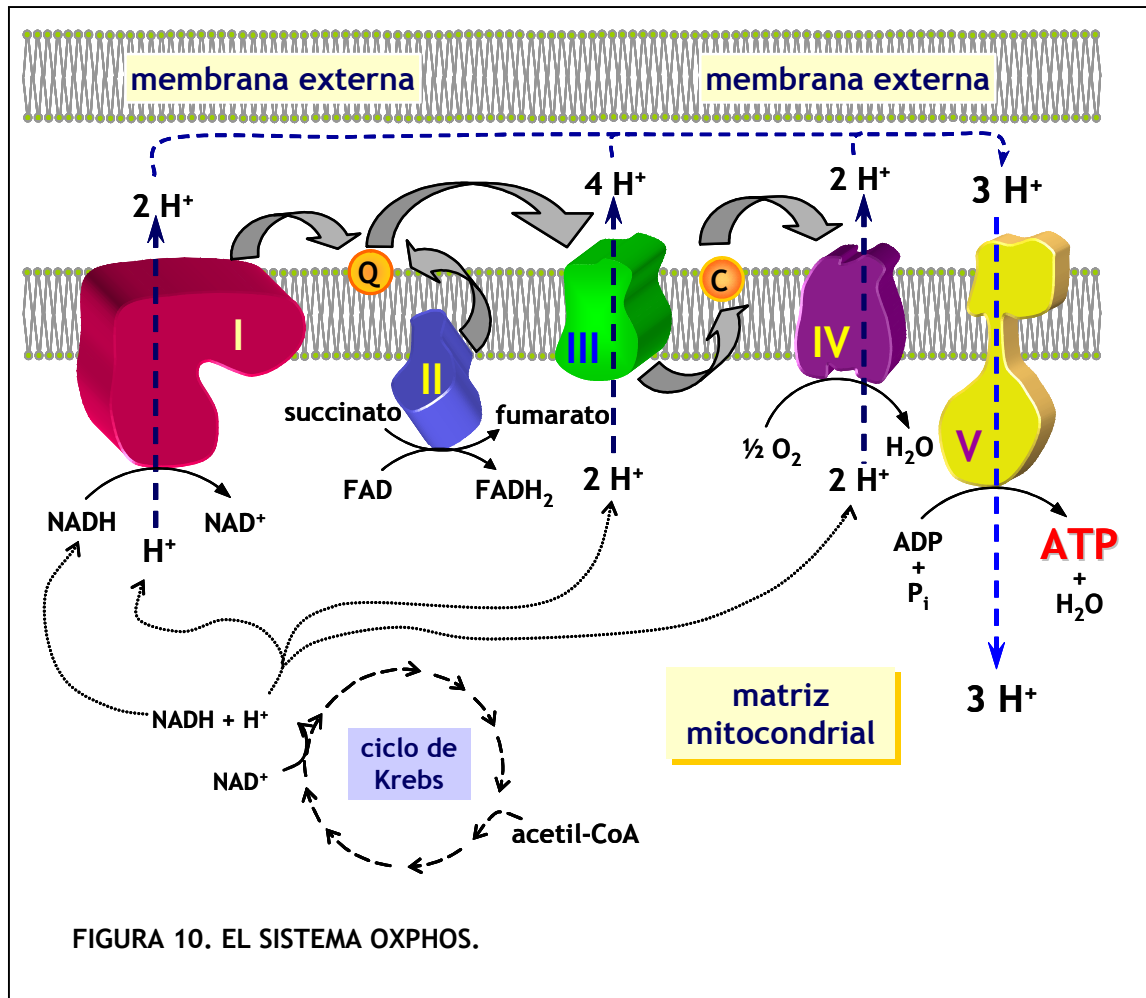
confieren permeabilidad a moléculas  $\leq 10$  kDa. Las crestas posibilitan que la superficie que ocupa la membrana interna sea mucho mayor que la externa. También su estructura es mucho más complicada porque en ella se alojan una serie de proteínas y complejos fundamentales para las funciones metabólicas que se desarrollan en la mitocondria. El contenido en lípidos de la membrana mitocondrial interna (MMI) es de un 20% aproximadamente, con una elevada presencia de cardiolipina. La MMI sólo es permeable al oxígeno,  $\text{CO}_2$  y agua. Las dos membranas que separan a la mitocondria del citoplasma celular definen dos espacios en el interior de la mitocondria: la matriz y el espacio intermembrana (**figura 9**) (Lodish 1999).

## 5.2. Función de la mitocondria en la célula

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para el mantenimiento funcional y la viabilidad de las células. En las mitocondrias tiene lugar la producción de energía en forma de ATP. En su interior también se realizan otras funciones importantes para la célula, como por ejemplo la termogénesis (producción de calor mediante el desacoplamiento de la respiración oxidativa y la síntesis de ATP en el tejido adiposo marrón), la homeostasis del calcio en la matriz mitocondrial, la síntesis del grupo hemo en el hígado y en las células precursoras de eritrocitos y también está implicada decisivamente en los mecanismos de apoptosis. Además estos orgánulos participan en la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, fosfolípidos, pirimidinas y otros metabolitos.

La función principal de las mitocondrias es la producción de ATP a través del acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la respiración aeróbica (sistema OXPHOS, **figura 10**). En el año 1961 el bioquímico Peter Mitchell (premio Nobel de Química en 1978) propuso por primera vez un mecanismo por el cual las células derivaban ATP a partir del metabolismo oxidativo. Este sistema proporciona a la mayoría de tipos celulares alrededor del 90% de su requerimiento energético. En la mitocondria entran ácidos grasos que se oxidan en acetilcoenzima A (acetilCoA) durante el proceso denominado  $\beta$ -oxidación. El piruvato (producto final de la glucólisis en el citoplasma celular) también entra en la mitocondria y se descarboxila gracias a la piruvato descarboxilasa, la cual incorpora la molécula del coenzima A produciendo acetilCoA. La parte acetato de esta molécula se oxida en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. Al final de este ciclo se generan dos moléculas de  $\text{CO}_2$  y 4 pares de átomos de hidrógeno que se transfieren al dinucleótido de adenina y nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ) y al dinucleótido de flavina y adenina (FAD) los cuales se reducen en NADH y  $\text{FADH}_2$  respectivamente. Estas dos moléculas presentan una capacidad donadora de electrones muy elevada, esta energía se va liberando a lo largo de una serie de reacciones redox en las crestas mitocondriales con la participación de complejos enzimáticos y coenzimas. Esta serie de reacciones constituye la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) o cadena de transporte de electrones (**figura 10**). La cadena respiratoria es un sistema complejo que debe responder a las necesidades energéticas de la célula. Mientras que hay tipos celulares con necesidades constantes (por ejemplo los hepatocitos) también los hay que presentan necesidades variables en cortos períodos de tiempo (es el caso del músculo esquelético).





La CRM está formada por una serie de complejos multiproteicos localizados en las membranas de las crestas mitocondriales que atraviesan la bicapa lipídica y sobresalen hacia la matriz y el espacio intermembranoso. Las coenzimas están disueltas en lípidos y difunden a lo largo de la membrana o a través de su superficie. El complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa o también llamado NADH deshidrogenasa) es el de mayor tamaño y está formado por al menos 42 polipéptidos. Su función es catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II (succinato CoQ oxidoreductasa) se compone de 4 péptidos y cataliza la oxidación del succinato a fumarato (en el ciclo de Krebs) y transfiere también los electrones a la ubiquinona (en la CRM). Aproximadamente 10 subunidades constituyen el complejo III (citocromo c oxidoreductasa). El citocromo c, localizado en el espacio intermembrana, participa en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El complejo IV (citocromo c oxidasa o también conocido como COX), compuesto de 13 subunidades, transfiere 4 electrones desde el citocromo c a una molécula de oxígeno, creándose una molécula de agua.

Esta transferencia de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria se aprovecha de forma indirecta para sintetizar ATP. Al principio de la cadena las moléculas reducidas NADH y FADH<sub>2</sub> transfieren los electrones del hidrógeno al siguiente complejo enzimático y liberan los protones a la

## Introducción

matriz mitocondrial mediante mecanismos desconocidos hasta el momento. Los electrones fluyen entre los complejos gracias a un gradiente electroquímico propiciado por los complejos III y IV y al transporte realizado por la ubiquinona y el citocromo c. La transferencia de electrones llevada a cabo entre los complejos I-IV es efectuada a través de subunidades portadoras de grupos prostéticos, por ejemplo grupos hierro-sulfuro en los complejos I, II y III, o grupos hemo-hierro en el citocromo c y complejo IV. La energía liberada durante este proceso de transferencia se usa en los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. La acumulación de protones en este espacio frente a los electrones de la matriz, crea un potencial eléctrico que tiende a llevar a los electrones de nuevo a la matriz. La distribución asimétrica de iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de la membrana interna contribuye a la creación de un gradiente químico. La membrana interna presenta una impermeabilidad extrema a los protones y se hace necesaria la intervención del complejo V (F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATP sintasa) para que puedan ser transportados de nuevo al interior de la mitocondria. Esta entrada de protones genera energía que es usada para sintetizar adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) y fósforo inorgánico ( $\text{P}_i$ ). El ATP producido por la mitocondria debe ser intercambiado por ADP citosólico mediante el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), el cual tiene diversas isoformas específicas de tejido. El complejo V está compuesto por 12-14 polipéptidos y se pueden distinguir dos regiones: la F<sub>0</sub>, que está asociada a la membrana y se cree que se encarga de transportar electrones; y la F<sub>1</sub>, que representa la parte catalítica de la molécula insertada en la matriz mitocondrial.

Dos requisitos son necesarios para que se produzca la fosforilación oxidativa: integridad de la membrana interna (de forma que los protones que vuelven a la matriz solamente lo puedan hacer mediante un proceso acoplado a la síntesis de ATP) y concentración elevada de protones en el espacio intermembrana.

Asimismo la mitocondria necesita para mantener su estructura y su función alrededor de 850 polipéptidos codificados en el DNA nuclear (nDNA). Estas proteínas se sintetizan en el citoplasma y se importan al interior del orgánulo, donde se distribuyen en alguno de los cuatro compartimentos principales de la mitocondria: la MME, la MMI, el espacio intermembrana y la matriz, localizada en el interior y considerada el “citoplasma” del orgánulo (ver **figura 9** para esquema detallado). Aproximadamente 70 de esas 850 proteínas son componentes estructurales de los complejos de la cadena espiratoria (**tabla 4**), y no menos de 20 son necesarias para acoplar y mantener los complejos en el orden adecuado que permita su funcionamiento.

**TABLA 4. CONTRIBUCIÓN DE LOS GENOMAS A LOS COMPLEJOS DEL SISTEMA OXPHOS**

	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	Complejo V	TOTAL
mtDNA	7	0	1	3	2	13
nDNA	~33	4	10	10	12	> 69

### 5.3. El mtDNA

La mitocondria es el único orgánulo celular en animales, exceptuando el núcleo, que contiene genoma y maquinaria genética propios. El genoma mitocondrial humano es una molécula circular de doble cadena de DNA de 16,6 kb (figura 11).

Este DNA mitocondrial (mtDNA) codifica 13 polipéptidos que son componentes de la CRM (figura 10). El mtDNA tiene 24 genes más, de los cuales dos de ellos darán lugar a RNA ribosomales (rRNA) y 22 a RNA de transferencia (tRNA). Estos RNA son necesarios para la síntesis de los 13 polipéptidos que forman parte de las diferentes subunidades de los complejos proteicos que constituyen la cadena respiratoria (figura 11).

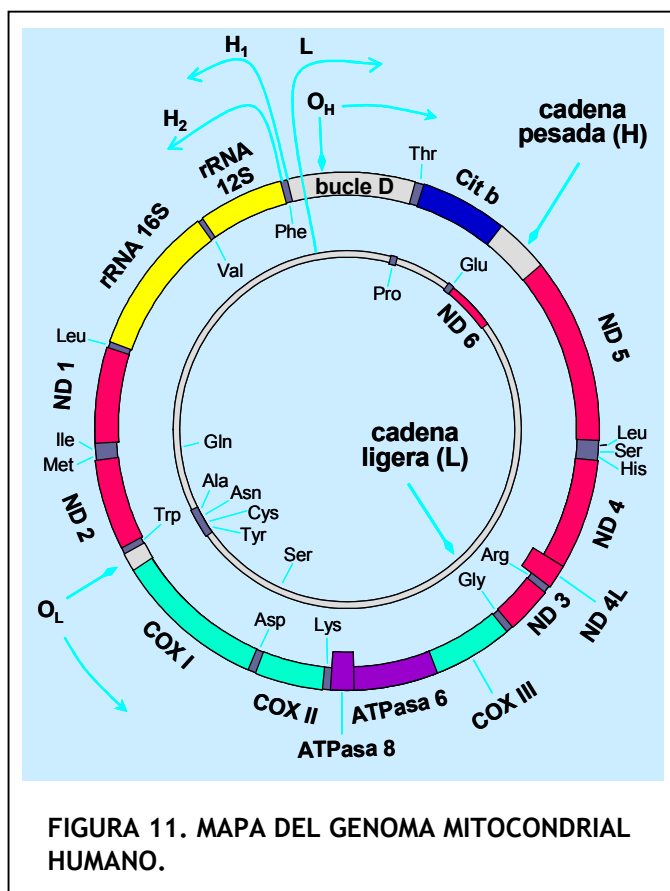


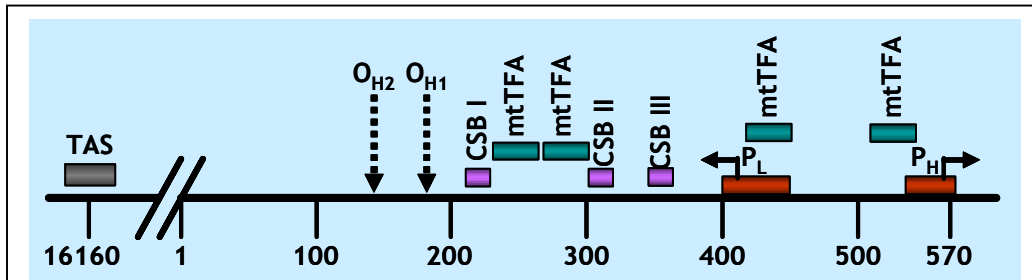
FIGURA 11. MAPA DEL GENOMA MITOCONDRIAL HUMANO.

