



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO:

**ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y
MECANISMOS DE CONTROL DE CALIDAD
CELULAR: AUTOFAGIA Y ALZHEIMER.**

Autor: Patricia Marqués González

Tutor: Carlos Guillén Viejo

Convocatoria: Junio 2018

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es considerada la “epidemia silenciosa” del siglo XXI, debido al creciente número de casos nuevos cada año y a la tardía aparición de los síntomas, lo que conlleva un fuerte impacto tanto a nivel clínico como social.

A pesar de que las causas de esta devastadora enfermedad aún son desconocidas, en los últimos años se han producido avances destacables respecto a los mecanismos moleculares de la misma, especialmente en cuanto al papel del péptido β -amiloide (β A) y de la proteína Tau (τ).

En este contexto, y especialmente a raíz de los descubrimientos de Yoshinori Ohsumi, premio Nobel de Medicina en 2016, los mecanismos de la autofagia y las posibles alteraciones que puedan sufrir, tanto estructuralmente como en su regulación, han cobrado un especial protagonismo en los últimos años debido a la implicación que parecen tener en patologías como la Diabetes Mellitus tipo II (T2DM), el cáncer o algunas enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, cada vez parece más evidente la conexión entre el reciclaje celular gobernado por la autofagia y la EA, ya que el fracaso en los procesos degradativos y de aclaramiento celular conlleva un acúmulo de proteínas aberrantes y un aumento del estrés celular que, en definitiva, favorece la fisiopatología de la enfermedad.

La comprensión y el estudio exhaustivo de estos procesos de control de calidad citoplasmático podría dilucidar algunos de los puntos clave de la etiología multifactorial de la EA, e incluso proponer una alternativa terapéutica, o al menos paliativa, basada en la toma del control de la ruta autofágica y de sus vías de regulación.

PALABRAS CLAVE: Alzheimer, autofagia, β -amiloide, Tau

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. Autofagia.

El término autofagia, que procede del griego “auto” (a uno mismo) y “fagia” (comer), se refiere a toda vía degradativa de la célula que supone la entrega de contenido citoplasmático al lisosoma¹, con el consecuente reciclaje de los constituyentes macromoleculares del mismo.

Se pueden distinguir tres variantes de este proceso, que se diferencian en sus funciones fisiológicas y la forma en la que el contenido citoplasmático se libera al lisosoma: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas.

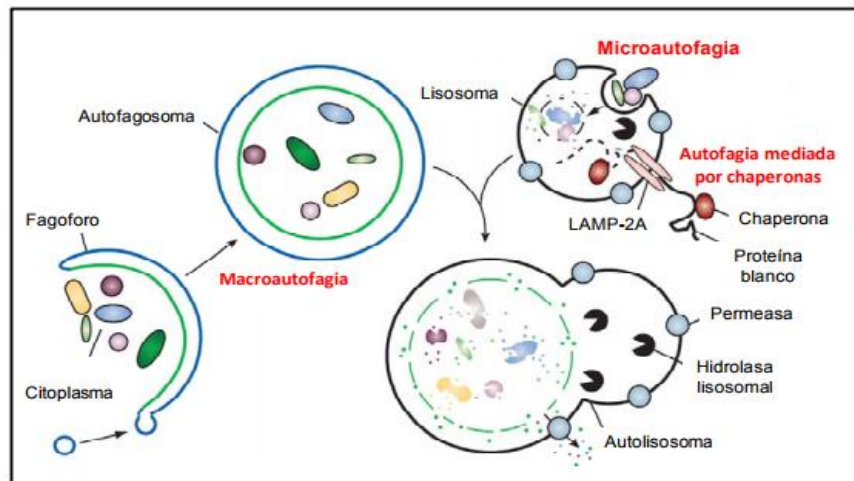


Figura 1. Diferentes modalidades de autofagia. La figura resume los diferentes tipos de autofagia (macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas). Adaptado de Mizushima *et al*, (5)

- **Microautofagia:** se trata de una forma de autofagia en la cual el contenido citoplasmático destinado a la degradación es tomado por la vacuola directamente mediante invaginación de la membrana.² Este proceso degrada proteínas citosólicas, de manera selectiva o no; una vez separadas de la membrana, las invaginaciones dejan expuesto el material citosólico secuestrado a disposición de las enzimas lisosomales, que lo degradan.³
- **Autofagia mediada por chaperonas:** en este proceso, las proteínas citosólicas marcadas para degradarse son directamente enviadas al lisosoma, de forma que es alrededor del 30% del proteoma citosólico el que sigue esta vía de degradación.² La autofagia mediada por chaperonas sólo degrada proteínas solubles que llevan un motivo KFERQ unido a chaperonas hsc70 que lo reconocen.
- **Macroautofagia:** la macroautofagia es la vía más estudiada y, a diferencia de los otros dos tipos, supone que se produzcan cambios morfológicos en los compartimentos vesiculares, que ocupan una gran parte del citoplasma.

Estas vesículas de doble membrana, más conocidas como autofagosomas, pueden secuestrar grandes porciones del citoplasma, incluyendo orgánulos enteros; este proceso macroautofágico está dotado de un enorme potencial metabólico que, en unas condiciones

particulares, puede contribuir a regular la muerte celular o, como se comentará más adelante, a la atrofia celular que lleva a la neurodegeneración.⁴

Durante la macroautofagia, se produce la formación de los autofagosomas, su fusión con el lisosoma y la degradación lisosomal. La forma lipídica de LC3B (LC3B-II), forma parte de los autofagosomas, y permite la captación de los sustratos mediante la unión a diversos receptores de autofagia³, así como el cierre de los autofagosomas. La proteína adaptadora p62, también conocida como secuestrosoma (SQSTM1), es capaz de unirse tanto a la ubiquitina presente en agregados proteicos u orgánulos destinados a la degradación, como al LC3B-II de la membrana del autofagosoma, lo que permite degradar los sustratos por autofagia.

Iniciación: en respuesta a estímulos de estrés y daño celular, incluida la privación de nutrientes, la formación del autofagosoma se inicia por el ensamblaje y la activación del complejo multiproteico que contiene Atg13, Atg101, RB1CC1 (RB1 inducible coiled-coil 1, más conocida como FIP200) y la quinasa activadora de la autofagia, ULK1 (ortóloga en mamíferos de Atg1), los cuales median la formación del sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS).⁴ Este proceso de activación se produce en las membranas que contienen proteínas Atg9, lo que trae consigo una fosforilación de dichas proteínas de una manera ULK1-dependiente.

Este evento supone la elongación de las membranas del pre-autofagosoma mediante la incorporación de fosfolípidos de varias fuentes, incluyendo el retículo endoplásmico, el Golgi o el ERGIC (compartimento intermediario entre el RE y el aparato de Golgi), el reciclaje de endosomas y la mitocondria, lo que permite el reclutamiento de un complejo multiproteico con actividad PI3K, lo que derivará en cambios en la composición lipídica para formar el fagóforo³.

