



Universidad  
Zaragoza

 CIENCIAS  
ZARAGOZA

**UAB**  
Universitat Autònoma de Barcelona

 INc  
Institut de  
Neurociències

## Trabajo Fin de Grado

# La Autofagia celular y su implicación en la enfermedad de Alzheimer

*Autophagy and its role in Alzheimer's disease*

Autor:

**Cristina Palacios Mateo**

Directores:

Víctor J. Juste Mateos – Universidad Autónoma de Barcelona

Isabel Marzo Rubio – Universidad de Zaragoza

Lugar de realización:

Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona

Grado en BIOTECNOLOGÍA – Noviembre 2016



## Índice

1.	RESUMEN .....	3
2.	INTRODUCCIÓN .....	4
3.	MECANISMO DEL PROCESO DE MACROAUTOFAGIA .....	6
3.1.	INICIACIÓN: FORMACIÓN DEL FAGÓFORO .....	6
3.2.	ELONGACIÓN: DE FAGÓFORO A AUTOFAGOSOMA .....	8
3.3.	FUSIÓN CON EL LISOSOMA Y DEGRADACIÓN DE LA CARGA.....	9
4.	FALLOS EN LA AUTOFAGIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	9
5.	SOBRE LA ACUMULACIÓN PROTEICA.....	11
5.1.	ACUMULACIÓN DE BETA-AMILOIDE Y FORMACIÓN DE PLACAS SENILES.....	11
5.2.	ACUMULACIÓN DE TAU Y FORMACIÓN DE OVILLOS NEUROFIBRILARES .....	12
6.	CONSECUENCIAS DE LA AGREGACIÓN PROTEICA.....	14
6.1.	FALLO ENERGÉTICO, ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO MITOCONDRIAL.....	14
6.2.	DEFICITS EN EL TRANSPORTE AXONICO .....	14
6.3.	FALLO SINÁPTICO .....	15
7.	ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL ALZHEIMER .....	16
7.1.	ESTRATEGIAS ENFOCADAS A LA MEJORA DE LA AUTOFAGIA .....	16
7.2.	OTRAS ESTRATEGIAS .....	18
8.	CONCLUSIÓN .....	20
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	21

## Abreviaturas

- **A $\beta$** :  $\beta$ -Amiloide
- Ach: Acetilcolina
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- Akt: mirar abreviatura para PKB
- AMBRA-1: Regulador 1 de autofagia y Beclin-1
- AMP: Adenosín monofosfato
- AMPAr: Recepto de del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propinoico
- AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
- ATG: Proteína relacionada con la autofagia
- ATP: Adenosín trifosfato
- **BACE-1**:  $\beta$ -secretasa 1
- Bcl-2: Proteína de linfoma de célula B 2
- BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
- **CaMKII**: Calcio calmodulina quinasa II
- Cdk5: Quinasa dependiente de Ciclina 5
- **FAK**: Quinasas de adhesión local
- FIP200: Proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las FAK
- **GSK-3 $\beta$** : Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$
- GWAS: Estudio de asociación del genoma completo
- **kDa**: kilo Dalton
- **LC3**: Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulo
- **MAPK** (o p25): Proteína quinasa activada por mitógeno
- MARK: Quinasa reguladora de afinidad a microtúbulos
- MCI: Deterioro cognitivo leve
- MiT: Familia de proteínas transportadoras de iones metálicos
- mTOR: Diana de Rapamicina en células de mamífero
- **nAchr**: Receptor nicotínico o Receptor ionotrópico de acetilcolina
- NADH y NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NGF: Factor de crecimiento nervioso
- NMDAr: Receptor de N-metil-D-aspartato o Receptor ionotrópico de glutamato
- **p25**: mirar abreviatura para MAPK
- p75NTr (o LNGFR): Receptor de baja afinidad a NGF
- PI3K: Fosfoinositos 3 quinasa
- PICALM: Proteína de ensamblaje fosfatidilinositol-clatrina
- PKA: Proteína quinasa A
- PKB (o Akt): Proteína quinasa B
- PSEN-1: Presenilina 1
- PRAS40: Sustrato rico en prolina de Akt/PKB de 40 kDa
- **RNS**: especies reactivas de Nitrógeno
- ROS: especies reactivas de Oxígeno
- **SMER28**: Molécula pequeña potenciadora de rapamicina 28
- SNARE: Receptores de proteína de fijación soluble a N-etilmaleimida sensible a fusión

- **TFEB:** Factor de transcripción EB
- **trkB:** Receptor de la quinasa para el receptor de tropomiosina B
- **ULK1:** Quinasa activadora de autofagia unc-51 tipo 1
- **UVRAG:** Proteína asociada a la resistencia de radiación ultravioleta
- **VAMP 3, 7 y 8:** Proteína de membrana asociada a vesícula 3, 7 y 8
- **VGCC:** Canal de calcio dependiente de voltaje

## 1. RESUMEN

Actualmente, alrededor de 46 millones de personas en todo el mundo padecen la enfermedad de Alzheimer, siendo la forma más común de demencia. A nivel celular se caracteriza por presentar depósitos neuronales de las proteínas  $\beta$ -amiloide y tau en su forma hiperfosforilada. Estas agregaciones acaban formando lo que conocemos como placas seniles y ovillos neurofibrilares. Como consecuencia las neuronas y sinapsis se ven dañadas, dándose la neurodegeneración. Los tratamientos actuales, aunque palian los síntomas, no curan la enfermedad. Por esto, es importante dirigir las estrategias terapéuticas hacia la causa de esas acumulaciones proteicas. Si bien la causa primordial de la enfermedad es aún desconocida, sabemos que una autofagia disfuncional permite estas deposiciones. En este trabajo describimos tanto las características de la enfermedad como el mecanismo de la autofagia, identificando los pasos que parecen estar fallando en el Alzheimer.