El mtDNA presenta una estructura muy compacta, en la cual la mayoría de genes están codificados en la cadena pesada. La cadena ligera solamente contiene la información de la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa y ocho tRNA. La única región que no codifica ningún gen es la región del bucle D (D de desplazamiento, ya que en las fases iniciales de la replicación de la cadena pesada una sección de esta se desplaza y se forma una triple hélice).

En el bucle D se encuentra la región control (CR), en ella se encuentran zonas “hipervariables” por la elevada variabilidad de secuencia que presentan. La CR que incluye el bucle D (entre los genes tRNA<sup>Phe</sup> y tRNA<sup>Pro</sup>, de 1.122 pares de bases (pb) contiene los dos orígenes de replicación de la cadena pesada y los promotores de la transcripción de las dos cadenas (figura 12). En la CR se localizan los elementos que regularán la transcripción y la replicación del genoma mitocondrial, sucesos muy estrechamente ligados en la mitocondria (Shadel *et al.* 1997). Recientemente Coskun *et al.*, han descrito mutaciones en esta región asociadas a la EA (Coskun *et al.* 2004). En el capítulo siguiente se expone con mayor detalle este descubrimiento.

#### 5.3.1. Genética mitocondrial

El genoma mitocondrial posee algunas características particulares que lo distinguen del genoma nuclear, las cuales se encuentran resumidas en la tabla 5. Una de las características que se ha



**FIGURA 12. ESQUEMA DE LOS NT 16.000-570 DE LA REGIÓN CONTROL DEL mtDNA.**

Los números designan la posición en el mtDNA y las cajas de colores representan elementos reguladores. La CR incluye los promotores P<sub>L</sub> y P<sub>H</sub> de las cadenas L (ligera) y H (pesada), los sitios de unión del factor A de transcripción mitocondrial (mtTFA), los bloques de secuencia conservada (CSB) I, II y III, y los orígenes de replicación 1 y 2 de la cadena H (O<sub>H1</sub> y O<sub>H2</sub>). TAS: Secuencia de asociación y terminación.

comentado previamente es la densidad de su estructura. La cadena pesada presenta sus genes de forma continua sin secuencias intrónicas. Las secuencias intergénicas son escasas, siendo la mayor de ellas el bucle D. Otro factor que muestra el grado de compactación del mtDNA es el hecho de que la mayoría de genes que codifican proteínas carecen de codón de terminación; después del último codón con sentido se encuentra una T o TA, e inmediatamente a continuación se inicia otro gen. El codón de terminación se formará después de la transcripción mediante poliadenilación del extremo 3'.

El código genético mitocondrial difiere del nuclear en cinco codones: UGA codifica triptófano en lugar de ser un codon stop; AGA y AGG son codones stop en lugar de codificar arginina, AUA y AUU codifican metionina en vez de isoleucina, estos dos junto con el codón AUG son los tres codones de inicio posibles.

La herencia del mtDNA es esencialmente vía materna (Giles *et al.* 1980). El ovocito, con más de 100.000 moléculas de mtDNA, es quién aporta la inmensa mayoría de mitocondrias en la fecundación. Aunque parece ser que las escasas moléculas de mtDNA aportadas por el espermatozoide se eliminan al reconocerse señales de ubiquitinación (Sutovsky *et al.* 2000), se ha descrito herencia esporádica de mtDNA paterno en mamíferos, incluyendo en humanos (St John *et al.* 2004). De todas formas, no parece ser que su participación en el genotipo de la descendencia sea apreciable.

La elevada tasa de mutación del mtDNA en comparación a la del DNA nuclear (Neckelmann *et al.* 1987) probablemente es consecuencia de la falta de histonas que protegerían a la doble hélice de mtDNA. Por otro lado, el mtDNA está expuesto al daño producido por un exceso de moléculas derivadas de especies del oxígeno reactivas (ROS) generadas en la fosforilación oxidativa. Este efecto perjudicial está favorecido por la posición en la mitocondria en que se encuentra el mtDNA: en contacto con la membrana mitocondrial interna, muy próximo a la CRM que genera ROS.

TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL

- Estructura muy densa
- Código genético difiere ligeramente del universal
- Herencia materna
- Tasa de mutación 10-20 veces mayor que la del DNA nuclear
- Replicación independiente de la división celular
- Distribución al azar entre las células hijas
- Efecto umbral en el fenotipo

Aunque se han descrito algunos mecanismos de reparación del mtDNA en respuesta a daños específicos (Shen *et al.* 1995; Stierum *et al.* 1999), hasta el momento no parece que la mitocondria posea un **sistema general de reparación** de mutaciones, lo cual puede provocar que ciertas mutaciones se acumulen a lo largo de la vida. Por otro lado, la **recombinación** es un mecanismo que hasta hace poco no se consideraba en absoluto en la mitocondria, pero actualmente existen estudios a favor y en contra de su existencia (Elson *et al.* 2001; Eyre-Walker *et al.* 2001; Piganeau *et al.* 2004).

La **homoplasmia** corresponde a la situación en la que todas las moléculas de mtDNA que contiene la mitocondria son iguales. La **heteroplasmia** hace referencia a la coexistencia de moléculas salvajes y moléculas mutadas de mtDNA en la mitocondria. La proporción entre moléculas normales y mutantes de mtDNA puede variar y determina el grado o porcentaje de heteroplasmia de la célula. Durante la división celular las mitocondrias se distribuyen al azar entre las células hijas, recibiendo diferentes porcentajes de mtDNA mutantes. A este fenómeno se le denomina **segregación replicativa** (Wallace 1986). La consecuencia de este proceso es que el porcentaje de moléculas mutantes puede variar entre tejidos y también puede ir cambiando a lo largo del tiempo.

El **fenotipo** de una célula, tejido o individuo heteroplásmico depende del porcentaje de mtDNA mutante. Si el número de moléculas mutantes es pequeño se producirá una complementación de la función por parte de las moléculas normales. Si la proporción de moléculas anómalas fuera aumentando la complementación se haría más difícil, de manera que podría llegar un momento en que no sería posible suplir la función, es entonces cuando se manifestaría un fenotipo patológico. De esta manera el fenotipo se expresa de acuerdo con un **efecto umbral**. La enfermedad aparece cuando la producción de ATP en el tejido heteroplásmico es insuficiente para asumir una actividad normal. Las necesidades energéticas de cada tejido son particulares y específicas, así como el número de mitocondrias y de moléculas de mtDNA de cada uno de ellos. Por estos motivos a veces

se puede observar que un determinado porcentaje de moléculas mutantes de mtDNA produce repercusiones completamente diferentes según el órgano afectado: tanto puede haber una actividad normal como una supresión total de la función. Los órganos y tejidos que más sufren cuando hay una deficiencia en la síntesis de ATP son: ojos, sistema nervioso, músculo, corazón, páncreas, riñón e hígado.

### 5.4. Mitocondria y enfermedad

El primer indicio según el cual la mitocondria intervenía en una enfermedad humana no apareció hasta mediados del siglo XX. En 1958 se identificaron en una paciente sueca síntomas severos de transpiración, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y debilidad. La paciente había sido tratada con anterioridad de hipertiroidismo pero la mejoría en su estado había sido mínima. Las pruebas de laboratorio revelaron que su tasa metabólica era del 200%, con un peso muy bajo (37kg) y una temperatura corporal que alcanzaba más de 38°C. Los estudios bioquímicos demostraron que la paciente tenía parcialmente desacoplada la CRM y esto provocaba la excesiva generación de calor y el alto consumo calórico (Luft *et al.* 1962). A pesar de que la causa primaria en la enfermedad de Luft continúa sin ser identificada, la enfermedad se asocia con la liberación espontánea de calcio almacenado en la mitocondria, lo cual alteraría su homeostasis y originaría diversas respuestas celulares (DiMauro *et al.* 1976). El descubrimiento de la enfermedad de Luft desveló el papel inadvertido hasta entonces de la mitocondria en las enfermedades humanas. El camino para explorar el campo de las enfermedades mitocondriales quedaba inaugurado. Desde entonces, más de 120 enfermedades mitocondriales humanas han sido descritas (Luft *et al.* 1993). La mayoría de ellas afectan selectivamente a poblaciones celulares del sistema nervioso central o del músculo esquelético. Ambos tejidos son post-mitóticos y sus células presentan un consumo energético muy elevado. Algunas de esas enfermedades están asociadas a mutaciones en el mtDNA y deficiencias en la cadena de transporte de electrones.

El concepto de enfermedad mitocondrial está actualmente restringido a aquellas enfermedades que tienen alterada la función de la CRM, aunque existen enzimas mitocondriales también implicadas en enfermedades del metabolismo intermediario, por ejemplo en alteraciones de la β-oxidación o del ciclo de Krebs. En la EA se han hallado diferentes alteraciones de la CRM, siendo la más frecuente la disminución de la actividad del complejo IV. Este defecto se encuentra comentado ampliamente en el siguiente capítulo de esta tesis.

La CRM está formada por polipéptidos codificados por la misma mitocondria y sintetizados en su matriz y también por subunidades codificadas en el DNA nuclear, sintetizadas en el citosol y guiadas a la MMI mediante péptidos señal. Este hecho posibilita que las enfermedades mitocondriales además de deberse a defectos en el genoma mitocondrial puedan deberse también a defectos en el genoma nuclear. Otros posibles desencadenantes de una enfermedad mitocondrial pueden ser: alteraciones en las translocasas encargadas del transporte de metabolitos desde el citoplasma a la matriz mitocondrial, defectos en la comunicación entre los dos genomas o en los mecanismos

importadores de proteínas del citoplasma. Este último caso es el del síndrome de Mohr-Tranebjaerg, o síndrome de sordera, distonia y atrofia óptica (Koehler *et al.* 1999). Además hay que recordar que todos los factores necesarios para la replicación del mtDNA se encuentran codificados en el genoma nuclear, por lo que no es de extrañar que mutaciones en él afecten al funcionamiento mitocondrial.

El descubrimiento en la última década de un gran número de mutaciones en el mtDNA causantes de enfermedades ha originado un nuevo campo dentro de la genética: la genética molecular mitocondrial. Cualquier tipo de alteración del mtDNA o que afecte al mtDNA tiene como consecuencia potencial la modificación de la actividad de la CRM y la disminución en la producción de ATP.

### 5.4.1. Tipos de alteraciones del mtDNA

Las alteraciones del mtDNA debidas a modificaciones en su secuencia pueden ser reordenamientos: deleciones y duplicaciones; o bien pueden afectar a puntos concretos: mutaciones puntuales. Dada la compactación del mtDNA las deleciones, sencillas o múltiples, implican la pérdida de genes mitocondriales o parte de ellos. En general se ha observado que las deleciones afectan a la región comprendida entre el gen del citocromo b y el de la subunidad I de la citocromo oxidasa (figura 11). La lista de deleciones identificadas es extensa, desde una kilobase (kb) hasta ~11 kb (<http://www.mitomap.org>). Dos deleciones identificadas se encuentran con mayor frecuencia: representan el 60% de los casos, por eso reciben el nombre de deleciones comunes. El tamaño de estas deleciones es 7.436 y 4.977 pb respectivamente. A pesar de que la mayoría de deleciones se presentan de forma esporádica también se han descrito unos pocos casos con herencia materna y con herencia mendeliana dominante y recesiva. El mecanismo que provoca la aparición de deleciones en el mtDNA no está aún totalmente aclarado.

En las duplicaciones se encuentra la presencia repetida de algún segmento del mtDNA. El mtDNA duplicado de tamaño entre 23 y 26,5 kb podría ser un estado intermedio previo a la formación de moléculas delecionadas (Poulton *et al.* 1993).

En tejidos con una tasa de renovación elevada, como por ejemplo el tejido sanguíneo, es raro detectar deleciones. En estos tejidos es posible que los mtDNA delecionados se pierdan por selección clonal. En cambio en tejidos postmitóticos (cerebro, músculo...) las deleciones se acumulan. Sí que se han detectado duplicaciones en sangre, lo que permite la identificación de la enfermedad sin tener que practicar una biopsia al paciente.

En el año 1988 Wallace y colaboradores describieron una mutación puntual en el gen ND4 (Wallace *et al.* 1988). Desde entonces se han identificado alrededor de 100 mutaciones puntuales en el mtDNA que afectan tanto a genes que codifican polipéptidos de la CRM como a genes de tRNA y de rRNA. Las mutaciones puntuales se nombran de acuerdo con su posición en la cadena ligera de la secuencia de referencia de Cambridge (Anderson *et al.* 1981).

## introducción

Las enfermedades mitocondriales asociadas a mutaciones y deleciones del mtDNA tienen como característica la gran heterogeneidad de las manifestaciones clínicas que presentan. Una mutación concreta en el mtDNA puede producir fenotipos muy variables y mutaciones diferentes pueden provocar síntomas similares. Tanto las deleciones como las mutaciones puntuales que afectan a genes de tRNA y rRNA pueden alterar la síntesis proteica mitocondrial. En general las enfermedades con estas alteraciones se presentan como enfermedades multisistémicas, con acidosis láctica y fibras rojas desestructuradas. A diferencia de la diversidad de la expresión fenotípica que caracteriza a las mutaciones del mtDNA, las mutaciones en el nDNA responsables de enfermedades mitocondriales causan un fenotipo bien definido desde un punto de vista clínico.

Hasta el momento los únicos complejos de la CRM en los cuales se han descrito mutaciones patogénicas en el DNA nuclear son el I, el II y el IV. Respecto al complejo IV, ninguna mutación afecta directamente a subunidades del complejo sino a proteínas necesarias para el ensamblaje de las subunidades. La falta de mutaciones en subunidades de los complejos III, IV y V codificadas por el núcleo quizá se debe a que estas mutaciones podrían ser incompatibles con la vida. Las actividades de los complejos I y II son paralelas, de forma que si una falla, la CRM puede seguir funcionando mediante la acción de la otra. En cambio, los complejos III, IV y V tienen un papel único y secuencial en la CRM y la fosforilación oxidativa (**figura 10**).

Existe otro tipo de alteración del mtDNA que se denomina depleción. El síndrome de depleción supone una reducción en el contenido de moléculas de mtDNA que en algunos casos alcanza el 90% respecto a individuos control de edad similar. Los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno no se conocen, pero cualquier defecto en algún momento de la replicación puede alterar el número de copias de mtDNA (Hirano *et al.* 2000). Las moléculas de mtDNA residuales en el síndrome de depleción son normales. No presentan deleciones ni mutaciones puntuales, lo cual hace pensar que la depleción no es consecuencia de otro proceso patogénico sino precisamente causa de enfermedad.