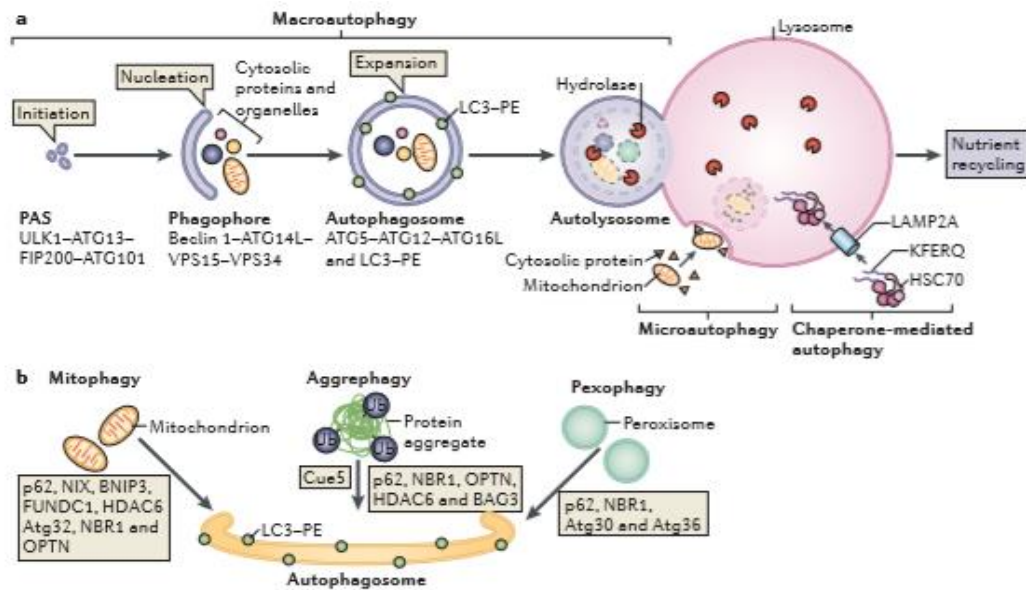


Figura 2: Vías autofágicas en mamíferos. Debnath et al., 2015.

Finalmente, en la fase de expansión, se recluta el complejo Atg12-Atg5-Atg16 a la membrana del autofagosoma, donde se facilita la lipidación de LC3B, requerida para la expansión de la membrana.

Maduración: los autofagosomas pueden fusionarse directamente con los lisosomas, o pueden recibir contenido celular vía endocítica o de orgánulos híbridos denominados anfisomas. Los autofagosomas o los anfisomas son transportados mediante los microtúbulos hasta el centro organizador de microtúbulos, donde se agrupan los lisosomas.

Fusión: los autofagosomas o anfisomas se fusionan con los lisosomas para generar autolisosomas. Tras esto, se produce la degradación del contenido de los autofagosomas y las macromoléculas principalmente, pueden ser recicladas.

Además de estas tres vías, generalmente englobadas como autofagia no selectiva, existen en las células de mamífero otras rutas que se denominan, de manera general, autofagia selectiva o específica³. Esta distinción se debe a que durante estos procesos, las vesículas unidas a la membrana reclutan orgánulos específicos, en lugar del citoplasma al azar, y además de la maquinaria central, está involucrado un ligando del contenido específico o cargo y un receptor, así como un *scaffold* que actúe de puente específico entre la carga citoplasmática y la maquinaria central. Hay diversos tipos de vías específicas de degradación aunque se hará especial hincapié en la mitofagia, debido a la particular relevancia que tiene la dinámica

mitocondrial en la patología neurodegenerativa, ya que se produce una disfunción mitocondrial por defecto en la mitofagia².

2.1.1. Dinámica mitocondrial y mitofagia.

Las mitocondrias son orgánulos esenciales que regulan la homeostasis energética celular, así como la muerte celular. La dinámica mitocondrial hace referencia a los procesos de fusión y fisión, que se producen de manera constante en dichos orgánulos, de forma que se mantienen siempre en una proporción relativamente constante gracias al balance entre los procesos de formación o biogénesis y de degradación o mitofagia.

La fusión mitocondrial en mamíferos está mediada por tres proteínas con actividad GTPasa: mitofusinas (Mfn1 y Mfn2), localizadas en la membrana mitocondrial externa, y OPA1 (proteína de la atrofia óptica) en la membrana mitocondrial interna.⁵ La fisión mitocondrial está mediada por Fis1 (proteína de fisión 1) y Mff (factor de fisión mitocondrial)), ambos localizados en la membrana mitocondrial externa.

Frente a un daño mitocondrial, se pierde el potencial de membrana mitocondrial y se induce el proceso mitofágico, caracterizado por dos fases: la inducción general de la autofagia y el marcaje de mitocondrias dañadas, mediado principalmente por la vía PINK1-Parkina.¹

El primer evento para el control de la calidad por la mitofagia es la distinción entre las mitocondrias sanas y las dañadas (despolarizadas), distinguiéndose por la acumulación de PINK1. PINK1 (la quinasa inducida por PTEN) se acumula rápidamente en las mitocondrias dañadas y que presentan un bajo potencial de membrana, de forma que PINK1, en mitocondrias sanas, es bastante bajo gracias a su corte proteolítico por PARL (proteína romboidea asociada a presenilinas) y posterior degradación por el sistema ubiquitín-proteasoma. La Parkina (ubiquitin ligasa, E3), a través de la actividad serina-treonina quinasa de PINK1, es reclutada a las mitocondrias despolarizadas, desde donde media la ubiquitinación de proteínas mitocondriales. Estas proteínas mitocondriales son reconocidas por la proteína adaptadora p62, lo que es esencial para su eliminación, ya que al unirse a LC3B-II, dirige a estas mitocondrias al autofagosoma. Algunas de las proteínas son reclutadas para ser degradadas por el sistema ubiquitín-proteasoma, como por ejemplo las mitofusinas.

2.1.2. Regulación de los procesos autofágicos.

La formación del autofagosoma es un proceso dividido en varias etapas, y debido a su complejidad, se requieren algunas proteínas Atg de regulación y control, que son reclutadas al fagóforo para cumplir su función. Estas proteínas reguladoras son, fundamentalmente: las pertenecientes al complejo Atg1, requerido durante la iniciación, nucleación y expansión del autofagosoma; el complejo Beclina 1/hVps34, involucrado en la fase de nucleación; LC3B y Atg12, debido a que durante la fase de iniciación, Atg7 inicia la conjugación de Atg12 con Atg5, lo que a su vez promueve la conjugación de LC3B con fosfatidiletanolamina, esencial para la fase de elongación; y Atg9 y Atg1, debido al control del reciclaje de las demás proteínas Atg durante la formación de los autofagosomas.⁶

Una de las grandes protagonistas en la regulación de la autofagia es la vía de señalización de la diana de rapamicina de mamífero (mTOR). mTOR es una quinasa involucrada en la regulación de un gran número de funciones celulares, principalmente en la activación de la síntesis de proteínas y en la respuesta a multitud de estímulos. mTOR forma parte de dos complejos, mTORC1 y mTORC2, de los cuales mTORC1 parece ser el principal implicado en la regulación de la autofagia.¹

En unas condiciones de abundancia de nutrientes, mTOR se activa principalmente a través de una cascada de señalización que implica la activación de PI3K de clase I/Akt, la fosforilación de TSC2 (uno de los reguladores principales de la ruta) y la activación de Rheb, la cual se encuentra unida a GTP y cuya activación, activa a su vez mTOR.