## ABSTRACT

Today, over 46 million people worldwide live with Alzheimer's disease, the most common cause of dementia. At the cellular level, accumulations of  $\beta$ -amiloid and hyperphosphorylated tau proteins are found in neurons. These aggregations end up forming senile plaques and neurofibrillary tangles, causing neuronal and synapsal damage, and thereby, neurodegeneration. Current treatments ameliorate the symptoms but do no cure the disease. That's why the therapeutic strategies need to focus on the cause of the protein accumulation. Although the primary cause of Alzheimer's disease is still unknown, a relationship between dysfunctional autophagy and protein accumulation has been established. Here, we describe the autophagy mechanism, identifying the steps that may be failing in Alzheimer's, as well as the characteristics of the disease.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (AD, en inglés Alzheimer Disease) es la forma más común de demencia. Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que causa deterioro de la memoria y otras disfunciones cognitivas, como el habla o el razonamiento, y que impiden al paciente llevar a cabo actividades básicas de relación con su entorno.

Se trata de una enfermedad multifactorial, de causa aún desconocida, donde el mayor factor de riesgo es la edad. El 95% de los casos sufren la forma esporádica de la enfermedad, que se manifiesta en personas de 65 años o más. El restante 5% corresponde a la forma familiar (hereditaria) que puede aparecer antes de los 65 años<sup>1</sup>. De hecho, la primera vez que se describió esta demencia, en 1906, fue en una paciente de 51 años de edad, Auguste D. El médico que le diagnosticó fue Alois Alzheimer, psiquiatra y neurólogo alemán<sup>2-3</sup>.

Desde entonces, el número de personas con AD no ha hecho más que aumentar<sup>4</sup>. Los avances higiénicos y sociales relacionados con los grandes logros de la medicina moderna, la lucha contra las grandes epidemias y la mejora de los recursos alimenticios han contribuido al aumento de la esperanza de vida. Todo esto junto con la disminución de la tasa de fertilidad en la mayoría de los países<sup>5</sup>, está provocando que el porcentaje de personas que viven hasta edades avanzadas sea cada vez mayor: si en 1920 la cifra de personas mayores de 60 años se aproximaba al 5%, en la actualidad ronda el 25%<sup>4</sup>.

Este envejecimiento de la población provoca un incremento en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas. Actualmente 46 millones de personas sufren la enfermedad de Alzheimer, y se espera que esta cifra se duplique cada 20 años, llegando a los 74.5 millones en 2030 y a los 131.5 en 2050<sup>4</sup>. Esto supone un gran impacto en la sociedad, no solo por lo que causa en el individuo, sino por el gasto económico que implica.

A nivel celular la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una acumulación de proteínas de morfología anormal, tanto en el interior de la neurona como en el espacio extracelular. Esto provoca daño oxidativo e inflamatorio en el sistema nervioso. Como consecuencia, la neurona sufre un fallo energético (con fallo en las mitocondrias), disfunción sináptica y finalmente la muerte celular.<sup>1</sup>

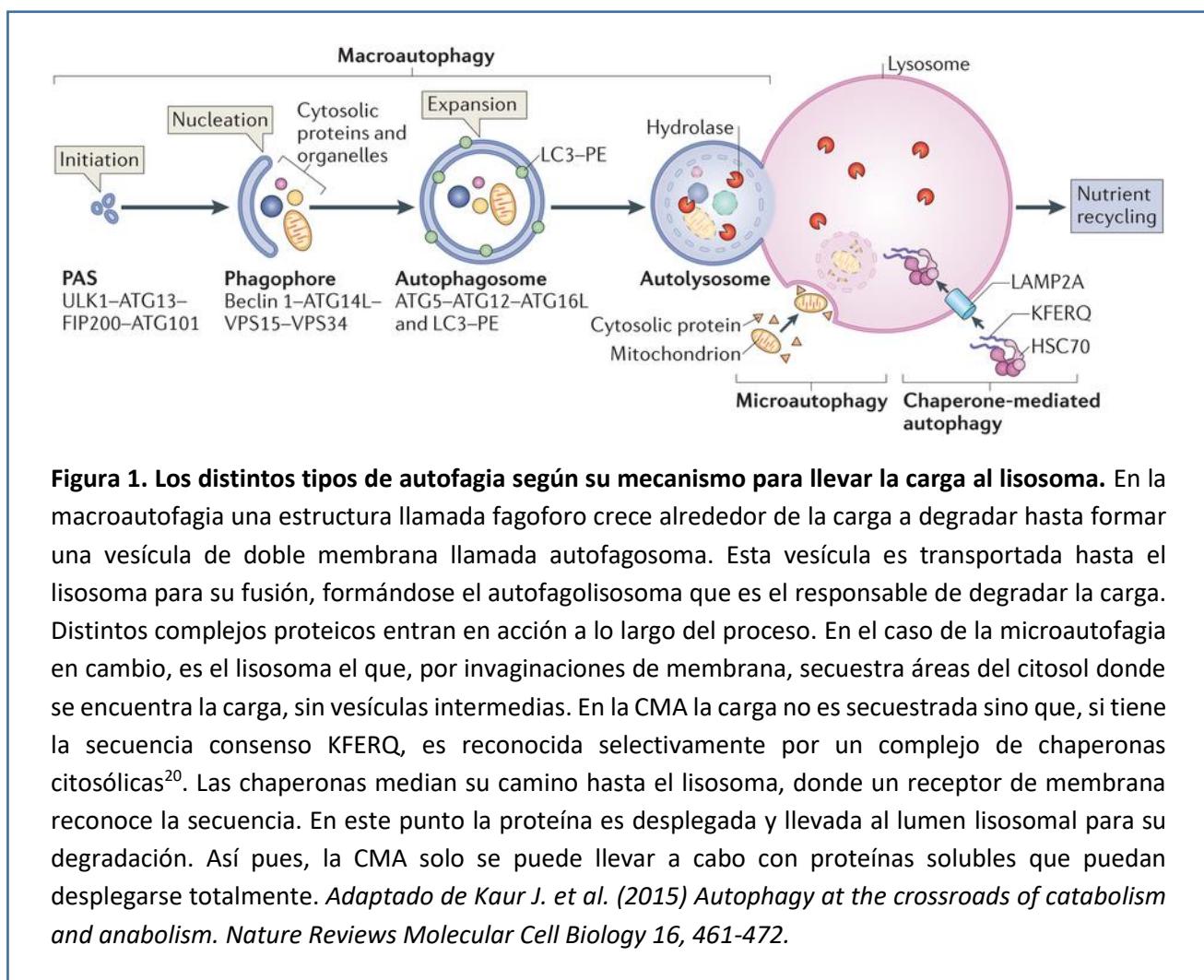
Las neuronas son especialmente susceptibles a la acumulación de compuestos citosólicos dañados o agregados debido a su extrema polarización y tamaño, ya que el citoplasma se puede extender por largas distancias a través de las proyecciones del cuerpo celular. Además, el contenido total de proteínas alteradas u orgánulos dañados no se puede reducir por redistribución a las células hijas durante la división celular. Por esto, para mantener la homeostasis y sobrevivir, las neuronas dependen de mecanismos de “limpieza” citosólica como la autofagia<sup>6</sup>.