Existe una serie de enfermedades asociadas a la depleción del mtDNA y deleciones múltiples que se consideran el resultado de alteraciones en la comunicación entre el núcleo y la mitocondria, en concreto entre sus genomas. Se cree que en estas enfermedades las mutaciones en el nDNA interrumpen el intercambio normal que controla la integridad y cantidad de mtDNA. La primera enfermedad de este tipo, la PEO (*Progressive External Ophthalmoplegy*) autosómica dominante, fue descrita en el año 1989 (Zeviani *et al.* 1989) y actualmente se conoce alrededor de una decena más.



## **6. Mitocondria y enfermedad de Alzheimer**

El envejecimiento afecta negativamente a diversas funciones mitocondriales y es el factor de riesgo más importante en la EA. El descenso del potencial de membrana mitocondrial, irregularidades en la cadena respiratoria y disminución en la producción de ATP son algunas consecuencias negativas que acarrea la disfunción mitocondrial. Estas alteraciones pueden intervenir en los procesos que conducen a la muerte neuronal, especialmente en situaciones en las que las células están sometidas a un gran estrés oxidativo como el que se ha descrito para la EA.

### ***6.1. Enfermedades neurodegenerativas y disfunción mitocondrial***

A lo largo de las últimas décadas se han identificado las bases genéticas fundamentales de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentran la enfermedad de Huntington (EH), la ataxia de Friedreich, la paraplegía espástica hereditaria y formas familiares de la enfermedad de Parkinson (EP), la EA y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Sin embargo, las etiologías de algunas de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes como la EAE, la EP y la ELA no son todavía completamente conocidas. A pesar de las diferencias clínicas que existen entre estas enfermedades, presentan una característica general: el déficit energético, lo que indica la existencia de un mecanismo común en la neurodegeneración basado en una alteración subyacente del metabolismo energético mitocondrial. El origen de estas anomalías del metabolismo mitocondrial puede variar según la enfermedad. En la **tabla 6** se muestra la clasificación de algunas enfermedades neurodegenerativas atendiendo al origen de los defectos genéticos identificados relacionados con la mitocondria.

La fosforilación oxidativa genera la mayor parte del ATP celular y cualquier alteración en la capacidad de la mitocondria para producir esta energía puede tener consecuencias fatales, no sólo debido a la falta primaria de ATP, sino también al desequilibrio indirecto que se ocasionaría en las funciones derivadas, como la producción de moléculas ROS, el mantenimiento del orgánulo, la regulación de la apoptosis y la homeostasis celular del calcio y de la glucosa (Duchen 1999; Wallace 2001). La alteración en la producción de ATP podría ser el evento a partir del cual se activarían diferentes mecanismos de señalización celular (Beal 2000). En el esquema de la **figura 13** se pueden observar algunos de los mecanismos relacionados con la mitocondria implicados en la neurodegeneración.

### ***6.2. El estrés oxidativo en la EA***

Clásicamente el estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la generación y la eliminación de ROS y de especies de nitrógeno reactivas (RNS). En un principio estas moléculas se consideraban exclusivamente perjudiciales para las células, pero actualmente se reconoce que la

## Introducción

regulación del estado redox, en el que están implicadas moléculas ROS, es clave en la modulación de diversas funciones celulares críticas (Scandalios 2002): activación de la cascada MAP-kinasa, transporte de iones, movilización de calcio, apoptosis, etc. Cuando se produce el estrés oxidativo las células trabajan para contrarrestar el efecto oxidante y restaurar el estado redox mediante respuestas adaptativas. La regulación de los genes que codifican las proteínas implicadas en esta respuesta está muy bien coordinada para adaptarse al cambio ambiental que se produce (Cassarino *et al.* 1999).

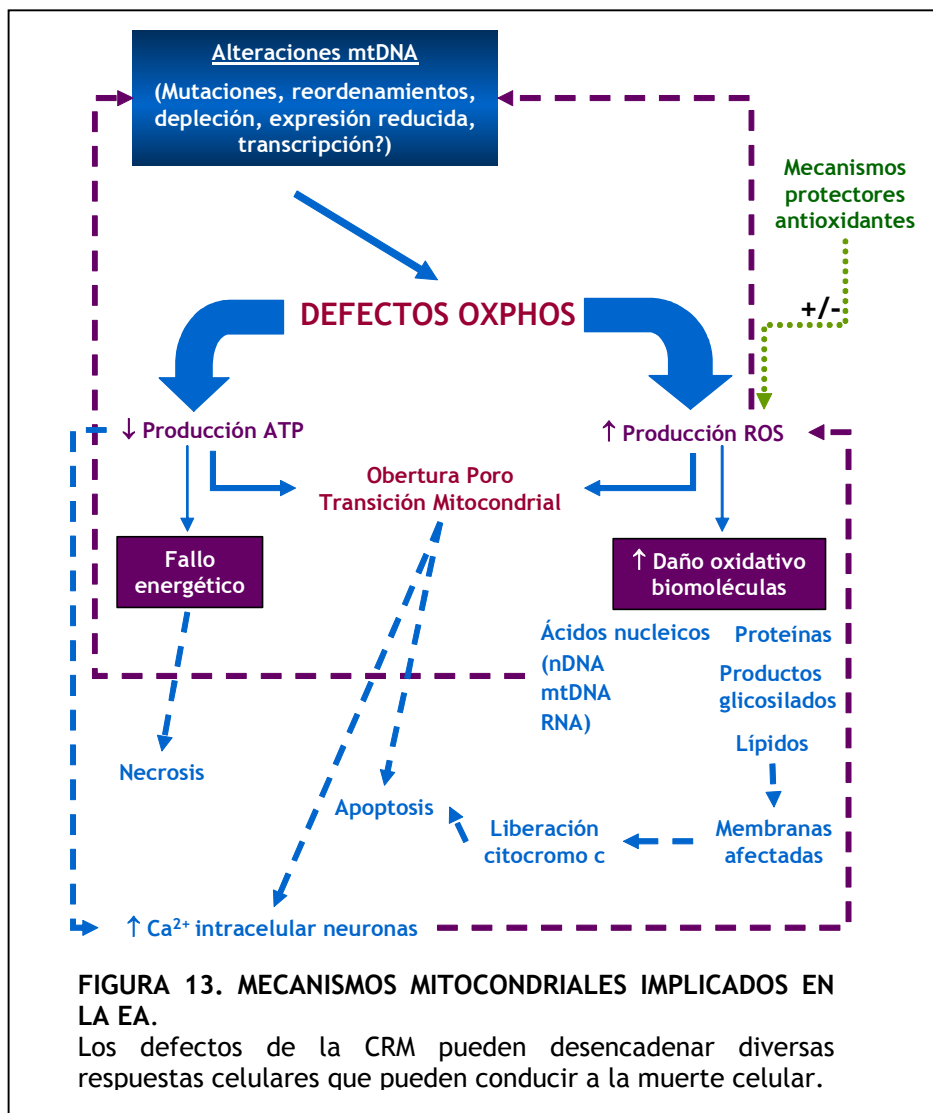
**TABLA 6. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS CON IMPLICACIÓN MITOCONDRIAL.**

Enfermedades neurodegenerativas <u>causadas por:</u>	Gen mutado
<u>Mutación primaria en el mtDNA</u>	
Síndrome de Leigh	Cox III, ND5, tRNA <sup>Trp</sup> , tRNA <sup>Val</sup>
LHON/Parkinsonismo/Distonía	Subunidades complejo I codificadas por el mtDNA
Enfermedad de las neuronas motoras	Cox I
NARP/MILS	ATPasa 6
Parkinsonismo	rRNA 12S
<u>Mutaciones en genes nucleares de proteínas mitocondriales que afectan sistema OXPPOS</u>	
Síndrome de Leigh con deficiencia en complejo I	Subunidades Complejo I codificadas por el nDNA
Síndrome de Leigh con deficiencia en complejo II	Flavoproteína SDH
Síndrome de Leigh Con deficiencia en complejo IV	SURF1, SCO2
Síndrome de Leigh con deficiencia PDH	Subunidad E1- $\alpha$ de la PDH
<u>Mutaciones en genes nucleares de otras proteínas mitocondriales</u>	
ELA	Cu, Zn-SOD
Ataxia de Friedreich	Frataxina
Paraplejía espástica hereditaria	Paraplegina, HSP60
Síndrome Mohr-Tranebjaerg	TIMM8A
Enfermedad de Wilson	Co-transportador ATPasa (ATP7B)
<u>Mutaciones en genes nucleares de proteínas no mitocondriales</u>	
EA	PPA, PSEN1, PSEN2
EH	Huntingtina
EP	Parkina, $\alpha$ -sinucleína
PSP (parálisis progresiva supranuclear)	Proteína tau
<u>Implicación mitocondrial secundaria</u>	
EAE	Desconocido
ELA esporádica	Desconocido
EP esporádica	Desconocido

Modificado a partir de Schon *et al* (Schon *et al.* 2003).

Una célula utiliza  $10^{13}$  moléculas de  $O_2$  de media al día. Se estima que el 1% del oxígeno molecular respirado forma iones  $O_2^-$ , lo que quiere decir que aproximadamente se producen  $10^{11}$  especies de radicales libres por célula al día. La producción de radicales libres en las neuronas se considera que es aún más elevada debido a su alto consumo de oxígeno; el cerebro utiliza el 20% del oxígeno basal a pesar de constituir solamente el 2-3% de la masa corporal total. Las lesiones oxidativas se

encuentran agravadas por factores como la edad, la demanda metabólica y/o condiciones patológicas como la EA, en los cuales la mitocondria está implicada.



El endotelio de los pequeños vasos sanguíneos cerebrales es mucho menos permeable que otros endotelios vasculares, aunque moléculas esenciales como la glucosa y diversas moléculas lipídicas solubles pueden penetrar. Muchas moléculas son excluidas del cerebro mediante la denominada barrera hematoencefálica. Esta barrera también impide la circulación de fagocitos en un cerebro sano. Estas características anatómicas y fisiológicas confieren mayor sensibilidad al estrés oxidativo al sistema nervioso central. El equilibrio oxidativo intracelular está finamente regulado, por tanto cabría esperar la activación de mecanismos de respuesta adaptativa ante la aparición del estrés. Uno de los primeros trabajos sobre estrés oxidativo en la EA hablaba de la inducción de la vía de las pentosas (Martins *et al.* 1986). Las moléculas NADPH son esenciales para mantener adecuadamente las defensas oxidativas. Los últimos descubrimientos sobre la inducción de la enzima dependiente de NADPH hemo-oxigenasa-1 (HO-1), la enzima limitante para la transformación del grupo hemo pro-oxidante a bilirrubina antioxidante, respaldan la teoría que propone que en la EA existe una defensa antioxidante activa (Premkumar *et al.* 1995). Como la inducción de HO-1 se encuentra

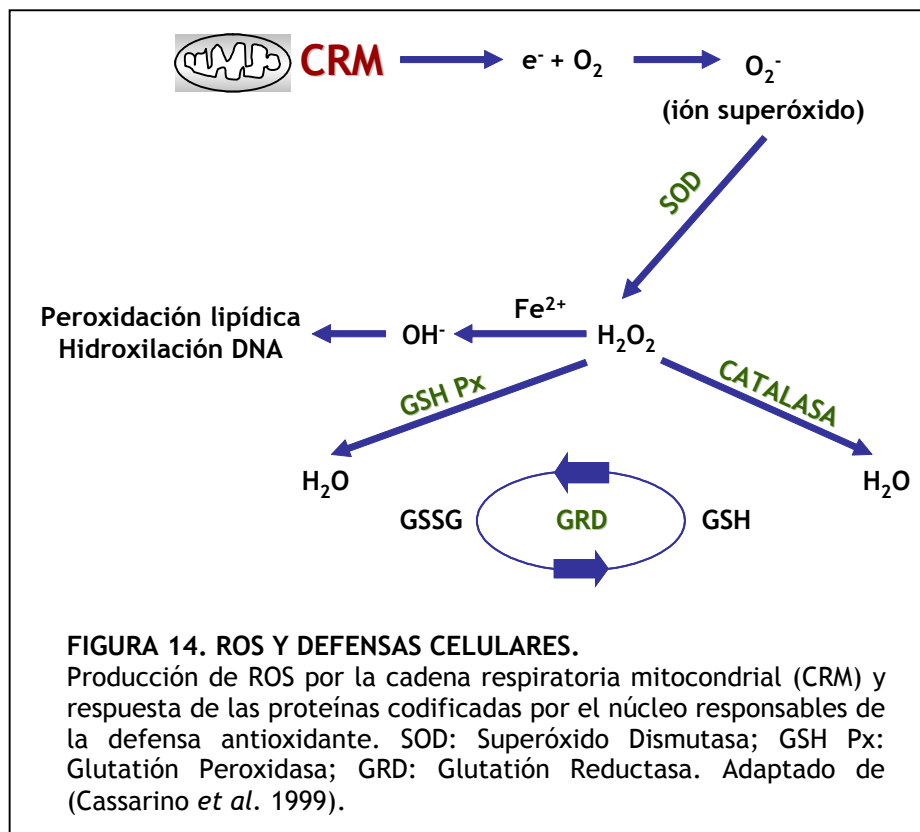
sincronizada con la acumulación de proteína tau en las neuronas, la reducción del daño oxidativo en neuronas con depósitos de tau puede ser parte de esa respuesta defensiva (Takeda *et al.* 2000a; Takeda *et al.* 2000b). Otra de las consecuencias derivadas del incremento en la generación de NAPDH es el aumento de glutatión y grupos sulfhidrilo libres. Estos últimos se encuentran en mayor cantidad específicamente en neuronas vulnerables ya que los grupos sulfhidrilo constituyen el componente mayoritario de las defensas celulares antioxidantes frente a ROS y metabolitos secundarios (Russell *et al.* 1999). La inducción de las enzimas superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn, catalasa, GSHPx, GSSG-R, peroxiredoxinas, diversas proteínas “*heat shock*” y su relación con los ovillos neurofibrilares proporciona más pruebas de que las neuronas movilizan sus defensas antioxidantes en respuesta al aumento del estrés oxidativo (Pappolla *et al.* 1992; Aksenov *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999; Takeda *et al.* 2000b).