Ante una situación de privación de nutrientes, la vía PI3K/Akt está inhibida; una fosforilación dependiente de AMPK de TSC2, supone su activación y, con ello, la inactivación de mTORC1. Por otro lado, la AMPK es capaz de producir la inactivación directa de raptor, un componente esencial del complejo mTORC1, por fosforilación.

Además de la propia regulación interna, la interconexión de las vías AMPK/mTOR está a su vez regulado por distintas y complejas cascadas de señalización que modulan sus funciones, de forma que uno de los mecanismos por los que estas rutas son capaces de controlar la autofagia es a través de la regulación del complejo Atg1.¹

En condiciones de privación de nutrientes, mTORC1 se disocia del lisosoma, lo que resulta en una iniciación de la autofagia; la AMPK está involucrada en la regulación autofágica no

solo debido a su efecto inhibitorio sobre mTOR, si no también por su capacidad de fosforilar y activar directamente a ULK1/2.

2.2. La enfermedad de Alzheimer (EA).

La enfermedad de Alzheimer (EA) se define como un proceso progresivo de deterioro cognitivo y funcional al que en el transcurso del tiempo se asocian cambios en el estado de ánimo con alteraciones psicóticas y de la conducta. Las alteraciones neuropatológicas que provocan estos cambios se sitúan principalmente en la corteza cerebral, fundamentalmente en las áreas temporo-parietales.⁷

Estas alteraciones neuroanatómicas explican la disfuncionalidad en la neurotransmisión, y a pesar de la correlación en los pacientes, algunos de ellos presentan manifestaciones clínicas atípicas. Cada uno de estos signos refleja la acumulación de proteínas anómalas en el cerebro resultantes de cambios estructurales del citoesqueleto.⁸

2.2.1. Etiopatología.

A lo largo de los años de investigación, se han asentado 6 teorías etiopatogénicas que pueden explicar la EA: déficit colinérgico, fallo genético, acumulación de proteínas anómalas, el agente infeccioso, la toxina ambiental y el flujo cerebral deficitario.⁷ Se han observado dos tipos de lesiones cerebrales que definen histopatológicamente la enfermedad de Alzheimer:

- Lesiones positivas: placas seniles y ovillos neurofibrilares.
- Lesiones negativas: pérdida de neuronas y su sinapsis.
- Placas seniles: depósitos extracelulares compuestos principalmente por el péptido β -amiloide, un producto derivado del catabolismo de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP).⁹

Las placas seniles son focos esféricos que contienen residuos neuríticos argentófilos, amiloide extracelular, astrogía y microglía, que representan lugares de interacciones sinápticas defectuosas predominantes en amígdala, hipocampo y neocórtex. Hay dos tipos de placas: placas difusas (depósitos inmunorreactivos de β A que no alteran visiblemente el neuropilo circundante ni inducen respuesta glial a su alrededor, considerándose benignas) y placas compactas (poseen un *core* positivo para tinciones histológicas específicas para la

conformación de hoja- β plegada de las fibras de amiloide y se consideran más tóxicas y más específicas de la EA).

- Ovillos neurofibrilares: depósitos intraneuronales compuestos de la proteína asociada a microtúbulos Tau (τ) anormalmente plegada e hiperfosforilada.

Existe una alteración masiva del citoesqueleto de las neuronas representada por los PHF (filamentos apareados en hélice), que se acumulan en determinadas neuronas como NFT (ovillos neurofibrilares). Los NFT son masas fibrilares no ligadas a membranas que se forman en el citoplasma perinuclear de neuronas en hipocampo, amígdala, corteza cerebral y en núcleos subcorticales. Estas fibras se muestran como filamentos apareados en hélice (PHF). La acumulación de PHF y otras fibras en neuritas y somas celulares ha sido correlacionada estadísticamente con el grado de demencia, con la pérdida neuronal en hipocampo y con el déficit cortical de acetilcolina transferasa.

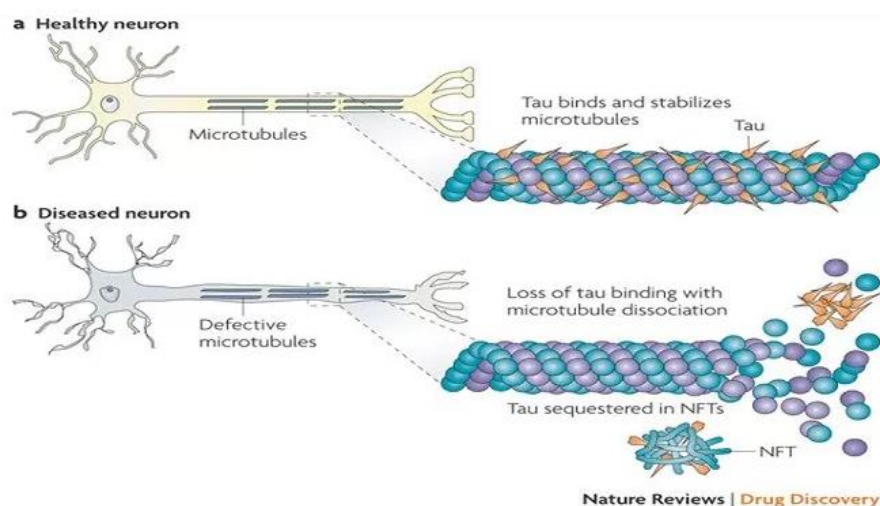


Figura 3: Patología Tau en la enfermedad de Alzheimer (EA). LaFerla FM, 2008.

Parece probable que el desarrollo de NFT represente un estado de degeneración neuronal en que los PHF extracelulares marcan el lugar de la muerte celular. Se ha descubierto que los PHF contienen ubiquitina, polipéptido integrante del sistema proteolítico del ATP y posiblemente responsable de la degradación de proteínas intracelulares anómalas.

Tanto la cantidad de ovillos neurofibrilares como la pérdida neuronal y sináptica se correlacionan con la gravedad de la demencia, pero sin embargo, la carga amiloide no tiene por qué ser un indicativo de la gravedad sintomática. La hipótesis más aceptada en la actualidad, conocida como la *hipótesis de la cascada amiloide*, postula que βA es el

desencadenante del deterioro neurofuncional como se detallará a continuación, así como finalmente, la muerte neuronal. Se ha demostrado recientemente que la β A adopta un papel favorecedor y como agente causal sobre la patología Tau,⁹ debido fundamentalmente a la genética.

2.2.2. El péptido β -amiloide (β A).

El péptido β A es un producto resultante del catabolismo de la amilina (APP), tras su escisión secuencial por las enzimas β y γ -secretasas. Este proceso amiloidogénico sucede mayoritariamente a nivel de los endosomas tardíos tras endocitarse APP desde la membrana plasmática.