La autofagia celular es el mecanismo por el cual diferentes compuestos citosólicos son degradados en los lisosomas. Este proceso tiene diferentes funciones. Existe un nivel basal de autofagia que actúa como mecanismo de control de calidad en la célula eliminando aquello que esté defectuoso, como orgánulos dañados o proteínas mal plegadas. Así, participa en procesos naturales como el metabolismo energético, reciclado de orgánulos, regulación del crecimiento, inicio del desarrollo embrionario o envejecimiento. Pero además, la autofagia se activa cuando hay algún tipo de estrés celular, infección por patógenos o malformaciones celulares internas.<sup>7</sup>

Aunque sabemos del proceso de la autofagia desde los años 60<sup>8</sup>, su mecanismo de actuación y relevancia fisiológica no se ha llegado a entender hasta las dos últimas décadas. En 1993 el científico japonés Yoshinori Oshumi publicó su descubrimiento de 15 genes de importancia clave para la autofagia en levadura, los cuales se nombraban como ATG (Autophagy-related Genes)<sup>9</sup>. En sus investigaciones posteriores averiguó la función de las proteínas codificadas por estos genes<sup>10-17</sup>. La mayoría de los genes ATG tienen homólogos en los eucariotas superiores, lo que demuestra que la autofagia es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución. El trabajo de Y. Oshumi cambió radicalmente el entendimiento de este proceso celular vital, permitiendo conocer la importancia de la autofagia en la fisiología humana y en distintas enfermedades. Por la relevancia de estos descubrimientos se le ha otorgado el premio Nobel en Fisiología o Medicina 2016.

Hoy en día sabemos que dependiendo del mecanismo por el cual la carga a degradar es llevada al lisosoma podemos distinguir tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Figura 1). Los tres tipos de autofagia suelen coexistir en la misma célula, y en general, tanto la macroautofagia como la CMA se vuelven menos eficientes en las neuronas con la edad, contribuyendo directamente a una disminución del rendimiento del tejido<sup>18</sup>.

A continuación vamos a explicar el mecanismo por el que sucede la macroautofagia en mamíferos, así como su regulación, ya que se ha visto que diferentes fallos a lo largo de este proceso están relacionados con la enfermedad de Alzheimer<sup>19</sup>.



**Figura 1. Los distintos tipos de autofagia según su mecanismo para llevar la carga al lisosoma.** En la macroautofagia una estructura llamada fagoforo crece alrededor de la carga a degradar hasta formar una vesícula de doble membrana llamada autófagosoma. Esta vesícula es transportada hasta el lisosoma para su fusión, formándose el autófagolisosoma que es el responsable de degradar la carga. Distintos complejos proteicos entran en acción a lo largo del proceso. En el caso de la microautofagia en cambio, es el lisosoma el que, por invaginaciones de membrana, secuestra áreas del citosol donde se encuentra la carga, sin vesículas intermedias. En la CMA la carga no es secuestrada sino que, si tiene la secuencia consenso KFERQ, es reconocida selectivamente por un complejo de chaperonas citosólicas<sup>20</sup>. Las chaperonas median su camino hasta el lisosoma, donde un receptor de membrana reconoce la secuencia. En este punto la proteína es desplegada y llevada al lumen lisosomal para su degradación. Así pues, la CMA solo se puede llevar a cabo con proteínas solubles que puedan desplegarse totalmente. *Adaptado de Kaur J. et al. (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. Nature Reviews Molecular Cell Biology 16, 461-472.*

### 3. MECANISMO DEL PROCESO DE MACROAUTOFAGIA<sup>6, 7, 19</sup>

La macroautofagia empieza con la formación de la membrana de aislamiento o fagóforo. Se trata de una cisterna membranosa que se cree que procede de la fusión de diferentes partes de membranas procedentes del retículo endoplasmático (RE) y otros compartimentos como mitocondrias o aparato de Golgi. Seguidamente el fagóforo experimenta una elongación curvándose alrededor de los compuestos citosólicos que se van a degradar. Al cerrarse, juntándose sus extremos, se forma la vesícula que conocemos como autofagosoma, la cual, una vez madura, se fusionará con el lisosoma para proceder a la degradación de la carga. Los productos resultantes son liberados al citoplasma y finalmente el autofagolisosoma es degradado. A lo largo del proceso toman acción diferentes tipos de proteínas ATG, resultando ser el eje de la maquinaria autofágica.

#### 3.1. INICIACIÓN: FORMACIÓN DEL FAGÓFORO<sup>22-25</sup>

En esta primera etapa intervienen principalmente dos complejos proteicos:

- Complejo ULK1-ATG13-ATG101-FIP200
- Complejo PI3K de clase III: VPS34-Beclin1-ATG14L-VPS15

La activación del complejo ULK1 resulta en la fosforilación de Beclin1, y como consecuencia aumenta la actividad de VPS34. VPS34 es una quinasa que usa fosfatidil inositol (PI) como sustrato para generar fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), un lípido esencial de la membrana del autofagosoma.

Todavía no está claro el origen de la membrana ni el lugar donde sucede su nucleación. Se ha propuesto tanto que se sintetiza *de novo* como que se forma a partir de membranas pre-existentes como las del RE, Golgi, endosomas, mitocondrias o la membrana plasmática.

En el caso de la autofagia inducida por inanición se ha visto que el RE sería la fuente principal en la formación del fagóforo, aunque también serían importantes las contribuciones del resto de orgánulos membranosos. Esto se respalda con el hecho de que varias proteínas autofágicas (como ULK1 y ATG14L) se encuentran localizadas en el RE.