### 6.2.1. Radicales libres

La hipótesis de los radicales libres y el envejecimiento (Harman 1992) plantea que la acumulación de radicales libres durante la vida ocasionaría daño a los principales componentes de la célula: núcleo, mtDNA, membranas y proteínas citoplasmáticas. Muchos autores sugieren que el desequilibrio entre la generación de radicales libres y las defensas antioxidativas estaría implicado en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas. El hecho de que la edad sea el factor de riesgo más importante en la EA esporádica refuerza la teoría según la cual los radicales libres juegan algún papel. Existe un gran número de trabajos que sugieren que los radicales libres y la consecuente disfunción mitocondrial están relacionados con procesos característicos de la EA (Blass *et al.* 1991; Beal 1996; Munch *et al.* 1997; Munch *et al.* 1998; Christen 2000; Smith *et al.* 2000; Castellani *et al.* 2002; Mattson *et al.* 2002). Además se originaría un “círculo vicioso” ya que al ser la mitocondria la mayor productora de ROS su exposición a los radicales libres sería mayor, aumentando su vulnerabilidad al daño oxidativo; el daño causado al mtDNA afectaría al funcionamiento de la cadena respiratoria, la cual produciría más cantidad de radicales libres potencialmente perjudiciales. El funcionamiento irregular de la cadena respiratoria, la disminución en la producción de ATP y la alteración del potencial de membrana son consecuencias características del estrés oxidativo provocado por los radicales libres. Además estos eventos constituyen factores decisivos en la muerte celular, se refuerzan entre ellos y promueven el círculo vicioso entre estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y muerte celular.

El sistema OXPHOS de la mitocondria es la mayor fuente de radicales libres y es también diana del daño oxidativo. Los radicales  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  y  $O_2^{\cdot-}$  son producto del proceso normal de respiración (Boveris 1977). Si se inhibe el transporte de electrones, estos se acumulan en los pasos iniciales de la CRM, en el Complejo I y en la Coenzima Q, donde pueden ser cedidos directamente al oxígeno molecular para generar el radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$ . El anión superóxido se detoxifica mediante la enzima mitocondrial superóxido dismutasa para dar  $H_2O_2$ . El peróxido de hidrógeno puede ser reducido a agua mediante la glutatión peroxidasa o catalasa, o bien puede producir un radical aún más peligroso, el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) (ver **figura 14**). Este radical es extremadamente reactivo y

puede reaccionar con muchas macromoléculas. Además, el  $H_2O_2$  puede ser convertido en el radical tóxico hidroxilo en presencia de metales de transición reducidos a través de la reacción de Fenton, proceso que ha sido detectado en la alteración neurofibrilar de la EA así como en la EP (Smith *et al.* 1997a; Castellani *et al.* 2000).



Cuando la CRM se encuentra dañada o inhibida, la producción de ROS puede aumentar. La exposición crónica a ROS acarrea la aparición de daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos mitocondriales y celulares. El trastorno de la CRM también está implicado en la generación de RNS, como por ejemplo el óxido nítrico, que puede derivar a peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), capaz de inhibir a la COX. Las defensas antioxidantes celulares (por ejemplo proteínas tiol, glutatión reducido,  $\alpha$ -tocoferol) y las enzimas secuestradoras (catalasa, GPx, MnSOD, Cu/ZnSOD) ofrecen protección contra la acumulación deletérea de ROS. A pesar de que estas defensas restringen el daño potencial que causaría la producción de ROS y RNS, si estas moléculas tóxicas se generan continuamente, como parece ser el caso de la EAE, los mecanismos defensivos se encontrarían superados, iniciando la secuencia de efectos perjudiciales que finalizan con la muerte celular por apoptosis o por necrosis.

### 6.2.1.1. Alteraciones oxidativas en la EA

Existen diversos trabajos que apuntan que los primeros cambios neuronales característicos de la EA muestran evidencias de daño oxidativo (Perry *et al.* 1998; Nunomura *et al.* 2000; Nunomura *et al.* 2001; Pratico *et al.* 2001), lo cual indicaría que el estrés oxidativo representa una contribución

## Introducción

temprana a la enfermedad. Esta contribución está sustentada además por el efecto del tratamiento clínico contra el estrés oxidativo que parece reducir la incidencia y severidad de la EA (Sano *et al.* 1997; Stewart *et al.* 1997). El examen realizado por Nunomura y colaboradores de la relación espacio-temporal existente entre la presencia de modificaciones oxidativas y las lesiones características de la EA en etapas iniciales indica que muchos de los marcadores de daño oxidativo están presentes en neuronas cuando aún no presentan alteración neurofibrilar (Nunomura *et al.* 1999). También en el citoplasma de células neuronales de casos de síndrome de Down —el cual presenta un componente neurodegenerativo similar al que se da en la EA— en su primera y segunda década de vida hay una acumulación notable de 8-hidroxil-2-deoxiguanosina (8-OHdG) y nitrotirosina. Esta acumulación precede temporalmente al depósito de péptido amiloide en la EA (Nunomura *et al.* 2000). Un estudio longitudinal con un modelo transgénico del síndrome de Down ratifica esta observación, ya que la peroxidación lipídica está significativamente aumentada en los ratones *Tg2576* de 7-8 meses de edad, precediendo aparentemente a cualquier depósito amiloide o incremento en la cantidad del péptido amiloide (Pratico *et al.* 2001).

El daño oxidativo ha sido documentado mediante la detección de diversos marcadores de estrés oxidativo, en la **tabla 7** se muestra un resumen de los marcadores detectados. Parece claro que en el cerebro de pacientes con EA hay signos evidentes de modificaciones oxidativas y parece ser que el daño oxidativo y el defecto en la función mitocondrial serían sucesos tempranos en la EA (Nunomura *et al.* 2001; Castellani *et al.* 2002). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de productos de estrés oxidativo en placas seniles y en ovillos neurofibrilares. Se han detectado marcadores de peroxidación lipídica y de oxidación del DNA en elevadas cantidades en el fluido cerebroespinal y en el cerebro de pacientes con EA. También se ha descrito la presencia de marcadores de respuesta inflamatoria (cadena del complemento, citoquinas, reactivos de fase aguda, proteasas) en la EA. El análisis de muestras de cerebro de pacientes con EA por Hirai y colaboradores mediante técnicas de hibridación *in situ*, inmunocitoquímica y morfometría reveló más evidencias de alteraciones estructurales en la mitocondria (Hirai *et al.* 2001). En el examen ultraestructural de necropsias observaron un aumento de mtDNA y proteína mitocondrial citocromo oxidasa en vacuolas asociadas a lipofucsina, un tipo de vacuola propuesto como el lugar de degradación mitocondrial por autofagia (Brunk *et al.* 1992). La morfometría de los orgánulos demostró una reducción significativa de las mitocondrias en neuronas vulnerables en la EA (las que presentan mayor estrés oxidativo, indicado por la presencia aumentada de 8- hidroxiguanosina y nitrotirosina). Estos experimentos mostraban que en la EA las neuronas vulnerables tenían más productos de degradación mitocondrial, sugiriendo o bien una tasa de recambio mitocondrial mediante autofagia mayor o bien una reducción en el recambio proteico que acarrea la acumulación de mtDNA y proteína mitocondrial en los lisosomas. Además, la COX necesita estar unida a la membrana para funcionar, por lo que estos resultados serían consistentes con la baja actividad de algunas enzimas en la EA (Wong-Riley *et al.* 1997).

**TABLA 7. MOLÉCULAS DAÑADAS POR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EA**

Molécula	Ác. Nucleicos	Proteínas	Lípidos	Azúcares
Tipo de daño	Roturas, mella <sup>1</sup> s	Oxidación, disminución enzimas sensibles <sup>2</sup>	Peroxidación lipídica <sup>3</sup>	Glicosilación, glicooxidación <sup>4</sup>
Marcadores	8-OHdG	Grupos carbonilo, residuos de tirosina nitrados	HNE, TBARS, MDA, isoprostano	AGEs

1 (Mecocci *et al.* 1994; Mecocci *et al.* 1997; Nunomura *et al.* 1999; Nunomura *et al.* 2000; Nunomura *et al.* 2001)

2 (Good *et al.* 1996; Smith *et al.* 1996; Smith *et al.* 1997b)

Alguna de las proteínas oxidadas se han identificado recientemente y resulta destacable que muchas son enzimas relacionadas con la producción de ATP o implicadas en la glucólisis (Castegna *et al.* 2002a; Castegna *et al.* 2002b; Castegna *et al.* 2003)

3 (Sayre *et al.* 1997; Butterfield *et al.* 2001).

Ácido tiobarbitúrico (TBARS), malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-transnonenal (HNE).

4 La cantidad de productos finales de glicosilación y glicooxidación está incrementada (Smith *et al.* 1994; Vitek *et al.* 1994; Smith *et al.* 1995; Castellani *et al.* 2001). *Advanced Glycation End products* (AGEs).

Para algunos autores el daño oxidativo se limita a unas neuronas, las mencionadas anteriormente como neuronas vulnerables (Nunomura *et al.* 1999; Hirai *et al.* 2001). Las células no neuronales también pueden mostrar cambios en la mitocondria. Stewart y colaboradores realizaron estudios de morfometría con células endoteliales que mostraron una reducción significativa de las mitocondrias (Stewart *et al.* 1992). También se han visto anomalías mitocondriales en fibroblastos y en otros tipos celulares obtenidos de pacientes con EA (Blass *et al.* 1990; Blass *et al.* 1991). Los cambios descritos en estos trabajos reflejan que hay diferentes categorías de neuronas afectadas por anomalías mitocondriales. La interpretación de estos cambios es consistente con los descubrimientos realizados en cíbridos que muestran que mitocondrias derivadas de células no neuronales de pacientes con EA presentan deficiencias energéticas sustanciales (Ghosh *et al.* 1999; Khan *et al.* 2000; Trimmer *et al.* 2000; Trimmer *et al.* 2004).

La oxidación del mtDNA y, en menor medida el DNA nuclear, se ha observado en el córtex parietal de pacientes con EA (Mecocci *et al.* 1994) aunque también se ha visto en personas de edad avanzada sin EA (Lyras *et al.* 1997). La oxidación de proteínas también se ha descrito en personas mayores con y sin EA, pero parece que en pacientes de EA esta oxidación es más acusada en las regiones que contienen las alteraciones histopatológicas más severas (Hensley *et al.* 1995). En el cerebro de pacientes con EA muchos estudios han revelado indicios de que la peroxidación lipídica se encuentra aumentada, especialmente en el lóbulo temporal, lugar en el que las modificaciones histopatológicas son considerables (Palmer *et al.* 1994; Lovell *et al.* 1995; Marcus *et al.* 1998). Estas observaciones no han sido corroboradas en otros estudios en los que no se hallaron diferencias respecto al nivel basal de peroxidación (Hayn *et al.* 1996; Lyras *et al.* 1997). Ramassamy y colaboradores han sugerido que estas inconsistencias podrían estar relacionadas con el genotipo de

## Introducción

APOE (Ramassamy *et al.* 1999). Los pacientes con el alelo  $\epsilon 4$  serían más susceptibles a la peroxidación que los que no lo tuvieran.

Se ha demostrado en el síndrome de Down que la muerte neuronal ocurre de acuerdo con procesos de apoptosis relacionados con el aumento de la peroxidación lipídica y puede ser detenida mediante la acción de la enzima catalasa y de secuestradores de radicales libres (Busciglio *et al.* 1995). El fenómeno de la lipoperoxidación podría tener una influencia importante en la patogenésis de la EA al compartir un patrón de neurodegeneración similar al del síndrome de Down.

Los efectos de los radicales libres sobre las membranas fosfolipídicas podrían ser importantes porque algunas alteraciones de las membranas serían específicas en la patogenésis de la EA (Nitsch *et al.* 1992). Markesbery demostró que la peroxidación lipídica es la causa más importante de daño a las membranas fosfolipídicas en la EA (Markesbery 1997). Experimentos con la molécula 4-hidroxi-2-transnonenal (HNE) han evidenciado su toxicidad en cultivos de células de hipocampo (Mark *et al.* 1997). Esta molécula de tipo  $\alpha, \beta$ -aldehído es altamente reactiva, se cree que causa la muerte neuronal mediante la alteración de las bombas ATPasas implicadas en la transferencia de iones y en la homeostasis del calcio (Markesbery 1997). El aumento de concentración de calcio por sí mismo puede iniciar una cascada de sucesos, provocando el incremento en la cantidad de ROS y la muerte celular (Mattson 1995). Otras pruebas que apoyan este vínculo entre regulación del calcio y radicales libres provienen de estudios que muestran que el flujo de calcio dependiente de glutamato está asociado con la producción de radicales libres por la mitocondria (Dugan *et al.* 1995; Reynolds *et al.* 1995). El ácido nítrico y el peroxinitrito parece que intervienen de forma crucial en la excitotoxicidad asociada con la activación del receptor de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). En experimentos con ratones se observó que las células de animales deficientes en la enzima óxido nítrico sintasa eran resistentes a la toxicidad inducida por NMDA (Dawson *et al.* 1996).

Algunos autores han descrito la presencia de concentraciones elevadas de  $F_2$ -isoprostano en el fluido cerebroespinal de pacientes con EA (Montine *et al.* 1998). Esta molécula se produce mediante la peroxidación del ácido araquidónico mediada por radicales libres, independientemente de la enzima ciclooxigenasa. Este descubrimiento indica que la peroxidación lipídica puede estar aumentada en la EA y además señala un posible uso de la cuantificación de  $F_2$ -isoprostano del fluido cerebroespinal como biomarcador de la enfermedad.

El aumento de marcadores de daño oxidativo en la EA puede no ser necesariamente una señal de que exista una brecha en las defensas oxidativas, sino que podría indicar una etapa nueva en la consolidación de defensas de mayor estabilidad. El equilibrio dinámico que existe entre el daño oxidativo y las respuestas compensatorias puede ser responsable de un cambio en la homeostasis celular, lo que parece ser probablemente el caso de la EA (Zhu *et al.* 2004).