Estas proteínas amiloideas están presentes en otros mamíferos y parecen asociarse a procesos degenerativos corticales. La subunidad proteica A-4 del amiloide, un agregado polipeptídico, es un producto neuronal que deriva de un precursor similar a un receptor glucosilado de superficie. Este precursor se codifica en el cromosoma 21 y se manifiesta como un catabolito aberrante en la EA y en el síndrome de Down.⁷

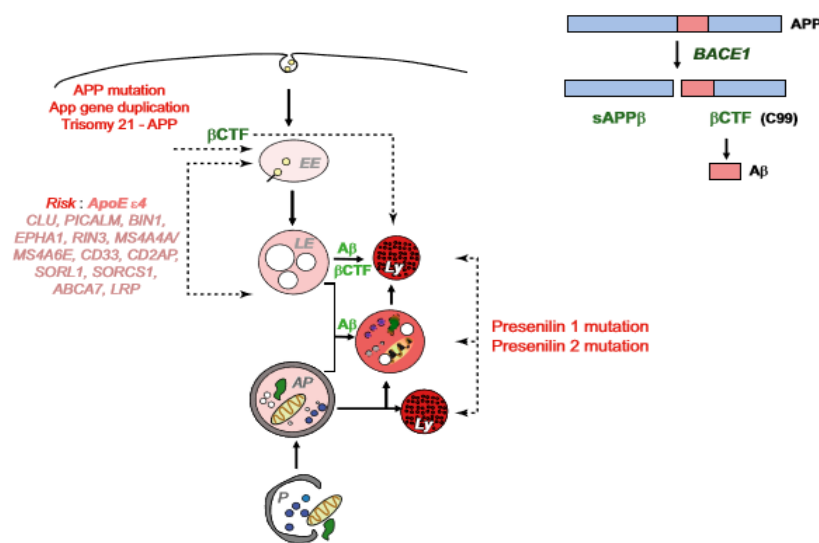


Figura 4: APP y la vía endosomal-lisosomal (ELN) están implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Nixon RA, 2017.

Existe una vía no amiloidogénica en la que la enzima α -secretasa escinde APP dentro de la secuencia aminoacídica correspondiente a β A, impidiendo así su generación. En condiciones normales se producen concentraciones muy bajas del péptido β A, de forma que existe un equilibrio entre la formación y la degradación mediado por enzimas degradadoras como la

neprilisina, la enzima degradadora de insulina (EDI) y posiblemente, también la ECA-I (enzima convertidora de angiotensina-I). Recientemente, experimentos en ratones han demostrado que los niveles de β A en el fluido intersticial del cerebro aumentan cuando lo hace la actividad neuronal y disminuyen cuando ésta es inhibida.⁹ La actividad sináptica induciría la endocitosis de APP desde la membrana plasmática y favorecería así su procesamiento amiloidogénico en los endosomas. Esto parece deberse a la existencia de un mecanismo de compensación *feedback* negativo, ya que a concentraciones fisiológicas β A es a su vez capaz de regular la actividad sináptica. También se ha sugerido que los monómeros de β A tengan una función neuroprotectora, de manera que la toxicidad de las fibras presentes en la EA se debería a una pérdida de esta función.

La hipótesis de la cascada amiloide postula que las mutaciones en los genes APP y presenilina 1 y 2 provocan un aumento del ratio β A-42/ β A-40, lo que desencadenaría la agregación y acumulación de β A y toda la cascada patogénica consecutiva. Los oligómeros solubles de β A desencadenarían un importante efecto tóxico sobre las sinapsis, causando el deterioro cognitivo y la aparente ausencia de correlación entre la cantidad de placas amiloides y el grado de deterioro. Una visión general de la hipótesis amiloide asume que las placas seniles representarían un reservorio de oligómeros β A y de otras biomoléculas solubles potencialmente neurotóxicas, entre las que destacan los radicales libres y las citoquinas proinflamatorias. La toxicidad inducida por β A producirá una disfunción sináptica debido a los efectos de estos péptidos sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato, sobre la recaptación de glutamato a nivel postsináptico y sobre receptores colinérgicos, provocando una pérdida de espinas dendríticas y con ello, la pérdida de la memoria característica de esta demencia.⁸ Además estos péptidos provocan una enorme elevación en las concentraciones de calcio citoplasmático en las neuronas intoxicadas, lo que provocaría la sobreactivación de la calcineurina, la desfosforilación del factor de transcripción NFAT, que se translocaría al núcleo y activaría genes diana responsables de la distrofia de las neuritas que rodean las placas y de la pérdida de sus espinas dendríticas.

2.2.3. La proteína Tau (τ).

La proteína Tau (τ) es el componente principal de los ovillos neurofibrilares, y se encuentra asociada a microtúbulos, expresándose en las neuronas del SNC. En la EA, Tau se encuentra anormalmente hiperfosforilada, lo que conduce a una pérdida de su afinidad por los microtúbulos y a su agregación patológica en el compartimento somatodendrítico de la

neurona, dando lugar al ovillo neurofibrilar. La acumulación de Tau en el compartimento somatodendrítico provocaría una pérdida de su función normal en el axón y alteraría el transporte axonal de proteínas y orgánulos, pudiendo terminar en la muerte neuronal.

El precursor amiloideo coexiste en el centro de la placa con la α -1-antiquimotripsina de origen astrocítico y vascular. En la placa aparecen procesos neuronales distendidos y distróficos - conocidos como "neuritas"- que son la característica más prominente de la placa.⁷ Las neuritas contienen los PHF que constituye el cuerpo de los NFT. En los cerebros con EA existe una reducción del 30 al 50% en la concentración total de proteínas Tau con respecto a los cerebros sanos, de forma que las neuritas contienen más cantidad de proteínas neurofilamentosas fosforiladas que los procesos neuronales normales.

Una de las hipótesis más aceptadas acerca del vínculo molecular entre β A y Tau es la de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), en particular su isoforma β , debido a que su hiperactividad en las neuronas de los enfermos de la EA sería la responsable del deterioro cognitivo, la hiperfosforilación de Tau y desorganización de los microtúbulos de los axones, un aumento de la producción de β A por hiperfosforilación de APP y presenilina 1, la muerte neuronal inducida por apoptosis y la inflamación glial por la acumulación de los ovillos.⁹

La ubiquitina, que sirve como señal para la degradación de proteínas en sistemas proteásicos no lisosomales, también está presente en las neuritas, quizá para potenciar intentos abortivos de las neuronas con el fin de degradar un exceso de proteínas anómalas. A pesar de lo interesante que pueda parecer esta hipótesis, el rol de la ubiquitina en los NFT todavía se desconoce. Aun así, se sabe que la dificultad de degradación de las proteínas anormales en la degeneración neurofibrilar explica la incorporación excesiva de ubiquitina y la anormal inmunorreactividad para este péptido, cuya acumulación es un hecho secundario en la EA.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en analizar el papel de la autofagia en la enfermedad de Alzheimer, desarrollando la conexión entre la disfunción del sistema endosomal-lisosomal y mitofágico con la patología molecular de la enfermedad. También se plantea la utilidad de la vía autofágica como una diana terapéutica potencial en las

enfermedades neurodegenerativas, debido a sus funciones de reciclaje y mantenimiento del citoplasma celular.

3. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se llevó a cabo una amplia revisión bibliográfica de distintos artículos científicos sobre Autofagia y Alzheimer. Se empleó para ello la base de datos bibliográfica Medline (PubMed) y el buscador Google Académico, restringiendo las búsquedas a los años 2010-2018 y excluyendo aquellos artículos que no estuvieran escritos en inglés o español. Por otra parte, se consultaron algunos libros especializados en la enfermedad de Alzheimer con el fin de ampliar los conocimientos básicos sobre el tema.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Lisosomas neuronales y mTORC1.

Las distintas funciones neuronales que dependen de los lisosomas requieren una distribución precisa de los mismos en sitios específicos dentro de las neuronas y una posible necesidad de su redistribución en respuesta a los cambios en la fisiología y demanda neuronal. Los lisosomas se caracterizan por tener una distribución polarizada en las neuronas, en donde son más abundantes en los cuerpos celulares neuronales, se encuentran moderadamente presentes en las dendritas y son relativamente raros en los axones.¹⁰ Este patrón de distribución de los lisosomas en las neuronas plantea algunas preguntas, especialmente sobre los mecanismos subyacentes que controlan su movimiento, aunque comienzan a sugerirse funciones compartimentales específicas de estos lisosomas.

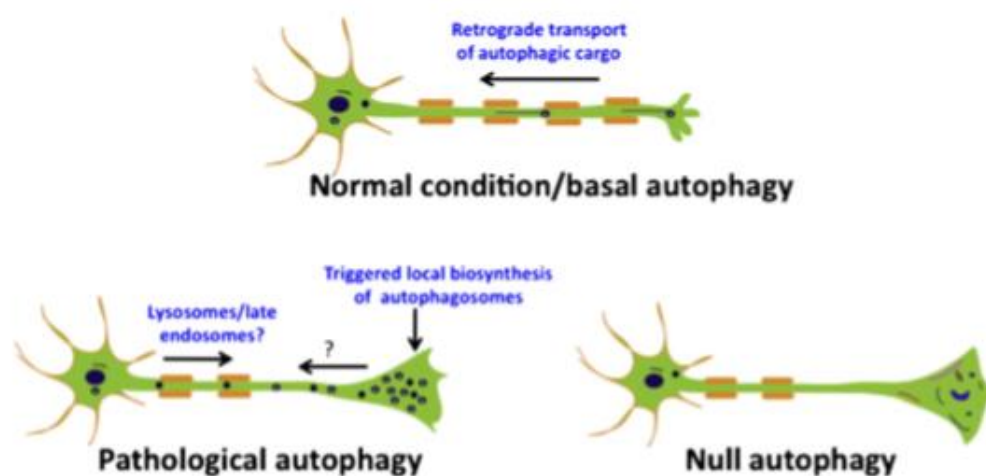


Figura 5: Modelo propuesto de autofagia neuronal en los axones. Yue Z et al., 2009.

Sin embargo, llama la atención la alta tasa de autofagia en los axones, así como la capacidad de los autofagosomas de formarse alrededor de las mitocondrias axonales dañadas de manera aguda, lo que parece un paso importante en la prevención de la acumulación de material celular potencialmente dañino en los axones. Los autofagosomas axonales en ocasiones se fusionan con los lisosomas para degradar su contenido, lo que parece ocurrir a través de un proceso de maduración en el que se forman anfisomas que viajan al cuerpo neuronal, adquiriendo LAMP-1 y acidificándose en el proceso.

La importancia fisiológica de la maduración lisosomal y de su transporte retrógrado a la zona somatodendrítica parece residir en que ayuda al reciclaje de nutrientes clave, como aminoácidos, cerca del sitio principal de traducción de proteínas en el cuerpo neuronal.¹¹

El mecanismo de mTORC1 hace que su señalización dependa de la disponibilidad local de lisosomas y plantea preguntas sobre la regulación de esta vía en neuronas maduras, donde el crecimiento principal no es una prioridad, pero donde la señalización de mTORC1 controla múltiples aspectos de la fisiología neuronal. El contraste entre la distribución restringida de los lisosomas en las neuronas, como se ha comentado anteriormente, y los muchos sitios de señalización de mTORC1 sugiere que los distintos conjuntos de lisosomas se dirigen dinámicamente a sitios de acción de mTORC1 en la neurona o que otros mecanismos alternativos podrían apoyar la activación localizada de mTORC1 en las neuronas.

Teniendo en cuenta la conexión entre mTORC1 y la autofagia, se corrobora que las neuronas sanas normalmente mantienen bajos niveles de autofagosomas incluso ante la disponibilidad de nutrientes. La hipótesis habitual sugiere que las neuronas están privadas de una inducción de la autofagia a gran escala en respuesta a la falta de nutrientes debido a su limitada capacidad de utilizar múltiples fuentes de energía para mantener sus funciones con normalidad.¹² Se ha demostrado que la insulina es un factor clave en este sentido, de forma que la ausencia de insulina induce la autofagia en las neuronas primarias de forma mTOR-dependiente. Esto sugiere que la señalización activa de la insulina es responsable del bajo nivel de formación de autofagosomas en neuronas sanas, por lo que la vía de la insulina es un mecanismo fundamental para el control de la autofagia basal en neuronas.

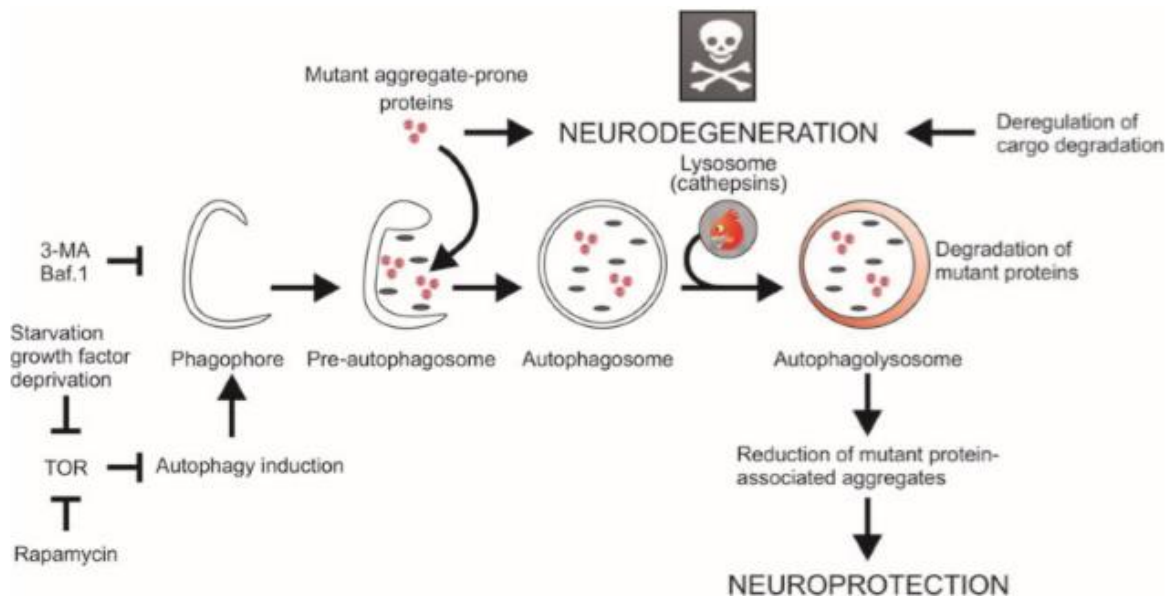


Figura 6: Elementos regulatorios de la autofagia en la patología neurodegenerativa. Rami A, 2009.