Se ha observado que tras la acción del complejo ULK-1, que resulta en la producción de PIP3, se forma en esa parte del RE una estructura denominada omegasoma (por su similitud con la letra griega omega, Ω), a partir de la cual emerge la membrana de aislamiento.

Es importante conocer las vías que regulan este inicio de la autofagia (Figura 2), pues es lo que nos permitirá controlar su inducción cuando ésta no se esté dando correctamente en una patología.

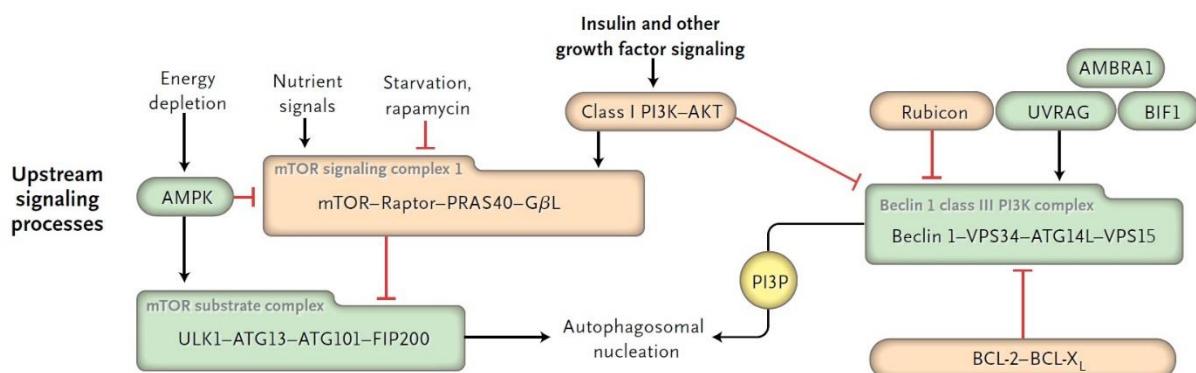
En el caso del complejo de ULK1 podemos decir que se ve regulado principalmente por tres vías distintas:

- **mTOR** es una Ser/Thr quinasa que funciona como un sensor del estado energético de la célula y de la cantidad de nutrientes. Actúa fosforilando a ULK1 (en Ser 757) y ATG13, lo que les mantiene en una conformación de bloqueo que no les permite inducir la autofagia. En esta situación la autofagia solo se dará a un nivel basal. Cuando mTOR se ve inhibido por condiciones de inanición o disminución de factores de crecimiento, el complejo ULK1 adquiere la conformación que le permite activar a Beclin1, lo que lleva a un incremento de la biogénesis de autofagosomes.

- La quinasa **AMPK**, en respuesta al estrés energético, también fosforila a ULK1 pero en Ser317 y Ser77, lo que activa la inducción de la autofagia. Además AMPK activada inhibe indirectamente a mTOR.
- **p53** regula el complejo transcripcionalmente, de manera que cuando p53 está activa (bajo estrés genotóxico) induce la transcripción de los genes de las proteínas ULK1, ULK2 y AMPK (lo que aumenta los niveles de autofagia), y cuando p53 está inactiva inhibe la autofagia al unirse a FIP200, lo que bloquea la formación del complejo ULK-ATG13-ATG101-FIP200.

En el caso del complejo de PI3K, además de la regulación por parte de ULK1, otras proteínas controlan su activación:

- La unión de **Bcl2** a Beclin1 rompe la asociación de Beclin1 con Vps34, lo que inhibe la inducción de la autofagia. Bajo condiciones de inanición Bcl2 es fosforilada, disociándose de Beclin1.
- UVrag cuando se encuentra asociado a **AMBRA1<sup>26</sup>** promueve la autofagia a través de Beclin1; en cambio asociado a **RUBICON** la autofagia se ve reprimida.



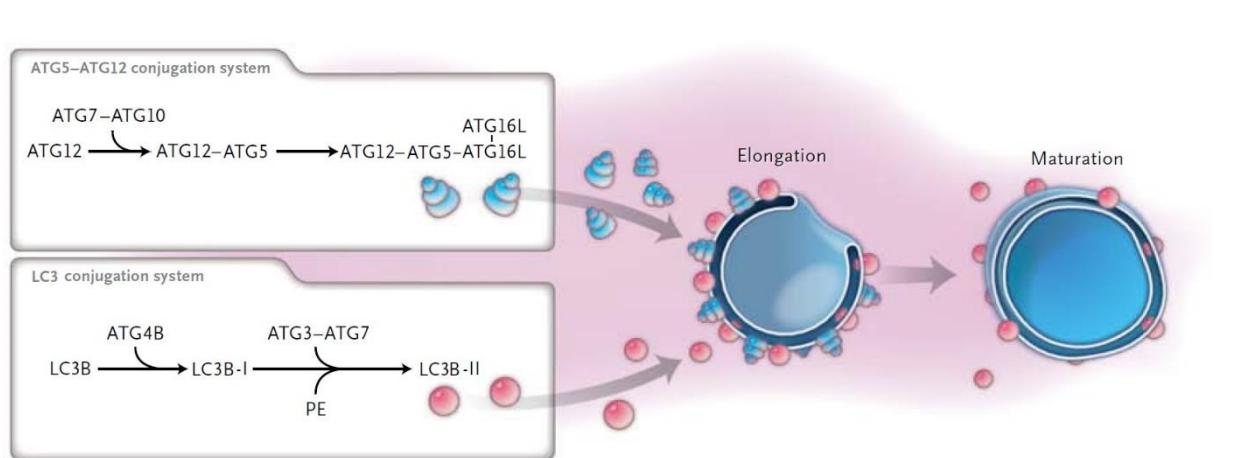
**Figura 2. Esquema simplificado de algunas de las vías que regulan la inducción de la autofagia.**