### 6.2.2. Placas, ovillos y estrés oxidativo

Se ha descrito que el péptido amiloide y los defectos mitocondriales se encuentran relacionados en la etiología de la EA de inicio tardío (Bozner *et al.* 1997; Hashimoto *et al.* 2003; Abramov *et al.*



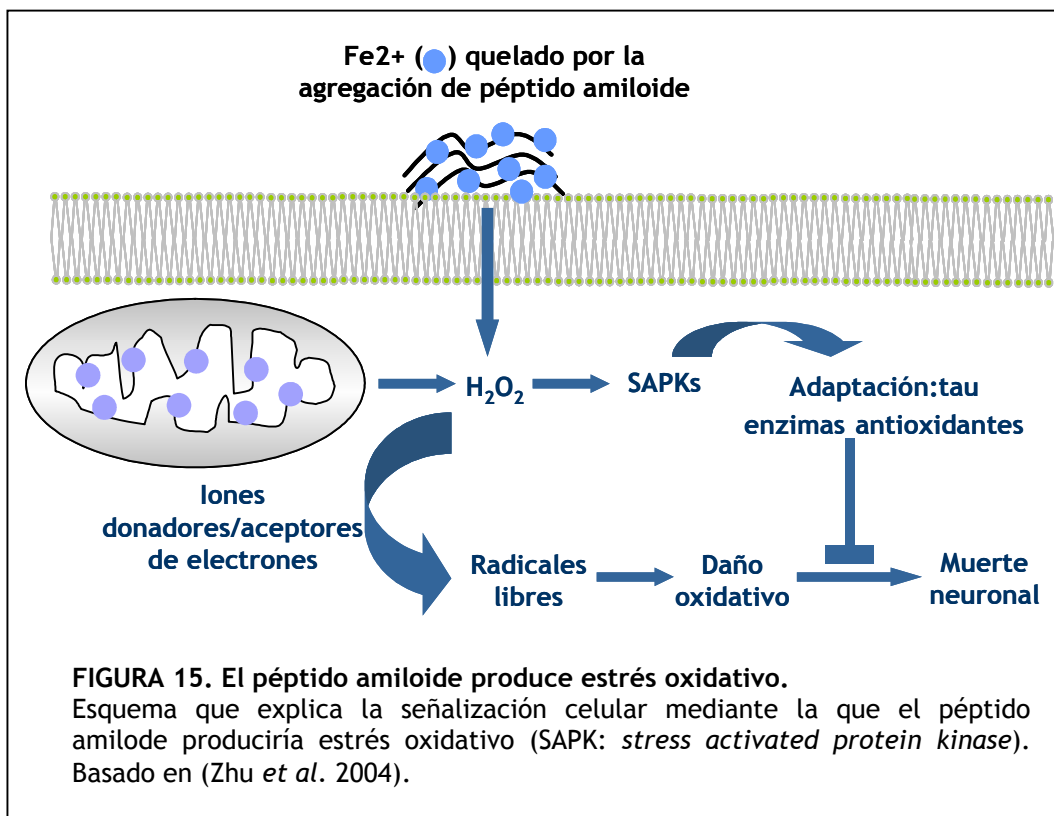
2004). También se ha propuesto que el péptido A $\beta$  sería un sistema de defensa antioxidante que protegería las sinapsis neuronales del daño oxidativo, pero cuando la concentración de péptido A $\beta$  aumentase por encima de un límite el péptido se agregaría y tendría propiedades pro-oxidantes tóxicas (Huang *et al.* 1999). Por otro lado, también se ha descrito que el péptido A $\beta$  entra en la mitocondria y se une a la enzima alcohol deshidrogenasa. Esta acción provoca un incremento en la producción de ROS y favorece la liberación de citocromo c, presumiblemente mediante la activación del poro de transición mitocondrial (MtPTP) (Lustbader *et al.* 2004). Un factor de complejidad añadido es el hecho de que el péptido amiloide en presencia de iones donadores/aceptores de electrones favorece la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en exceso (Connor *et al.* 1995). A pesar de que la formación de radicales reactivos hidroxilo mediante la interacción entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e iones metálicos constituye una amenaza para las células neuronales debido al daño que causa sobre importantes macromoléculas, las respuestas compensatorias provocadas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcionan a la célula algún mecanismo protector para proteger a la neurona de las agresiones oxidativas.

El estrés oxidativo, como suceso temprano en la patogénesis de la EA, interviene significativamente en el desarrollo de la enfermedad. A través de la liberación del exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las mitocondrias provocan una serie de interacciones entre iones donadores/aceptores de electrones y elementos de respuesta al estrés oxidativo (**figura 15**). El péptido A $\beta$  y la proteína tau propician la aparición de estrés oxidativo en cultivos celulares. Las células tratadas presentaban más marcadores de daño oxidativo que células control (Gibson *et al.* 1997; Kuperstein *et al.* 2002; Stamer *et al.* 2002). El daño oxidativo ocasionado por el péptido amiloide es objeto de controversia, ya que los estudios *in vitro* indican una fuerte asociación entre el péptido y aumento del daño oxidativo (Bozner *et al.* 1997), mientras que estudios *in vivo* apuntan a una menor presencia de daño oxidativo en zonas con mayor cantidad de péptido, lo cual indicaría un papel protector contra el daño oxidativo (Smith *et al.* 2002).

Un examen restringido a la relación espacio-temporal existente entre la presencia de modificaciones oxidativas y las lesiones características de la EA (placas y ovillos) revela una curiosa paradoja. Se ha visto que mientras productos estables de glicosilación se encuentran predominantemente asociados a ovillos neurofibrilares y depósitos de péptido A $\beta$  (Smith *et al.* 1994), productos de tipo reversible o de degradación rápida se encuentran principalmente en el citoplasma de neuronas vulnerables. Estos datos indicarían que el daño oxidativo no está restringido a lesiones irreversibles: los casos de EA con los depósitos de péptido amiloide más extensos muestran menos cantidad de 8-OHdG y las neuronas que contienen ovillos también presentan los niveles de 8-OHdG significativamente más bajos, a pesar de padecer un historial obvio de daño oxidativo (detectable mediante el aumento de AGE o de peroxidación lipídica) (Nunomura *et al.* 2000). Esto indicaría que las placas y los ovillos son respuestas celulares compensatorias al aumento de estrés oxidativo asumiendo una función antioxidante. Estas razones explicarían porqué hay neuronas con ovillos que sobreviven durante décadas (Morsch *et al.* 1999). La hipótesis por la cual el péptido amiloide y la proteína tau serían respuestas que reducirían el daño oxidativo actuando como secuestradores de radicales libres es coherente con la localización en la membrana mitocondrial

## Introducción

externa del progenitor del péptido amiloide, la proteína precursora amiloide y también de la apolipoproteína E (Han *et al.* 1994). Asimismo las mitocondrias están situadas en las proximidades de microtúbulos que contienen proteína tau. Los microtúbulos poseen la capacidad de mover a las mitocondrias dentro de las neuronas. Un producto oxidativo importante en la EA son los residuos de nitrotirosina, los cuales se ha descrito que puede producir el desensamblaje de microtúbulos (Eiserich *et al.* 1999). En las neuronas se produce una reducción de la mitad de los microtúbulos previa a los cambios originados por tau (Cash *et al.* 2003). Esto refuerza la idea de que se produce una respuesta coordinada contra el estrés oxidativo. Según esta teoría, las anomalías principales observadas en la EA regularían y mantendrían el funcionamiento del metabolismo mitocondrial mediante la limitación del daño oxidativo. Si el sistema “defensivo” funcionase perfectamente, el daño oxidativo quedaría limitado a niveles fisiológicos tolerables. Esta sería la explicación de porqué, sorprendentemente, los casos de EA con los depósitos de péptido amiloide más extensos presentan cantidades de 8-dOHG comparables a las de individuos control.



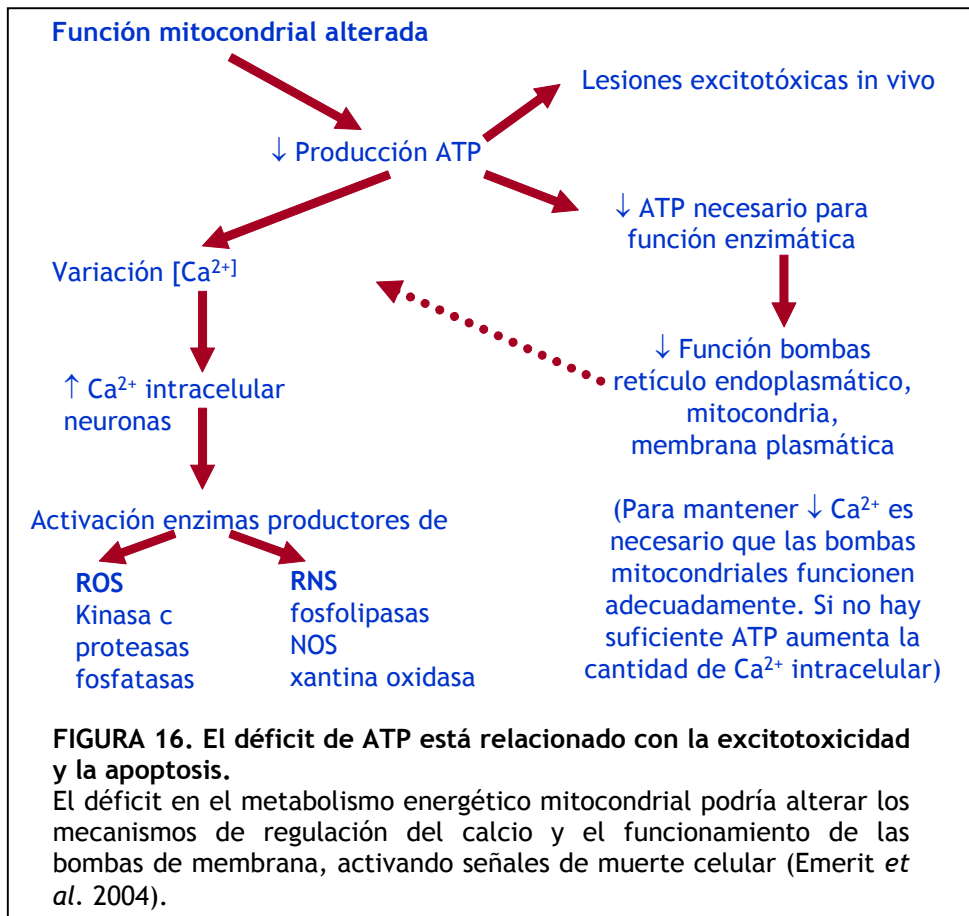
La complejidad para establecer definitivamente una relación entre la muerte neuronal y las alteraciones características de la EA (placas y ovillos) ha hecho pensar a algunos investigadores que el punto final de la enfermedad podría no ser la muerte, sino causar la disfunción neuronal. Esta idea se apoya en que a pesar de que muchas veces la pérdida neuronal es muy amplia, en general no es superior a la observada en personas de edad avanzada que no sufren la EA (Cras *et al.* 1995).

### 6.2.3. APOE y la glutatión reductasa

El genotipo APOE, el factor genético de mayor riesgo en la EA, determina las combinaciones de los aminoácidos de las posiciones 112 y 158 de la proteína a sintetizar. El alelo  $\epsilon_2$ , descrito como protector y poco frecuente en la EA, contiene dos cisteínas (ver **figura 8**). El más común es el alelo  $\epsilon_3$  con una sola cisteína, mientras que el alelo  $\epsilon_4$  no contiene ninguna y es el factor de riesgo de la EA. Aquellos pacientes con APOE4 desarrollan la EA antes que otros pacientes y son los casos en que se encuentran los mayores depósitos amiloides. Si se considera que el glutatión, un “almacén” de cisteínas, y el ciclo de la glutatión reductasa (ver **figura 14**) intervienen de forma crucial en el mantenimiento de la integridad de las membranas (Cooper *et al.* 1997). Es interesante señalar que la actividad específica antioxidante del alelo de APOE ( $\epsilon_2 > \epsilon_3 > \epsilon_4$ ) es proporcional al número de cisteínas que contienen (Miyata *et al.* 1996). Una posibilidad que implica a APOE en las anomalías mitocondriales sería que las proteínas de APOE que tuviesen cisteínas transportasen equivalentes reductores desde mitocondrias dañadas a otros compartimentos celulares, permitiendo a aquellas mantener su función metabólica. APOE4 no participaría en este transporte al no contener ninguna cisteína y por lo tanto no podría prevenir la alteración del metabolismo.

### 6.2.4. Estrés oxidativo y muerte neuronal

El estrés oxidativo observado no es el causante por si solo de ninguna enfermedad neurodegenerativa, pero está implicado en los procesos de excitotoxicidad y apoptosis, los dos principales causantes de la muerte neuronal. Las moléculas ROS y RNS están implicadas en ambos procesos (Kruman *et al.* 1998; Kokoszka *et al.* 2001). En enfermedades neurodegenerativas crónicas el proceso principal de muerte celular es la apoptosis. El proceso apoptótico consiste en una cascada bioquímica que produce la activación de proteasas que destruyen moléculas necesarias para la vida celular. Esta cascada a su vez activa otra serie de moléculas que intervienen en el programa de muerte celular. Durante estos procesos la mitocondria juega un papel importante y junto a la estimulación glutaminérgica, un fenómeno llamado excitotoxicidad, llevan a un aumento de la cantidad de calcio en las neuronas así como a la apoptosis. La relación entre estos mecanismos se puede observar en la **figura 16**. Esto se ha demostrado en un modelo de ratón transgénico de ELA (Drachman *et al.* 2002). Se observó que la inhibición de ciclooxigenasa 2 (COX-2) protegía las neuronas motoras de estos ratones, prolongándoles la vida. La enzima COX-2, presente en neuronas espinales y astrocitos, cataliza la síntesis de la prostaglandina E2, encargada de estimular la liberación de glutamato por parte de astrocitos. Además COX-2 interviene en la producción de citoquinas proinflamatorias y ROS.