5.1.1. Disfunción lisosomal en la enfermedad de Alzheimer.

Los agregados de fibrillas amiloides, característicos de la EA, se encuentran rodeados de neuritas hinchadas que están llenas de lo que se ha comprobado que son lisosomas. La anormal distribución de los lisosomas axónicos en la EA plantea cómo se regula la abundancia de lisosomas axonales.

Un papel importante en este sentido le corresponde a JIP3 (también conocida como MAPK8IP3, cuya pérdida en múltiples organismos trae consigo la acumulación axonal ectópica de lisosomas, un mayor procesamiento de la APP y un aumento de los niveles de β -amiloides, empeorando la patología).¹¹ JIP3 puede tener una función que es similar a la proteína adaptadora RILP que soporta el transporte de lisosomas mediado por dineína al actuar como un puente entre Rab7 en la superficie de los endolisosomas y el motor de dineína.

La red endo-lisosómica está involucrada tanto en la generación proteolítica de fragmentos terminales de APP como en la de péptido β A a partir de APP y su hidrólisis completa. La APP, como una proteína unida a la membrana, está sujeta al transporte vesicular, procesamiento y degradación dentro de esta red. Sin embargo, si la APP no se escinde en la red endo-lisosómica, puede ser enviada al aparato de Golgi o reciclarse de nuevo a la membrana plasmática, donde puede ser procesada por la α -secretasa a través de la vía no amiloidogénica.

Se sugiere que la generación del péptido β A ocurre en los endosomas, y en apoyo de esta hipótesis, la β -secretasa tiene una actividad óptima a pH ligeramente ácido, localizándose conjuntamente con la APP en compartimentos endosómicos, pero no lisosómicos.¹² Como la β -secretasa normalmente se degrada en orgánulos que se han fusionado con el lisosoma, esta acumulación puede ser una consecuencia de la falta de proteasas lisosómicas presentes en este grupo de vesículas que se acumulan anormalmente. La acumulación de β -secretasa, como consecuencia de la falta de proteasas lisosómicas en este grupo de vesículas, también puede impulsar aún más la progresión de la enfermedad, promoviendo la producción de β A.⁹ Dos complejos de γ -secretasa que contienen presenilina 1 y presenilina 2 como subunidades alternativas tienen diferentes distribuciones intracelulares: la presenilina 2 se encuentra predominantemente en endosomas y lisosomas tardíos, mientras que la presenilina 1 se distribuye de forma más amplia. Curiosamente, se descubrió que la presenilina 2 es responsable de la formación de más β A intracelular, lo que se considera que dirige la patogénesis de la EA.

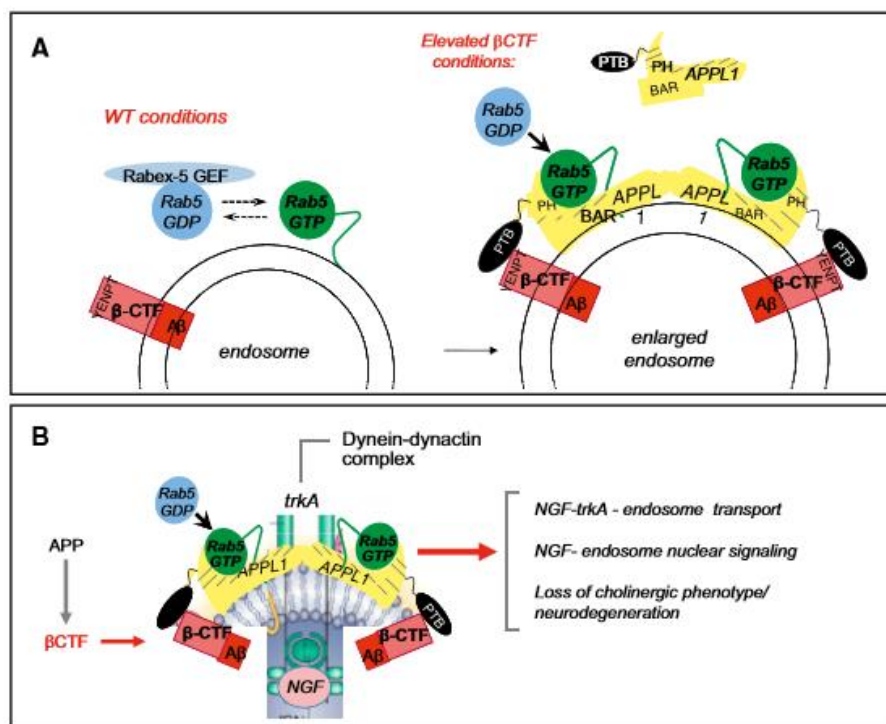


Figura 7: Los fragmentos terminales de APP y el péptido β A median la patología en los endosomas. Nixon RA, 2017.

Además de la patología endosomal sustancial, se han observado aumentos en el número y tamaño de otras vesículas de la ruta de degradación en el cerebro con EA. Algunas de las primeras placas amiloides observadas son proximales a los axones distróficos, y los autores

han postulado que el transporte axonal está parcialmente bloqueado; la acumulación de vesículas autofágicas en los axones parece resultar de un fracaso del transporte axonal retrógrado, que de alguna manera está relacionado funcionalmente con un déficit en la función lisosómica, colocando la actividad lisosómica en el centro de un aspecto patológico prominente en la EA.¹³ La mayoría de las vesículas que se acumulan alrededor de las placas amiloides residen dentro de axones neuronales hinchados que entran en contacto con las placas amiloides. Las vesículas en estos axones inflamados se diferencian de los lisosomas de los cuerpos neuronales en que sólo contienen niveles bajos de las proteasas lisosómicas catepsina B, D y L.

Curiosamente, los orgánulos que ocupan las distrofias axonales que rodean las placas sí contienen progranulina, una proteína cuyo gen está fuertemente relacionado genéticamente con los trastornos de almacenamiento lisosomal y la neurodegeneración de inicio tardío y además la enzima de escisión de la APP del sitio b1, la enzima responsable de iniciar la escisión β de la APP, está enriquecida en las vesículas que se acumulan en las placas amiloides, lo que apoya fuertemente la relevancia de la patología lisosomal en la EA.