Durante mucho tiempo se ha tenido a la quinasa mTOR como el principal inhibidor de la autofagia por su acción sobre el complejo de ULK1. Pero mTOR no actúa solo, sino que actúa junto con las proteínas Raptor, G $\beta$ L y PRAS40 formando el complejo mTORc1. La acción de este complejo depende de la situación nutricional de la célula, así como de la presencia de factores de crecimiento. Estos factores, mediante el complejo PI3k de clase I, inducen la activación de mTORc1. En cambio, un estado de inanición lo bloquea, induciendo la autofagia. mTORc1 también puede ser inhibido por fármacos como la Rapamicina, aunque se ha visto que no siempre resulta sensible. Otro factor que inhibe su acción es AMPK, una quinasa que además activa al complejo de ULK1 en situación de disminución del ratio ATP/AMP. Así, AMPK regula el metabolismo celular para mantener la homeostasis energética. La activación del complejo ULK1 depende por tanto de estímulos de supervivencia celular. Por otra parte, el complejo PI3K de clase III (que se compone de Beclin1, Vps4, Atg14L y Vps15), depende de la unión de Bcl2-BclXL a Beclin1 y de la acción de UVrag. Las proteínas Bcl2 y BclXL son miembros de una familia relacionada con la apoptosis (muerte celular programada). Dentro de esta familia hay proteínas con actividad prosurvivencia y otras con actividad proapoptótica. Si bien tanto Bcl2 como BclXL tienen actividad prosurvivencia, protegiendo a la célula de diversas alteraciones citotóxicas, su efecto depende del número de moléculas que contrarresten su actividad. *Adaptada de Choi M.D. et al (2013) Autophagy in Human Health and Disease. N Engl J Med 7, 368.*

### 3.2. ELONGACIÓN: DE FAGÓFORO A AUTOFAGOSOMA<sup>21, 24</sup>

La proteína ATG14L, miembro del complejo PI3K de clase III, inicia el reclutamiento de la maquinaria de ATG que participa en la elongación del fagóforo, y su subsecuente transformación en autofagosoma. Son dos eventos los que principalmente se llevan a cabo de manera casi simultánea, hablamos de la conjugación Atg5-Atg12 y el procesamiento de LC3 (Figura 3).

Esta etapa de elongación del fagóforo y formación del autofagosoma requiere una coordinación altamente regulada de todas estas proteínas. Aún no está del todo claro cuál es el mecanismo por el cual las membranas adicionales (provenientes del resto de orgánulos membranosos) son enviadas y fusionadas con el fagóforo, aunque recientemente se ha visto que la proteína ATG9 podría estar involucrada en esta función.



**Figura 3. Reacciones que permiten la elongación del fagóforo.** En el recuadro superior vemos un esquema de la conjugación de ATG5 con ATG12. Lo que sucede es que ATG7 (enzima tipo E1) activa a ATG12 de una manera dependiente de ATP al unir su residuo de glicina carboxiterminal. ATG12 es entonces transferida a ATG10 (enzima tipo E2) que causa el enlace covalente de ATG12 a la lisina 130 de ATG5. Esta conjugación ATG12-ATG5, que se da de forma constitutiva (independientemente de si la autofagia está inducida o no) se une de manera no covalente a un dímero de ATG16L, formando un complejo que se asocia al fagóforo en elongación. En el recuadro inferior vemos un esquema del procesamiento de LC3. LC3B es una proteína citosólica asociada a microtubulos que se expresa en la mayoría de tipos celulares. Con la inducción de la autofagia, ATG4 la corta por su extremo C-terminal generando LC3B-I, que después es conjugada a fosfatidil etanolamina (PE) por la acción de Atg7 y Atg3 (enzima tipo E1) para formar LC3B-II. LC3B-II, reclutada por el complejo Atg5-Atg12-Atg16L, queda anclada a las dos partes de la doble membrana del fagóforo en expansión. Se cree que su papel es el de mediar en la selección de la carga principal a degradar al interaccionar con moléculas como p62, las cuales se unen a los agregados proteicos a través de enlaces de ubiquitina. Conforme el fagóforo va creciendo y se aproximan sus extremos entre sí para cerrarse y formar el autofagosoma, el complejo Atg5-Atg12-Atg16L se disocia de la membrana externa. En cambio, las moléculas de LC3B-II permanecen asociadas al autofagosoma maduro hasta justo antes de fusionarse con el lisosoma. En ese momento las LCB-II ancladas a la membrana externa son cortadas y liberadas de vuelta al citosol, donde podrán ser recicladas. Las LC3B-II que queda en la parte interna de la membrana serán degradadas. *Adaptada de Choi M.D. et al (2013) Autophagy in Human Health and Disease. N Engl j Med 7, 368.*

### 3.3. FUSIÓN CON EL LISOSOMA Y DEGRADACIÓN DE LA CARGA<sup>27, 28</sup>

Una vez formados, los autofagosomas son transportados por los microtubulos, gracias a proteínas motoras, hasta las regiones celulares ricas en lisosomas.

La fusión puede darse de dos maneras: o bien el autofagosoma se fusiona primero con un endosoma para formar amfisomas que acaban fusionándose con los lisosomas; o bien se fusionan directamente con los lisosomas. Entonces, se procede a la degradación de la carga, que solo puede ser eficiente si el pH lisosomal es el correcto (para lo cual se necesita la regulación de la proteína transmembrana Presenilina 1) y si las enzimas degradativas (hidrolasas como la catepsina B, D y L) funcionan correctamente. Las pequeñas moléculas resultantes de la degradación son transportadas de vuelta al citosol.

En el proceso degradativo se consumen los lisosomas, con lo que debe haber siempre suficientes para que se pueda fusionar con ellos los autofagosomas y no interrumpir la autofagia. El factor de transcripción EB (TFEB) ha sido identificado como un regulador clave en la biogénesis lisosomal, así como en la maduración del autofagosoma, con lo que esta proteína resulta cumplir un papel importante en la autofagia.

Esta etapa final de la autofagia está mediada por VAMP3, VAMP7 y VAMP8, miembros de la familia de proteínas SNARE que se caracteriza por mediar eventos en los que se dan fusiones de vesículas.

En concreto VAMP3 está implicada en la fusión entre endosomas y autofagosomas para generar el amfisoma. La fusión del amfisoma, o directamente del autofagosoma, con el lisosoma está mediada por VAMP7 y VAMP8, que se encuentran en la membrana lisosomal.