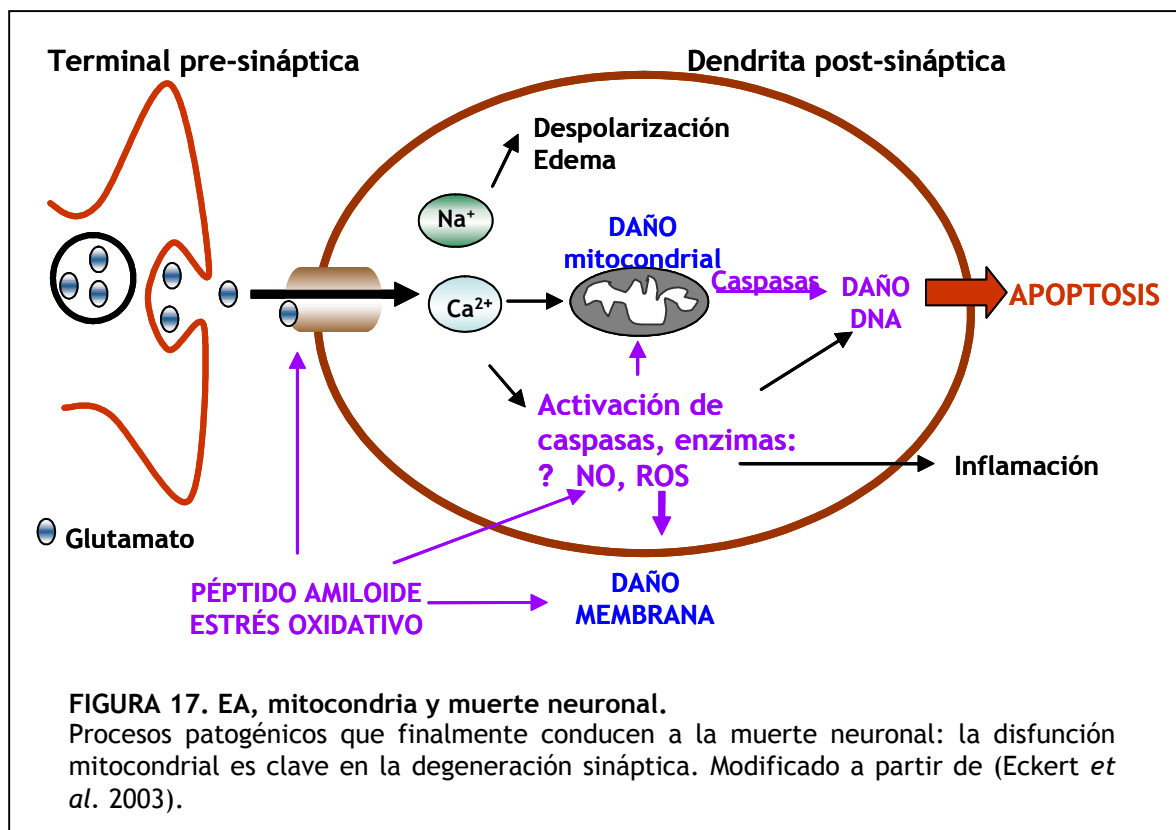
### 6.2.5. Excitotoxicidad

El daño oxidativo en la EA puede ser consecuencia de la alteración mitocondrial (Beal 1995; Mattson *et al.* 1995), de la presencia del péptido AB (Hensley *et al.* 1994; Mattson 1997) y del reclutamiento de células de la glia y su activación (Halliwell *et al.* 1999; Rosenberg 2000). Estos hechos inducirían a un aumento en la concentración de calcio intracelular y a la excitotoxicidad de las neuronas. La muerte por excitotoxicidad en la EA explicaría la degeneración sináptica que causa uno de los síntomas típicos de la EA como es la pérdida de memoria (Selkoe 2002).

La excitotoxicidad se puede definir como el proceso en el que hay una activación excesiva de los receptores de glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y su interacción con receptores específicos de membrana es la responsable de algunas funciones neurológicas: cognición, memoria y sensación. En varios desórdenes neurodegenerativos la activación excesiva de estos receptores media la aparición de lesiones neuronales o de la muerte celular (Lipton *et al.* 1994). Este tipo de lesión parece estar predominantemente caracterizada por el aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el interior de la neurona. La activación de los receptores ionotrópicos de glutamato dispara la entrada de calcio intracelular. Estos receptores se pueden clasificar en tres

grandes grupos según su agonista: NMDA,  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoaxolopropionato (AMPA) y kainato.

La concentración de calcio intracelular es importante para diversos procesos fisiológicos, pero su exceso puede provocar sobre-estimulación de la actividad normal, lo cual causaría daños a la neurona. El aumento neuronal de calcio puede activar una serie de enzimas: proteína quinasa C, proteasas, fosfatasa, fosfolipasas, óxido nítrico sintasa (NOS), xantina oxidasa (Lipton *et al.* 1994). Las tres últimas producen ROS y RNS mediante la activación de la cascada del ácido araquidónico. Para mantener una concentración baja, las neuronas deben producir la energía metabólica necesaria para que las bombas de transporte del retículo endoplasmático, de la membrana plasmática y de la mitocondria funcionen adecuadamente y colaboren a mantener una homeostasis correcta del calcio (Halliwell 1999). Una disfunción mitocondrial que provocase una reducción en el ATP podría contribuir a producir lesiones excitotóxicas *in vivo*. En la **figura 17** se muestra un esquema de los sucesos implicados que conducirían al aumento de ROS y RNS. La excitotoxicidad y el deterioro mitocondrial se encuentran unidos estrechamente en los casos en que hay un desequilibrio en el metabolismo energético (Beal 1992, 2000). Por ejemplo la deficiencia en tiamina, que origina la encefalomiopatía de Wernicke, tiene como consecuencias un descenso en el consumo de glucosa en el cerebro y un desajuste en la producción energética mitocondrial. El progreso de las lesiones se detiene mediante la administración de fármacos antagonistas de NMDA.



## 6.2.6. Apoptosis

Además de ser la fábrica de energía de la célula, la mitocondria se encuentra estrechamente implicada en diversas vías de muerte celular. Algunas de las señales de muerte celular más potentes y también algunos de los agentes más activos en la supervivencia celular pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2.

Se conocen por lo menos tres mecanismos generales en los que participa la mitocondria que están implicados en la apoptosis. Estos tres mecanismos pueden estar interrelacionados:

- Interrupción del transporte de electrones
- Alteración del potencial redox celular
- Liberación de factores promotores de la activación de caspasas (por ejemplo citocromo c)

Defectos en la función mitocondrial, la apoptosis y una sobreproducción de ROS son tres mecanismos patogénicos comunes en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como EA, EP y ELA (Emerit *et al.* 2004). La peroxidación lipídica y la cantidad de iones superóxido se encuentran incrementados cuando la célula entra en apoptosis, pero parece ser que estos hechos intervendrían en fases tardías, una vez la cascada de caspasas se hubiese activado. La interrupción de la CRM es una señal temprana en la muerte celular. Una consecuencia de esta interrupción debería ser la disminución en la síntesis de ATP, la cual ha sido observada, pero sólo en las fases finales del proceso de apoptosis (Bossy-Wetzel *et al.* 1998). Por este motivo se cree poco probable que el déficit de ATP sea un mecanismo inductor de la apoptosis. Sin embargo, a pesar de no ser inductor, este déficit puede derivar en muerte celular por su interrelación con otros mecanismos, como se puede ver en la **figura 16**.

Las tres señales principales que provocan la liberación de mediadores apoptogénicos mitocondriales son las siguientes:

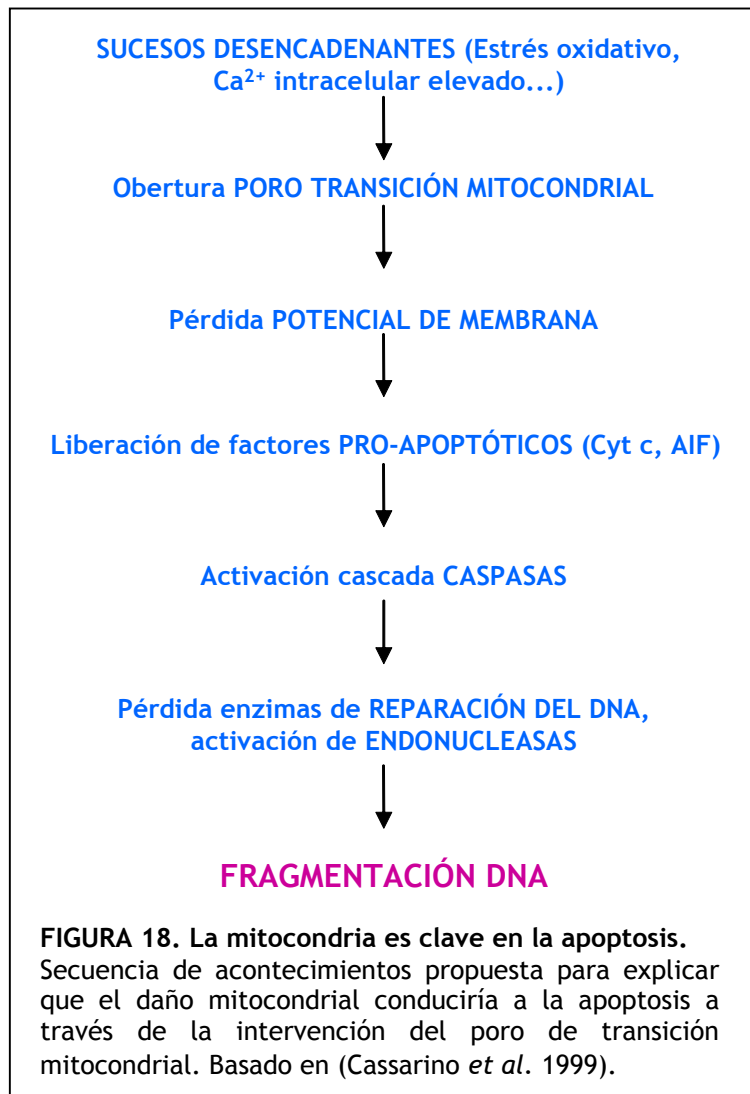
- Miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2.
- Cantidades elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como las producidas por excitotoxicidad.
- Cantidades elevadas de ROS y RNS.

Todos los organismos poseen defensas frente al estrés oxidativo: activación de genes codificantes de enzimas defensivos, factores de transcripción y proteínas estructurales. Como se ha mencionado en apartados anteriores, cuando las cantidades de ROS superan la capacidad de eliminación mitocondrial y celular aparece el estrés oxidativo. Este fenómeno **activa el poro de transición mitocondrial (figura 18)**. El mtPTP es un canal que atraviesa la MMI y la MME permitiendo la difusión libre de moléculas inferiores a 1.500 Da entre la matriz mitocondrial y el citosol. La obertura del poro provoca diversos fenómenos en la mitocondria:

- × Colapso del gradiente electroquímico transmembrana.
- × Pérdida de solutos de la matriz.
- × Distensión de la mitocondria.

- × Liberación de citocromo c, procaspasas 2, 3 y 9, factor inductor de la apoptosis (AIF) y activación de la caspasa-DNAasa.

El citocromo c y el factor citosólico Apaf-1 (“*Apoptotic Protease Activating Factor*”) forman el “apoptosoma” junto con la procaspasa-9, cuyo efecto es la activación de la cascada proteolítica de las caspasas. Por otro lado, la molécula AIF y la caspasa-DNAasa pueden ir al núcleo. Todas estas acciones inician la apoptosis (Kokoszka *et al.* 2001). La salida de citocromo c de la mitocondria dirige a la célula hacia la muerte, ya sea mediante un mecanismo apoptótico a través de la activación de caspasas por Apaf-1 o bien mediante un proceso necrótico más lento debido a un transporte de electrones deficitario. Esta alteración de la CRM puede derivar en la generación de radicales libres y la disminución en la producción de ATP. El bloqueo de la liberación de citocromo c por parte de Bcl-2 inhibe la apoptosis (Kluck *et al.* 1997).



### **6.3. EA, envejecimiento y disfunción mitocondrial**

La disfunción mitocondrial (con el desequilibrio energético como efecto más importante), la apoptosis y la sobre-producción de moléculas ROS son mecanismos patogénicos comunes no sólo en las enfermedades neurodegenerativas como la EA, la enfermedad de Parkinson o la ELA sino que también se dan en individuos de edad avanzada (Emerit *et al.* 2004). Algunos de estos defectos mitocondriales también se han asociado al proceso normal del envejecimiento (Bonilla *et al.* 1999; Orth *et al.* 2001; Castellani *et al.* 2002; Jellinger 2003). No obstante, sí que se han observado algunas particularidades en algunos de estos fenómenos únicamente asociadas a la EA. La aparición del estrés oxidativo en la EA está ampliamente documentada pero muchos de los cambios originados por la acción de radicales libres descritos en el cerebro de un paciente con EA también se han observado asociados al proceso normal del envejecimiento. Probablemente en la EA el efecto de los radicales libres aumenta y empeora con los años y por tanto el riesgo de que las defensas antioxidantes de las neuronas no puedan contener el daño causado por las moléculas ROS es mayor (Benzi *et al.* 1995). Una de las cuestiones de debate habituales es si su aparición es un hecho primario o secundario en la enfermedad. La postura tradicional es que las lesiones oxidativas en el cerebro de un individuo con EA intervienen en la neurodegeneración pero sin determinar con precisión si son la causa o una consecuencia (Beal 1995; Benzi *et al.* 1995; Sims 1996). Posteriormente diversos estudios han descrito que el estrés oxidativo es crucial en la mediación de la patogénesis de la EA. También parece claro que el desequilibrio oxidativo y el consiguiente estrés son fenómenos tempranos en el desarrollo de la enfermedad y son secundarios a otros mecanismos específicos presentes en la EA pero no en otras enfermedades neurodegenerativas (Pratico *et al.* 2004). Sin embargo, en muchas ocasiones no se ha podido establecer claramente si algunos de los defectos mitocondriales observados en pacientes con EA esporádica son en sí mismos un fenómeno patogénico o si son simplemente sucesos comunes al envejecimiento. Este concepto se refleja claramente en los estudios realizados sobre la función de la CRM y sobre el mtDNA de pacientes con EA en los apartados siguientes en los que se describen algunos defectos mitocondriales observados en pacientes y para los que también hay estudios opuestos.

### **6.4. Principales alteraciones mitocondriales en la EA**

El mecanismo por el cual los defectos mitocondriales ocasionarían consecuencias negativas estaría relacionado con alteración de la CRM, reducción de la síntesis de ATP, producción de ROS y con la secuencia de procesos ligados a la disfunción mitocondrial que se pueden observar en la **figura 13**.