5.2. El papel de la autofagia en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

La vía autofágica-lisosomal (ALP) es una vía clave para el aclaramiento de β A. El aparato de Golgi, los endosomas, los lisosomas y el autofagosoma participan en la liberación de β A mediada por autofagia al espacio extracelular. Normalmente no hay acumulación de proteínas β A en el SNC humano porque la velocidad de eliminación es mayor que la velocidad de producción, por lo que la autofagia tiene un papel importante en la regulación de la generación o degradación de β A. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas y las vacuolas que contienen β A o con proteínas que se degradan dentro de los lisosomas por hidrólisis durante la autofagia. En el proceso patológico de la EA, las actividades autofágicas discordantes inducen un defecto de maduración de los extremos del autofagosoma con acumulaciones masivas de autofagosomas en las neuronas.

LC3B se colocaliza con la APP durante la patogénesis de la EA y la deficiencia de Atg5 o Atg7 en las células neuronales conduce a la neurodegeneración, junto con la acumulación de autofagosomas en las neuronas. Debido a la eliminación del aclaramiento de los autofagosomas y la acumulación de proteínas β A, éstos se convierten en los principales péptidos tóxicos intracelulares en las neuronas. La inhibición de la autofagia mediante la modulación de mTORC1 reduce la actividad de las enzimas de ubiquitinación USP10/13 y promueve la degradación del complejo de la PI3K (VPS34) y, por lo tanto, disminuye la

secreción de β A. La delección de la cistatina B, un inhibidor de la catepsina, restaura las funciones de la vía autofágica-lisosomal, lo que parece reducir el nivel tóxico de β A40 o β A42 y de ese modo mejora la carga de placa de β A y con ello, los déficits de la memoria de aprendizaje.¹⁴

Aunque es posible que el aumento de la actividad lisosomal actúe como una forma de eliminación de materiales neurotóxicos, la pérdida de integridad lisosómica puede provocar la muerte celular en el cerebro neurodegenerativo.¹³ Por lo tanto, debido a que la autofagia es un mecanismo catabólico, que opera en condiciones de estrés para reciclar o eliminar materiales citoplasmáticos, las proteínas mal plegadas pueden eliminarse por autofagia como medida de protección; así mismo, la función de la autofagia puede producir muerte celular en neuronas que acumulan agregados de una manera que resulta en una condición patológica.

Varias vías de señalización y factores moduladores de la autofagia tienen un impacto relevante en la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos:

- Beclina-1 (BECN1): también conocida como Atg6, participa en el reclutamiento de la membrana para formar autofagosomas a través de la activación de la actividad de promoción de la autofagia de la proteína Vps34.

En contraste con la función protectora de la autofagia, la muerte de células neuronales puede implicar a procesos de autofagia. La interacción de la beclina 1 y de Bcl-2 sugiere la coordinación entre los tipos de muerte celular apoptóticos y autofágicos. Debido a que la autofagia se observa con frecuencia cuando se suprime la apoptosis, la muerte celular autofágica puede ser un proceso de respaldo para la apoptosis.¹⁵

- Presenilina 1 (PS1): como se ha mencionado, PS1 es un componente catalíticamente activo del complejo γ -secretasa y esa γ -secretasa es una aspartil proteasa que segmenta la membrana.

En el modelo PS1/APP, la inducción de la autofagia es evidente en las neuronas antes de que se vuelvan vulnerables a la deposición extracelular de β A. PS1 es esencial para la acidificación de los lisosomas y la activación de la catepsina durante la autofagia, de forma que las mutaciones de PS1 alteran la eliminación de proteínas anormalmente modificadas en las neuronas, lo que acelera la muerte celular.

- Tau (τ): la creciente evidencia sugiere que la acumulación patológica de Tau es más relevante para el desarrollo de la neurodegeneración y el deterioro cognitivo en pacientes con EA. La vía autofágica está relacionada con la fosforilación de Tau en condiciones fisiológicas y patológicas en las neuronas y la autofagia juega un papel

crucial en la degradación de las proteínas Tau solubles endógenas, lo que es beneficioso para evitar la acumulación de agregados proteicos.

Por tanto, la activación de la autofagia suprime la agregación Tau y elimina su citotoxicidad. En oposición a esto, la hiperfosforilación de Tau conduce a la disfunción de la autofagia. El transporte de autofagosomas depende principalmente de su movimiento a lo largo de los microtúbulos durante la autofagia. La hiperfosforilación de Tau produce la desestabilización de los microtúbulos neuronales y, por lo tanto, afecta a la ubicación y la función de los lisosomas y las mitocondrias.

- **Chaperonas:** las chaperonas moleculares son mecanismos especializados que ayudan al plegamiento de proteínas y previenen la agregación de proteínas tóxicas. Durante la autofagia mediada por chaperonas, estas proteínas se unen a β A y Tau y promueven su degradación.

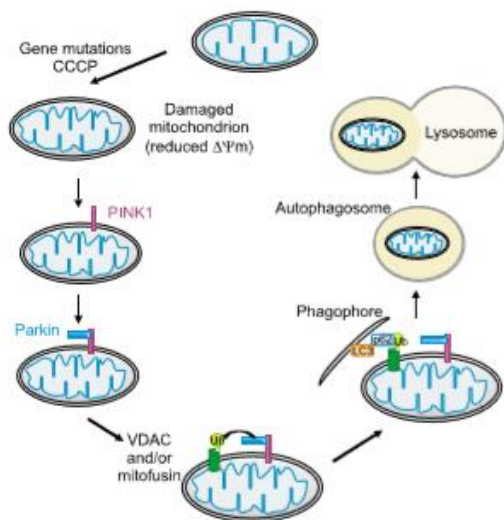
Tanto Hsp90 como Hsp70 participan en el metabolismo de APP: Hsp90 promueve el ensamblaje y la estabilidad de la subunidad proteasomal 26S y regula el plegamiento incorrecto y la estabilización de proteínas neurotóxicas, facilitando la patología Tau. La inhibición de Hsp90 suprime las quinasas implicadas en la hiperfosforilación persistente e induce la unión de Hsp70 con proteínas anormales para formar un complejo ubiquitinado por CHIP y degradado a través de la proteólisis; de hecho, la Tau fosforilada se degrada selectivamente a través del complejo Hsp90-CHIP.¹⁴

Además de esto, las chaperonas facilitan la entrada de proteínas en los lisosomas para su degradación mediante la vía de autofagia mediada por chaperonas (CMA). La función de degradación de proteínas intracelulares y la actividad CMA junto con el nivel de LAMP-2A disminuyen con el envejecimiento en muchos tejidos y órganos, pero dichos cambios se observan de manera prominente en el SNC.

5.2.1. Disfunción mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer.

La disfunción mitocondrial está implicada en una amplia gama de enfermedades y se ha propuesto como un factor causal en una serie de enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA, en la que se considera un evento temprano.⁵ Se ha asociado un aumento excesivo en la apoptosis en esta enfermedad, de forma que se ha demostrado que la ruta intrínseca mediada por mitocondrias está implicada recientemente en la muerte neuronal prematura observada en trastornos neurológicos, con vías apoptóticas mediadas por caspasas.