Para la correcta función de estas proteínas se necesita la regulación de PICALM, de la cual hablamos en el apartado que viene a continuación.

## 4. FALLOS EN LA AUTOFAGIA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las proteínas implicadas en el proceso de la autofagia que se han demostrado estar alteradas en AD son Beclin1, PICALM y PSEN1 (Presenilina-1)<sup>6, 19, 29, 30</sup>. Aun así, es importante señalar que no en todos los casos de AD se ha visto que lo que falle sea el mecanismo de la autofagia en sí. Puede ocurrir que la autofagia se esté dando solo a un nivel basal (por una constante actividad inhibidora de mTORc1) donde su acción no es suficiente. Esto además está relacionado con que, conforme una persona envejece, independientemente de si padece una enfermedad neurodegenerativa, la autofagia se va a dar de manera menos eficiente.

### BECLIN1<sup>31, 32</sup>

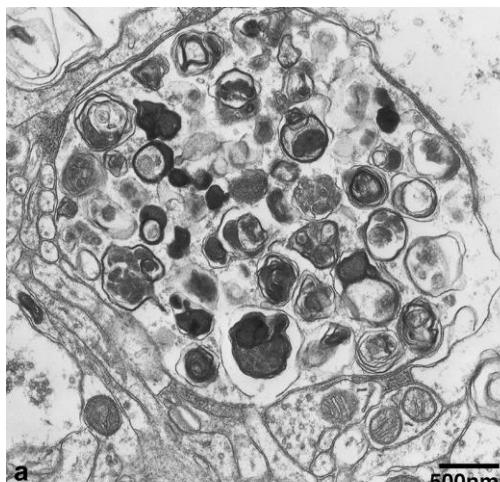
Se ha visto que los niveles de Beclin 1 se encuentran reducidos en las zonas afectadas del cerebro de los pacientes con AD leve. Como ya hemos comentado, Beclin 1 es una proteína requerida en las primeras etapas de la formación de los autofagosomas. Si este proceso se ve comprometido la carga que no se llega a degradar promueve la agregación de otros componentes intracelulares y se puede convertir en una fuente de productos tóxicos (como la producción de ROS por mitocondrias dañadas). Así pues, se da una agregación de proteínas mal plegadas o tóxicas, como la beta-amiloide y la tau hiperfosforilada.

## PICALM<sup>49</sup>

PICALM es una proteína que se ha asociado a AD gracias a estudios GWAS. Se ha visto que PICALM se encuentra anormalmente escindido (roto) en cerebros de pacientes con AD, resultando en una disminución del nivel de la proteína completa. Esta proteína es necesaria en la fusión del autofagosoma con el lisosoma (por su interacción con VAMP7 y VAMP8). Con la ausencia de PICALM se observa una menor fusión de los autofagosomas con los lisosomas, lo que resulta en una reducción general del flujo autofágico y una acumulación progresiva de los autofagosomas (Figura 4). Esos defectos contribuyen a la acumulación de Tau. La acumulación de autofagosomas, que no se llegan a fusionar y por tanto no se degradan, es un problema por dos motivos: pueden interferir por el tráfico intracelular y además se pueden convertir en una fuente de productos citotóxicos.

## PRESENILINA-1<sup>33, 34</sup>

Debido a que la proteína presenilina-1 es clave para la acidificación del lisosoma, una disminución en los niveles de PSEN-1 va a alterar el pH de manera que, aunque se dé la fusión autofagosoma-lisosoma, no se va a poder degradar correctamente la carga. Esta discapacidad proteolítica genera una acumulación masiva de autofagolisosomas en las neuronas, tal y como se observa en el cerebro de pacientes con AD en etapas avanzadas (Figura 4). En este caso, un peligro añadido a la posible interferencia con el tráfico celular es que, cuando los autofagolisosomas se quedan en el citosol por un periodo de tiempo prolongado empiezan a desmenuzarse, y entonces se liberan las enzimas lisosomales, lo que a menudo activa la muerte celular.



**Figura 4. Acumulación de autofagosomas en biopsias neocorticales de pacientes con AD.** Estos cortes proceden de una región de la materia gris denominada neuropilo que se compone de abundantes terminaciones axónicas, dendritas y sus conexiones sinápticas. Podemos ver como el citoplasma de esta neurona afectada por AD, está casi completo de autofagosomas de diferentes tamaños y morfologías. *Adaptado de Wegiel J. et al (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study - J Neuropathol Exp Neurol 64, 113-122*

La PSEN-1 falla por una mutación en el gen que la codifica (situado en el cromosoma 1). Esta mutación es frecuente en la forma familiar de la enfermedad de Alzheimer. Otra mutación asociada con el AD familiar se encuentra en el gen que codifica la proteína precursora de amiloide (APP), situado en el cromosoma 21. APP es una proteína transmembrana que afecta a la  $\beta$ -catenina, anclándola al citoesqueleto de actina y desempeñando así un importante papel en la adhesión célula-célula.

Estas proteínas están relacionadas entre sí no solo por encontrarse mutadas en la AD familiar, sino porque PSEN-1 (en complejo con una  $\gamma$ -secretasa) es una de las moléculas que median la síntesis del péptido A $\beta$  ( $\beta$ -amiloide) a partir de su precursor APP (Figura 5).

Además, también se ha visto que PSEN-1 regula la homeostasis del calcio en el RE, la cual se ve desequilibrada cuando esta proteína falla. En AD, elevadas concentraciones de calcio citosólico estimulan la agregación de A $\beta$  y afectan a la regulación de diversas vías de señalización<sup>40</sup>.