#### **6.4.1. Metabolismo energético alterado**

La idea según la cual un metabolismo energético defectuoso podía ser fundamental en la EA fue introducida por primera vez por Blass y Gibson entre otros (Blass *et al.* 1999). Muchos estudios se centraron entonces en dos enzimas mitocondriales cuya función afecta al ciclo de Krebs: la enzima



piruvato deshidrogenasa y la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Brown *et al.* 2000). A partir de aquí, los estudios que relacionaban defectos metabólicos con la EA se multiplicaron, siendo la disminución de la tasa metabólica cerebral una de las anomalías más documentadas en la EA (Blass 2000). Existen datos obtenidos a partir de tomografías por emisión de positrones que demuestran claramente una reducción del metabolismo cerebral en las regiones corticales tempoparietales de pacientes con EA (Minoshima *et al.* 1997). También se ha descrito el aumento del consumo de oxígeno en comparación con el consumo de glucosa en pacientes con EA (Hoyer 1993; Fukuyama *et al.* 1994). Es importante destacar que las anomalías en las tasas metabólicas cerebrales preceden a cualquier evidencia de desequilibrio funcional (observable mediante pruebas neurofisiológicas) o de atrofia cerebral (mediante “*neuroimaging*”) (Blass 2000). Tampoco hay que olvidar que las irregularidades metabólicas (hipoxia, hipoglucemia, deficiencias vitamínicas) son suficientes por sí mismas para inducir deficiencias neurofisiológicas similares a las de la EA (Gibson *et al.* 1981; Blass *et al.* 1999). El proceso mediante el que estas deficiencias pasan a ser irreversibles en la EA es una cuestión que por el momento no se ha aclarado.

#### 6.4.2. Alteraciones sistema OXPHOS

El defecto en la cadena enzimática de transporte de electrones mitocondrial más frecuentemente hallado en la EA ha sido una deficiencia en el complejo IV o COX (citocromo c oxidasa).

Originalmente se describió en plaquetas (Parker *et al.* 1989; Parker *et al.* 1994a), pero también se ha descrito una actividad reducida de la citocromo c oxidasa en varias áreas de la corteza cerebral de pacientes con EA analizados *post-mortem*, principalmente en las neuronas con ovillos neurofibrilares (Kish *et al.* 1992; Mutisya *et al.* 1994; Parker *et al.* 1994b). Por el contrario, otros estudios no encontraron diferencias significativas en la actividad de COX en cerebro (Sims *et al.* 1987; Cooper *et al.* 1993; Reichmann *et al.* 1993; Cavelier *et al.* 1995), plaquetas (Van Zuylen *et al.* 1992) o linfocitos (Molina *et al.* 1997). Recientemente han aparecido nuevos trabajos describiendo disminución de la actividad de COX en otras regiones del córtex, en hipocampo y de nuevo en plaquetas de pacientes con EA (Maurer *et al.* 2000; Bosetti *et al.* 2002; Mancuso *et al.* 2003). La actividad reducida de esta enzima se ha relacionado con sobreproducción de ROS y disminución en la producción de ATP (Cardoso *et al.* 2004). Estos descubrimientos sugieren que el estrés oxidativo puede causar la disfunción de la CRM. Además se ha observado que la inhibición farmacológica selectiva de COX en un modelo animal causa algunas alteraciones en la memoria similares a las de la EA (Bennett *et al.* 1992). Algunas de las cuestiones que surgen son: cuál es el origen de la deficiencia en la COX observada, cómo está relacionado con las alteraciones bioenergéticas mitocondriales y qué consecuencias tiene esto en el funcionamiento y supervivencia de la neurona.

### **6.4.3. Defectos observados mediante el análisis de cíbridos de pacientes con EA**

El uso de la técnica de cíbridos transmitocondriales (también denominadas células híbridas citoplasmáticas) ha facilitado enormemente el estudio de la correlación entre defectos de la CRM y del mtDNA. Esta técnica implica la transferencia de mitocondrias de pacientes a líneas celulares con mitocondrias deplecionadas de mtDNA (King *et al.* 1989). Estas líneas celulares se incuban inicialmente con bromuro de etidio para inhibir la replicación del mtDNA y obtener células sin mtDNA (Rho<sup>0</sup>). Estudios con esta técnica han demostrado que las deficiencias en la COX en plaquetas de pacientes con EA pueden ser transferidos a las células Rho<sup>0</sup>, las cuales retienen la deficiencia del citocromo c oxidasa (Davis *et al.* 1997; Swerdlow *et al.* 1997; Ghosh *et al.* 1999). Las diferencias funcionales observadas son consecuencia de defectos en el mtDNA de los pacientes. Los genes mitocondriales de plaquetas de pacientes con EAE expresados en cíbridos producen defectos bioenergéticos (Swerdlow *et al.* 1997; Cassarino *et al.* 1998; Khan *et al.* 2000), actividad COX reducida (Swerdlow *et al.* 1997), alteración en la señalización intracelular del calcio (Sheehan *et al.* 1997), aumento en la producción de radicales libres y de actividades de enzimas antioxidantes como la glutatión-peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa (Swerdlow *et al.* 1997). Los cíbridos de EAE secretan gran cantidad de las dos formas mayoritarias (de 40 y 42 aminoácidos) del péptido amiloide a través una vía dependiente de caspasa. El aumento de citocromo c citoplasmático y del procesamiento hiperactivo de la PPA son los responsables de esa secreción. Estos cíbridos además muestran densos depósitos amiloides Congo-rojo(+) en cultivo, reproduciendo el depósito temprano de placas amiloides que se da en el cerebro de pacientes con EA (Khan *et al.* 2000). Esto significa que la disminución de la actividad COX y otros defectos asociados a la mitocondria observados en pacientes con EA podrían estar directamente determinados por defectos en el mtDNA.

En general, las enfermedades asociadas a una disfunción mitocondrial se caracterizan por presentar mitocondrias morfológicamente anormales, infladas y con crestas deformadas. En un estudio realizado por Trimmer y colaboradores las mitocondrias de los cíbridos estaban marcadas con el colorante JC-1, sensible al potencial de membrana mitocondrial (Trimmer *et al.* 2000). El análisis por microscopía confocal de las mitocondrias marcadas con JC-1 reveló que el potencial de membrana mitocondrial se hallaba significativamente reducido en los cíbridos de EA y de EP en comparación con los controles. El análisis ultraestructural de los cíbridos control mostraba mitocondrias pequeñas, morfológicamente normales, redondas u ovaladas, con una matriz oscura y distribución regular de crestas. Los cíbridos de pacientes con EA mostraban un porcentaje elevado de mitocondrias ensanchadas o infladas con una matriz pálida y algunos restos de crestas. También se ha descrito en cíbridos de EA y EP otras características anómalas como inclusiones intramitocondriales de cristales y cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Estas observaciones sugieren que la transferencia de mtDNA de pacientes con EA o EP a células Rho<sup>0</sup> es suficiente para provocar cambios patológicos en la ultraestructura mitocondrial similares a los observados en otros trastornos

mitocondriales (Trimmer *et al.* 2000). También existe algún estudio con resultados opuestos: Ito y colaboradores han realizado estudios bioquímicos que demuestran que los cíbridos con mtDNA importado de plaquetas o de tejido cerebral de pacientes con EA restauran su actividad de la ETC a un nivel similar al de los cíbridos con mtDNA de controles de edad (Ito *et al.* 1999). Por otro lado, se han descrito problemas metodológicos que hacen cuestionar a algunos investigadores si las líneas celulares de cíbridos son adecuadas para asignar la causa de los defectos observados a auténticas mutaciones del mtDNA y, por tanto, si los cíbridos son un buen modelo para el estudio de enfermedades (Schon *et al.* 1998).

#### **6.4.4. Modelos animales de enfermedades degenerativas y envejecimiento**

Como se acaba de mencionar la alteración del sistema OXPHOS puede conducir a la producción de ROS e incrementar el estrés oxidativo. Una disminución en la producción de energía y un aumento en el estrés oxidativo en la mitocondria pueden contribuir a iniciar la apoptosis (Wallace 2001). La interacción de esos tres factores (producción de energía, radicales libres y apoptosis) parece tener un papel importante en la patofisiología de las enfermedades degenerativas. Existen enfermedades hereditarias causadas por mutaciones o por reordenamientos del mtDNA (ver **tabla 6**) que pueden afectar el sistema nervioso central (SNC), corazón y músculo esquelético, así como a los sistemas renal, endocrino y hematológico. La importancia de los defectos mitocondriales en las enfermedades degenerativas y en el envejecimiento se ha demostrado gracias a modelos animales de enfermedades mitocondriales.

Se han creado diversos modelos con mutaciones en el mtDNA mediante la introducción en la línea germinal de ratones hembra de la mutación de resistencia al cloranfenicol en el gen mitocondrial rRNA 16S. Esto producía defectos oftalmoplégicos en las quimeras y letalidad perinatal debido a la miopatía y cardiomiopatía que sufrían los animales mutantes (Levy *et al.* 1999). Los modelos animales de reordenamientos del mtDNA mostraban miopatía, cardiomiopatía y nefropatía. La inactivación condicional del gen del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) de ratón en el corazón causaba cardiomiopatía letal en recién nacidos, mientras que la inactivación en las células beta pancreáticas causaba diabetes (Wang *et al.* 1999). La inactivación del gen de la translocasa del nucleótido adenina (ANT1) ocasionaba miopatía, cardiomiopatía, producción aumentada de ROS y expresión aumentada de genes que compensarían esas alteraciones: genes relacionados con la producción de energía, defensas antioxidantes y apoptosis. Estos ratones también presentaban una tasa de mutación del mtDNA aumentada (Graham *et al.* 1997). Esto parece indicar que el síndrome de delección del mtDNA puede estar causado por el aumento del daño debido a ROS. La inactivación de genes antioxidantes mitocondriales como la glutatión peroxidasa o la superóxido dismutasa (SOD) causa disminución de la producción de energía y una dilatada cardiomiopatía letal en recién nacidos, respectivamente (Li *et al.* 1995; Lebovitz *et al.* 1996). El ratón SOD2<sup>(+/-)</sup>, deficiente parcial, presentaba daño mitocondrial durante el envejecimiento (Williams *et al.* 1998). El ratón deficiente

## Introducción

en citocromo c moría en las etapas iniciales de la embriogénesis. Células de estos embriones presentaban una ausencia total de apoptosis mitocondrial. Los ratones sin los genes proapoptóticos *Bax* y *Bak* no eran capaces de liberar citocromo c de la mitocondria por lo que causaban el bloqueo de la apoptosis. Estos estudios con animales confirman que las alteraciones en la producción de energía, la producción de ROS y la apoptosis pueden contribuir a la patofisiología de una enfermedad degenerativa. Para las enfermedades complejas como la EP y la EA esporádicas el estudio del ratón transgénico *sod1g93a* –modelo de la enfermedad ELA– ha permitido observar diversos mecanismos comunes (Kong *et al.* 1998): formación de agregados proteicos (como las placas y los ovillos) y cambios de conformación de proteínas (el ejemplo típico es el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>); disfunción de los proteosomas y aparición de material ubiquitinado; estrés oxidativo, alteraciones mitocondriales, apoptosis, activación de la cadena de caspasas y, por último, muerte neuronal.

Existen ratones transgénicos que reproducen la EA. Los genes modificados en los diversos modelos que hay son análogos a la *PPA* o *PSEN* humanas y acaban causando en el fenotipo la neuropatología de las placas amiloides debida a un aumento en la producción de péptido amiloide (Howlett *et al.* 2004). Por lo tanto estos ratones, aunque han contribuido al conocimiento sobre diversos aspectos patogénicos relacionados con la enfermedad, más bien se ajustan a lo que ocurre en la EA de tipo familiar.

### 6.4.5. Alteraciones genoma mitocondrial

Algunas enfermedades neurodegenerativas con alteración mitocondrial son consecuencia de mutaciones en el mtDNA. En la **tabla 6** hay diferentes ejemplos de enfermedades mitocondriales, hereditarias o adquiridas, que presentan mutaciones en el mtDNA responsables de causar la enfermedad. Los descubrimientos descritos en los apartados anteriores suscitaron la cuestión sobre si alteraciones del genoma mitocondrial, heredadas o adquiridas, son las causas de las modificaciones observadas del metabolismo mitocondrial descritas en la EA. El origen de los defectos en el sistema OXPHOS en la EAE y si son causa o consecuencia no está totalmente claro. Diversos grupos han descrito alteraciones del mtDNA que pueden generar componentes de la CRM/sistema OXPHOS defectuosos o un número reducido de ellos. Para estos autores los defectos observados en el sistema OXPHOS se deben a anomalías del mtDNA y son responsables de muchos de los defectos mitocondriales descritos en la EA.

Aunque existen muchas evidencias de que la función mitocondrial puede estar desequilibrada en la EA el papel patogénico de las mutaciones del mtDNA es controvertido. La primera mutación candidata se describió en 1992 (Lin *et al.* 1992b). La transición G5460A en el gen mitocondrial ND2 (que codifica una subunidad del complejo I de la CRM) se encontró en el cerebro de 10 de 19 pacientes con EA y estaba ausente en los 11 controles analizados. Posteriormente otros grupos no pudieron confirmar la asociación entre la transición G5460A y la EA (Petruzzella *et al.* 1992; Kosel *et al.* 1994; Janetzky *et al.* 1996; Schnopp *et al.* 1996). La posibilidad de que este cambio pueda ser un polimorfismo neutro es la más aceptada actualmente. Se ha descrito la presencia de diversas

variantes del mtDNA en la EA pero no se ha podido establecer una conclusión definitiva sobre su incidencia en la enfermedad. En la **tabla 8** se puede observar un resumen de los estudios que han analizado las variantes más debatidas en la literatura. Los resultados contradictorios entre los diferentes estudios no permiten confirmar la existencia de una mutación puntual que explique las anomalías mitocondriales observadas en la EA. En otras enfermedades neurodegenerativas este aspecto sí está confirmado. La ataxia de Friedreich es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por presentar ataxia, diabetes mellitus y cardiomiopatía; la expansión de tres nucleótidos (GAA) en el cromosoma 9 provoca una disminución de la proteína mitocondrial frataxina implicada en el transporte de hierro ocasionando la depleción del mtDNA, deficiencia en la fosforilación oxidativa e hipersensibilidad al estrés oxidativo. La paraplejía espástica hereditaria, la distonia y la enfermedad de Huntigton son otras enfermedades neurodegenerativas hereditarias en las cuales se han identificado o asociado mutaciones en proteínas con función en la mitocondria (Beal 2000).