El aumento de la fragmentación del DNA en los cerebros afectados por la EA, sugiere que la neurodegeneración podría ser el resultado de la apoptosis, ya que el péptido β A intracelular activa la liberación del citocromo c, lo que resulta en apoptosis neuronal.¹⁶



La disfunción en el metabolismo de la glucosa y en la bioenergética, así como en las mitocondrias, son antecedentes consistentes del fenotipo patológico de la EA, incluidas las placas de β A y los ovillos neurofibrilares. Las mitocondrias disfuncionales producen altos niveles de ROS que pueden afectar negativamente a los componentes mitocondriales específicos, incluido el DNA mitocondrial, los lípidos de la membrana y los componentes de la fosforilación oxidativa.

Figura 8: Mitofagia mediada por PINK1/Parkina. Son JH et al., 2012.

Se ha demostrado que el β A se localiza y se acumula en la mitocondria, lo que aumenta la toxicidad mitocondrial y la muerte neuronal característica de la EA. Esta acumulación de β A en cerebros con EA afecta la respiración mitocondrial con una desregulación del complejo I correlacionada con la toxicidad Tau, y una desregulación del complejo IV asociado con una mayor carga de β A.

También parece haber una conexión fisiológica entre la patología Tau y la disfunción mitocondrial en la EA: se ha demostrado que Tau fosforilada bloquea el transporte mitocondrial, lo que resulta en la privación de energía y el estrés oxidativo en la sinapsis y, por tanto, en la neurodegeneración. Estudios recientes también implican en la patogenia al canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1), el controlador de acceso mitocondrial, al demostrarse que las interacciones entre VDAC1, β A y la Tau fosforilada conducen a la disfunción mitocondrial.

6. CONCLUSIONES

Numerosos estudios experimentales han demostrado la conexión entre las enfermedades neurodegenerativas y las vías autofágicas, tanto selectivas como no selectivas, como se ha desarrollado anteriormente.

Debido a su función fisiológica, las mutaciones, disfunciones o alteraciones en la regulación de las distintas fases del proceso autofágico y de las proteínas que lo conforman, derivan en un trastorno en la función neuronal y especialmente en una acumulación patológica de βA en la EA.

Dado que la deficiencia del sistema endosomal-lisosomal pone de manifiesto toda la patología molecular neurodegenerativa, el aumento de la actividad lisosómica parece tener una relevancia terapéutica crucial en la mejora del aclaramiento, especialmente en la EA de aparición tardía; esto tendría como resultado un aumento en la degradación lisosomal de la APP, reduciendo la generación de fragmentos terminales de APP y de péptidos βA a partir de las secretasas.

Esto se puede efectuar potenciando la actividad de la catepsina lisosómica mediante la delección genética de la cistatina B, un inhibidor endógeno de las cisteín-proteasas lisosómicas; esto es suficiente para prevenir el agrandamiento lisosómico, reducir la cantidad de péptido βA intra y extracelular y frenar el avance de la sintomatología cognitiva. La potenciación de la actividad de las enzimas lisosomales es otro punto de partida interesante para reducir la carga proteica anómala.¹⁰

Con respecto a la propia ruta autofágica, debido a que como se ha mencionado, la deficiencia de beclina-1 interrumpe la autofagia neuronal, modula el metabolismo de la APP y promueve la neurodegeneración, por lo que un incremento de la misma tendría un potencial papel terapéutico en la EA. Así mismo, en el contexto de la autofagia mediada por chaperonas (CMA), debido a que las chaperonas regulan el plegamiento de proteínas recién sintetizadas y transfieren proteínas disfuncionales a sistemas de degradación, una red de chaperonas puede ser un objetivo molecular para desarrollar diferentes estrategias a nivel de tratamiento de la EA, como ya están enfocándose las últimas investigaciones: por una parte, centrándose en Hsp70 como proteína dependiente de ATP, y por otra, inhibiendo Hsp90, lo que aumenta la degradación de Tau.

Finalmente, la regulación de la ruta por mTORC1 la sitúa como objetivo principal a la hora de buscar candidatos moleculares para controlar la neurodegeneración, ya que mTOR desempeña un papel esencial en las funciones neuronales mediante el control de la homeostasis de proteínas. La inhibición farmacológica de la señalización de mTOR con rapamicina ha demostrado rescatar los déficits cognitivos y mejorar la patología βA y Tau mediante el aumento de la autofagia en modelos animales de EA. Esto sugiere que una inhibición a largo plazo, mediante una hipotética terapia farmacológica orientada en este sentido, puede reducir

el acúmulo de β A y Tau, favoreciendo posteriormente el aprendizaje y la memoria en los pacientes.

En definitiva y, sin duda alguna, las vías autofágicas ofrecen una enorme cantidad de dianas moleculares para orientar posibles nuevos tratamientos. Sólo el avance en estas investigaciones podrá dilucidar si nos vamos acercando al fin de esta devastadora epidemia.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. García Aguilar A. Mecanismos moleculares de regulación de la vía mTORC1/p70S6K, autofagia y mitofagia: papel de TSC2. [Tesis doctoral]. Madrid: Departamento de Bioquímica y Biología molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid; 2016.
2. Kim M, Ho A, Lee JH. Autophagy and human neurodegenerative diseases-a fly's perspective. *Int J Mol Sci* 2017; 18.
3. Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* 2017; 36(13): 1811-1836.
4. Debnath J, Kaur J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature, Molecular cell biology* 2015; 16: 461-472.
5. Martínez-Vicente M. Mitophagy in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2017; 10:64.
6. Korolchuk VI, Otten EG, Rabanal-Ruiz Y. mTORC1 as the main gateway to autophagy 2017; 61: 565-584.
7. Alberca R, López-Pousa S. Enfermedad de Alzheimer y otras Demencias. 4ª edición, Ed. Panamericana, 2011; 151-169 , 273-278
8. Ahmed RM, Halliday G, Hodges JR, et al. Physiological changes in neurodegeneration – mechanistic insights and clinical utility. *Nature, Neurology* 2018.
9. Nixon, RA. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *The FASEB Journal* 2017; 31(7): 2729-2743.
10. Bahr BA, Chen X, Gan L, Telpoukhovskaia MA, Wang C. Endo-lysosomal dysfunction: a converging mechanism in neurodegenerative diseases. *Current opinion in Neurobiology*, 2018; 48: 52-58.
11. Frake RA, Menzies FM, Ricketts T, Rubinsztein DC. Autophagy and neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation: Autophagy*, 2015; 125(1): 65-74
12. Hemsley, KM, Hopwood JJ, Lau AA, Sargeant TJ, Whyte LS. Endo-lysosomal and autophagic dysfunction: a driving factor in Alzheimer's disease? *Journal of Neurochemistry*, 2017; 140: 703-717.
13. Nixon RA, Yang DS. Autophagy and Neuronal Cell Death in Neurological Disorders. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.*, 2012; 4(10).
14. Chen X, Liu Y, Ponnusamy M, Zhang Y, Zhao Y. The role of ubiquitin proteasomal system and autophagy-lysosome pathway in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2017; 28(8): 861-868.
15. Rami A. Autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiarist? *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2009; 35: 449-461.
16. Gupta R, Nahon-Crystal E, Shoshan-Barmatz V, Shteiinfer-Kuzmine A. VDAC1, Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, 2018; 131: 87-101.