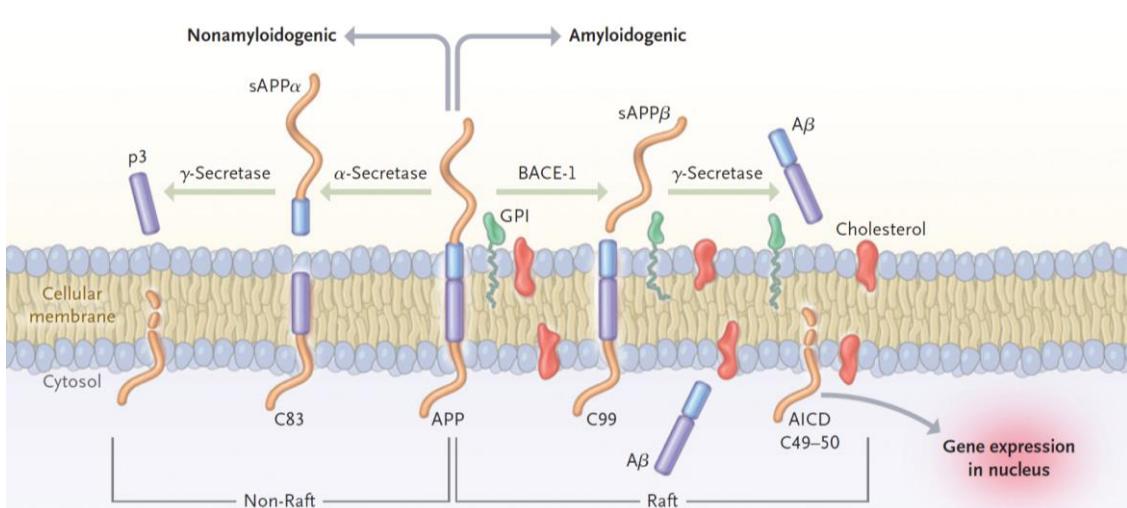
Como vemos, las consecuencias de estos fallos son diversos. Podemos resaltar el problema de las proteínas tóxicas, dañadas o mal plegadas, que ante una disfunción autofágica se acumulan en el citoplasma formando agregados que poco a poco se van convirtiendo en lo que conocemos como placas seniles (por agregación de A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares (por agregación de Tau hiperfosforilada) característicos de la enfermedad de Alzheimer.

## 5. SOBRE LA ACUMULACIÓN PROTEICA <sup>1, 6, 34, 35</sup>

### 5.1. ACUMULACIÓN DE BETA-AMILOIDE Y FORMACIÓN DE PLACAS SENILES

Los péptidos A $\beta$  son productos naturales del metabolismo que consisten en 36 a 43 aminoácidos. A niveles fisiológicos, la acción de los A $\beta$  sinápticos modera la transmisión excitatoria y previene la hiperactividad neuronal. En individuos sanos, los monómeros de A $\beta_{40}$  son mucho más prevalentes que las especies A $\beta_{42}$  las cuales son propensas a formar agregados y son tóxicas para las células.

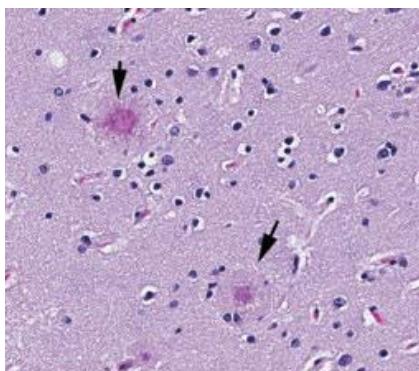
Como ya hemos comentado, los péptidos A $\beta$  se originan de la proteólisis de APP por una serie de reacciones enzimáticas realizadas por el complejo  $\gamma$ -secretasa-PSEN1 y la enzima BACE-1 (Figura 5).



**Figura 5. Procesamiento de la Proteína Precursora de Amiloide (APP).** Se muestran las dos vías por las cuales APP puede ser cortada. El proceso generador de amiloide tiene lugar en las balsas lipídicas (lipid raft en inglés), que son unas zonas de la membrana enriquecidas en esfingomielina, colesterol y proteínas ancladas a GPI (glicosil fosfatidil inositol), que se caracterizan por una menor fluidez. En esta situación la acción de la enzima BACE-1 corta a APP de manera que queda dividida en sAPP $\beta$  y un fragmento de 99 aminoácidos que llamamos C99. Este fragmento bajo la acción de un complejo  $\gamma$ -secretasa se separa para formar por una parte el **péptido A $\beta$**  y por la otra el dominio amiloide intracelular AICD. Este dominio de aproximadamente 50 aminoácidos es liberado al citosol antes de ser llevado al núcleo donde activa la transcripción de distintas moléculas señal. En la parte izquierda de la imagen se muestra como se procesa APP cuando no está insertada en una zona de balsa lipídica, donde la acción de las enzimas  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa acaba formando dos fragmentos no amiloideos. Adaptado de Querfurth H et al (2010) Alzheimer's Disease. N Engl J Med 362; 329-362

Un desequilibrio entre la producción y la degradación con la subsecuente agregación del péptido, hace que A<sub>β</sub> se acumule, y se postula que este exceso podría ser el factor que inicia la enfermedad de Alzheimer. A esta teoría se le llama “hipótesis amiloidal”.

A<sub>β</sub> se auto-agrega de forma espontánea en una multitud de formas físicas distintas que coexisten. Puede formar oligomeros (de 2 a 6 péptidos), que se unen en agregados intermedios, o también puede crecer en forma de fibrillas, las cuales se organizan ellas mismas en láminas beta para formar las fibras insolubles de las placas de amiloide avanzadas conocidas como placas seniles (Figura 6).



**Figura 6. Placas seniles en el neuropilo de paciente con enfermedad de Alzheimer.** Se muestra una sección neuronal tratada con una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en la que se observan dos agregaciones de amiloide (señaladas con las flechas negras) en forma de placas seniles neuríticas.

*Adaptado de Harry V. Vinters (2015) Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. Annu Rev Pathol Mech Dis. 10, 291-319.*

Los oligomeros solubles y los amiloides intermedios son las formas más neurotóxicas de A<sub>β</sub>. De hecho, la gravedad del defecto cognitivo en AD se correlaciona con los niveles de oligomeros en el cerebro, y no con la cantidad de A<sub>β</sub> total. El efecto tóxico de estas formas de A<sub>β</sub> se manifiesta en/por la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), y daño mitocondrial, puesto que este péptido inhibe enzimas mitocondriales importantes. El resultado final es la inducción a la apoptosis.