<b>TABLA 8. MUTACIONES PUNTUALES DEL mtDNA DESCRITAS EN LA EAE</b>				
<b>%EAE</b>	<b>%Controles edad avanzada</b>	<b>%Controles edad normal</b>	<b>Tejido analizado</b>	<b>Referencia</b>
<b>A3397G (gen ND1)</b>				
1,5	0	0	Cerebro	(Shoffner <i>et al.</i> 1993)
0	0	-	Cerebro	(Hutchin <i>et al.</i> 1997)
0	0	-	Cerebro	(Zsurka <i>et al.</i> 1998)
0	0	-	Sangre - Cerebro	(Tanno <i>et al.</i> 1998) <sup>1</sup>
<b>G5460A/T (gen ND2)</b>				
52,6	0	-	Cerebro	(Lin <i>et al.</i> 1992b)
53,3	0	-	Cerebro	(Torrioni <i>et al.</i> 1992) <sup>2</sup>
0	3,6	-	Cerebro	(Kosel <i>et al.</i> 1994)
0	3	-	Cerebro - Sangre	(Janetzky <i>et al.</i> 1996)
3,1	2,6	2,8	Cerebro	(Hutchin <i>et al.</i> 1997)
2,5	2,9	-	Sangre	(Edland <i>et al.</i> 2002)
<b>G3196A (gen rRNA 16S)</b>				
0,7	-	0	Cerebro	(Shoffner <i>et al.</i> 1993)
0	0	-	Cerebro	(Hutchin <i>et al.</i> 1997)
0	0	-	Sangre - Cerebro	(Tanno <i>et al.</i> 1998) <sup>1</sup>
1 Petruzzella y colaboradores no fueron capaces de detectar esta mutación en las mismas muestras (Petruzzella <i>et al.</i> 1992).				
2 Población japonesa.				

Los estudios de mutaciones puntuales en la EAE han sido parcialmente entorpecidos por la presencia de fragmentos de mtDNA ancestrales incorporados al genoma nuclear, o pseudogenes nucleares. En 1997 Davis y colaboradores describieron seis mutaciones puntuales nuevas en el

## Introducción

mtDNA de pacientes con EA y en controles, y que además la proporción de estos polimorfismos era significativamente mayor en el DNA extraído a partir de plaquetas de pacientes con EA (Davis *et al.* 1997; Fahy *et al.* 1997). Tres de estas mutaciones afectaban a la subunidad I de la COX (G6366A, C6483T, A7146G) mientras que las otras tres afectaban a la subunidad II de la COX (C7650T, C7868T, y A8021G). En estudios posteriores estas mutaciones fueron identificadas como artefactos derivados de la amplificación mediante PCR de DNA nuclear (Hirano *et al.* 1997), y específicamente de pseudogenes que han incorporado fragmentos de mtDNA en el genoma nuclear (Wallace *et al.* 1997; Davis *et al.* 1998). La deficiencia en la actividad de la enzima COX descrita frecuentemente en la EA no está apoyada por hallazgos sólidos de mutaciones puntuales en el mtDNA.

Se han asociado otras mutaciones en el mtDNA de línea germinal a la EA de inicio tardío. La mutación que se ha hallado con más frecuencia por diferentes grupos es la variante A4336G. En la **tabla 9** se resumen los principales resultados descritos sobre esta variante del mtDNA. La mutación A4336G del gen del tRNA de la glutamina (tRNA<sup>Gln</sup>) se ha observado en el 5% de pacientes con EA de inicio tardío (Shoffner *et al.* 1993; Brown *et al.* 1996). El estudio de esta mutación por otros grupos muestra resultados contradictorios, con porcentajes variables en los individuos con EA analizados. También hay grupos que no han confirmado la prevalencia de la mutación A4336G (**tabla 9**).

TABLA 9. LA MUTACIÓN A4336G DEL TRNA <sup>Gln</sup> DEL mtDNA EN LA EAE				
%EAE	%Controles edad avanzada	%Controles edad normal	Tejido analizado	Referencia
5,2	0	0,7	Cerebro	(Shoffner <i>et al.</i> 1993)
4,1	0,3	-	Cerebro	(Hutchin <i>et al.</i> 1995)
0,6	3,8	-	Sangre	(Wragg <i>et al.</i> 1995)
0	1,7	2,2	Cerebro	(Hutchin <i>et al.</i> 1997)
1,4	2,5	-	Sangre	(Zsurka <i>et al.</i> 1998) <sup>1</sup>
0	0	-	Cerebro - Sangre	(Tanno <i>et al.</i> 1998) <sup>2</sup>
4,3	3,3	-	Cerebro	(Chinnery <i>et al.</i> 2001) <sup>1</sup>
0,6	1,3	1,4	Sangre	(Garcia-Lozano <i>et al.</i> 2002)
2,5	2,9	-	Sangre	(Edland <i>et al.</i> 2002) <sup>1b</sup>

1 La asociación entre APOE y A4436G dio resultado negativo.  
1b A43336G asociado con el alelo APOE4: 5 de 139 pacientes con EA; 0 de 82 controles.  
2 Población japonesa.

Como se puede observar en las **tablas 8 y 9** se han identificado diversos polimorfismos en pacientes con EA, pero ninguno de ellos es común a todos y pueden ser debidos a la variabilidad propia del mtDNA humano. El papel patogénico de estos polimorfismos no ha podido establecerse a pesar de estos descubrimientos. Se ha sugerido que la presencia de estas variantes, sobretudo la A4336G, podría ser simplemente un marcador de la implicación mitocondrial en algunos casos de

EA, pero no parece que jueguen un papel significativo en la mayoría de pacientes con EA (Bonilla *et al.* 1999).

Los estudios que han analizado la asociación entre polimorfismos del mtDNA y el genotipo APOE presentan resultados contradictorios. Edland y colaboradores han descrito que la prevalencia del polimorfismo A4336G era superior en individuos con EA portadores del alelo  $\epsilon 4$  de APOE (Edland *et al.* 2002). Estos autores indican que el genotipo APOE puede ser un modificador importante del efecto de A4336G y esto podría explicar la variabilidad que hay entre los diferentes estudios. Sin embargo también hay estudios que no han confirmado esos descubrimientos de la asociación entre APOE y polimorfismos del mtDNA (Zsurka *et al.* 1998; Chinnery *et al.* 2000).

El genoma mitocondrial también se ha relacionado con la EA a través de diferentes trabajos que sugieren un papel protector de los haplogrupos (combinación de distintos polimorfismos) europeos del mtDNA J y Uk (Chagnon *et al.* 1999; van der Walt *et al.* 2004) que también se han asociado a mayor longevidad (Coskun *et al.* 2003). Los dos subhaplogrupos europeos J1 y Uk tienen la misma mutación en la posición 14.978 del gen de citocromo b y el subhaplogrupo J2 tiene una mutación diferente en la posición 15.257. Ambas mutaciones del citocromo b alteran aminoácidos conservados de los dos lugares de unión de la coenzima  $Q_{10}$  y esto puede afectar al bombeo de protones asociado al complejo III (ver **figura 10**). Estas mutaciones desacoplan parcialmente el gradiente electroquímico de la MMI y podrían mantener los componentes de la CRM oxidados, lo que podría disminuir la producción de ROS. Esto puede reducir el daño oxidativo cerebral y las mutaciones somáticas del mtDNA, lo cual explicaría el efecto protector de estos linajes de mtDNA en la EA (Coskun *et al.* 2003; Ruiz-Pesini *et al.* 2004).

Carrieri y colaboradores han encontrado diferencias al examinar la distribución de los haplogrupos de mtDNA entre portadores del alelo  $\epsilon 4$  del gen APOE y no portadores (Carrieri *et al.* 2001). Estos autores detallan que la interacción APOE/mtDNA se restringe a la EA y que debe afectar a la susceptibilidad a la enfermedad. Algunos haplogrupos, en particular los designados con las letras K y U, parece que neutralizan el efecto perjudicial del alelo  $\epsilon 4$  (Carrieri *et al.* 2001).

Lin y colaboradores han cuantificado el número de mutaciones puntuales presentes –los autores lo denominan “carga mutacional”– en un fragmento de 1.197 pb del gen de la citocromo oxidasa del mtDNA en pacientes con EA, controles envejecidos y controles de edad joven (Lin *et al.* 2002). La estrategia utilizada se basaba en las técnicas de PCR, clonaje y secuenciación, evitando problemas artefactuales y amplificación de pseudogenes. La cantidad de mutaciones puntuales, la distribución de las tres posiciones de los codones y la frecuencia de cambios de aminoácido que encontraron en pacientes y controles envejecidos era similar. La media de “carga mutacional” en pacientes con EA y controles envejecidos era el doble que en los controles jóvenes, lo que para los autores quiere decir que las mutaciones puntuales se acumulan o se adquieren con la edad (Lin *et al.* 2002). En este estudio también se midió la actividad de la enzima COX de la CRM y se halló un descenso del 20% en los pacientes con EA y controles envejecidos respecto a la media de los controles de edad joven.

## Introducción

Coskun y colaboradores han analizado la región control (CR) del mtDNA extraído de córtex frontal de pacientes con EA y de controles. Estos autores han descrito en los pacientes con EA un aumento “llamativo” de mutaciones en elementos implicados en la transcripción de la cadena ligera del mtDNA y/o la replicación de la cadena pesada, y también han observado que estas mutaciones están asociadas a una reducción de la cantidad de mRNA del gen mitocondrial ND6 y del número de copias de mtDNA (Coskun *et al.* 2004). El 65% de los pacientes con EA presentaba la mutación T414G, esta mutación no se detectó en controles. En general, los pacientes presentaban mutaciones que alcanzaban el 63% de media de heteroplasmia. Algunos de los pacientes con EA eran portadores de las mutaciones T414C y T477C que los autores han definido como específicas para la enfermedad. También han identificado las mutaciones T477C, T416C y T195C en diversos pacientes de edades entre 74 y 83 años en grados que alcanzaban el 70-80% de heteroplasmia. Para estos autores la presencia de estas mutaciones somáticas del mtDNA pueden ser responsables de la aparición esporádica de los defectos mitocondriales observados en la EA de inicio tardío y contribuir de esta forma a la etiología de la enfermedad (Coskun *et al.* 2004). Existen estudios previos que han analizado la CR en los que no se descubría ninguna diferencia significativa entre pacientes con EA y controles al analizar la cantidad de estas mutaciones somáticas en cerebro (Chinnery *et al.* 2001; Simon *et al.* 2001). La mutación T414G en concreto, no se detectó en ninguno de los individuos estudiados en los dos trabajos citados. Recientemente nuestro grupo de DNA mitocondrial, en un trabajo encabezado por la Dra. Montse Gómez, ha detectado esta mutación en mtDNA extraído de enfermos con cáncer de próstata (resultados no publicados).

La incidencia de los **reordenamientos** en la EA se ha analizado principalmente mediante la cuantificación de la deleción común (delta 4977) en los pacientes. Se ha observado que la proporción de esta deleción es 15 veces mayor en diversas áreas cerebrales (córtex, putamen, y cerebelo) de pacientes con EA de edad hasta 75 años (Corral-Debrinski *et al.* 1994). También se han observado proporciones elevadas de la deleción en el córtex temporal de pacientes (Hamblet *et al.* 1997). Sin embargo, otros investigadores no han hallado diferencias significativas en la proporción de moléculas con la deleción común entre pacientes y controles (Blanchard *et al.* 1993; Lezza *et al.* 1999; Chang *et al.* 2000). El análisis de otras deleciones y reordenamientos ha sido también investigado. Gu y colegas han estudiado muestras procedentes de pacientes con Parkinson, pacientes con EA y en controles mediante la técnica de PCR larga –técnica capaz de amplificar fragmentos de hasta 20 kb de DNA– demostrando que la EP presenta mayor número y diversidad de reordenamientos del mtDNA que individuos control o con EA (Gu *et al.* 2002).

El estudio de la **expresión génica** de mRNA mitocondriales se llevó a cabo a raíz de los descubrimientos sobre la actividad reducida de la COX. La hipótesis es que la alteración de la expresión de los genes mitocondriales que codifican subunidades de la COX provoca la disminución en la actividad COX descrita en algunos pacientes con EA. De esta manera, los primeros estudios se centraron en las subunidades codificadas por el mtDNA de la COX y posteriormente el análisis de la expresión génica se ha extendido a otros RNA mitocondriales y también a algunos RNA nucleares de subunidades de la CRM.



En 1994 se describió en pacientes con EA una reducción en las cantidades de mRNA de las subunidades I y III de la COX codificadas por el mtDNA de neocórtex (Chandrasekaran *et al.* 1994). En los mismos pacientes no se detectó alteración en la expresión del gen mitocondrial 12S. Otro grupo también halló reducción en la cantidad de mRNA de la subunidad II de la COX codificada por el mtDNA en hipocampo, mientras que la cantidad de la subunidad IV codificada por el núcleo no estaba alterada (Simonian *et al.* 1994) La reducción en la cantidad de mRNA de la subunidad IV se ha detectado junto a la reducción en la subunidad beta del complejo ATP sintasa por otros autores en el córtex medio-temporal (Chandrasekaran *et al.* 1997). Aksenov y colaboradores observaron una proporción alterada entre las cantidades de mRNA de las subunidades II y IV de la COX en varias áreas cerebrales (hipocampo, lóbulo parietal inferior y cerebelo) (Aksenov *et al.* 1999). También describieron una disminución coordinada de las cantidades de mRNA de las subunidades 4 (mitocondrial) y 15 (nuclear) de la NADH en el hipocampo y en el lóbulo parietal inferior pero no en el cerebelo. Además del estudio realizado por Coskun y colaboradores mencionado previamente, recientemente ha habido otro trabajo sobre la expresión génica mitocondrial en la EA: Manczak y colaboradores han descrito que la expresión de genes mitocondriales de las subunidades de la CRM presenta una gran variabilidad en los pacientes con EA y que esta puede ser la causa de la heterogeneidad observada en el fenotipo de los pacientes (Manczak *et al.* 2004).

## **6.5. La complejidad de la EA esporádica**

Las causas de la aparición y progreso de la EA esporádica no se conocen por completo. Como se ha visto a lo largo de la introducción, existen evidencias que implican a la disfunción mitocondrial. Esta disfunción puede provocar que la producción de ATP y de moléculas ROS esté desequilibrada aunque no se ha establecido de forma inequívoca en qué lugar se sitúan los cambios mitocondriales en la cascada de sucesos que se dan en la EAE. La interacción entre los mecanismos moleculares descritos en relación con la mitocondria parece ser muy estrecha, incluso puede hablarse de retroalimentación entre algunos de estos mecanismos que finalmente pueden conducir a la degeneración celular. En la **figura 19** se muestra un esquema que resume la interacción entre los diferentes procesos relacionados con la mitocondria implicados en la EA.