En el inicio de la muerte neuronal se libera A<sub>β</sub> al medio extracelular, el cual se acumula formando las denominadas placas seniles. Se cree que entonces los astrocitos y las microglías (dos tipos de células de la glía) articulan/emiten una respuesta inflamatoria para limpiar los agregados amiloides que en cambio resulta en una destrucción de las neuronas adyacentes, sus axones y sus dendritas. Otro aspecto a tener en cuenta es que A<sub>β</sub> podría actuar él mismo como agente pro-inflamatorio, y esta neuroinflamación contribuye al daño neuronal. Además el A<sub>β</sub> puede entrar en otras neuronas y acabar dañándolas.

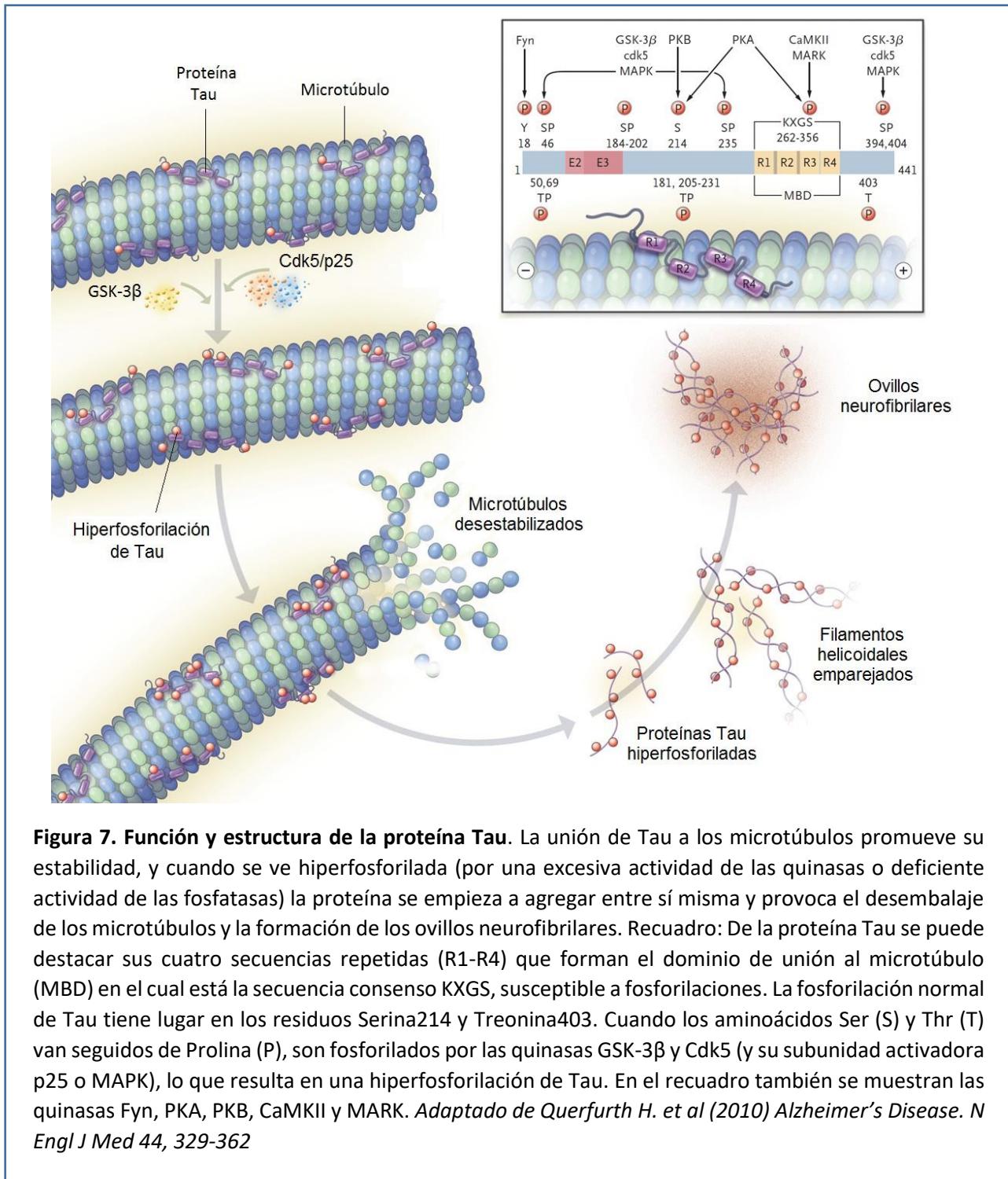
## 5.2. ACUMULACIÓN DE TAU Y FORMACIÓN DE OVILLOS NEUROFIBRILARES <sup>36</sup>

Los ovillos neurofibrilares son un conglomerado anormal de proteínas compuesto por pequeñas fibrillas entrelazadas dentro de las neuronas piramidales. Se dan en AD y otras enfermedades neurodegenerativas conocidas como tautopatías. El número de ovillos neurofibrilares es un marcador patológico de la gravedad de AD.

El mayor componente de los ovillos es una forma anormalmente hiperfosforilada y agregada de la proteína Tau. Ésta es una proteína soluble que en condiciones fisiológicas es abundante en los axones y promueve la estabilidad y ensamblado de los microtúbulos y el transporte vesicular.

La forma hiperfosforilada de Tau, en cambio, es insoluble y carece de afinidad por los microtúbulos, por lo que se auto-asocia en estructuras helicoidales filamentosas que finalmente formarán los ovillos (Figura 7).

Se piensa que estos ovillos neurofibrilares interfieren con el transporte axónico normal de los componentes que resultan necesarios para una correcta función neuronal (como vesículas sinápticas con neurotransmisores o factores neurotróficos), causando fallo sináptico y eventualmente la muerte celular de las neuronas, dañando con esto la cognición.



**Figura 7. Función y estructura de la proteína Tau.** La unión de Tau a los microtúbulos promueve su estabilidad, y cuando se ve hiperfosforilada (por una excesiva actividad de las quinasas o deficiente actividad de las fosfatases) la proteína se empieza a agregar entre sí misma y provoca el desembalaje de los microtúbulos y la formación de los ovillos neurofibrilares. Recuadro: De la proteína Tau se puede destacar sus cuatro secuencias repetidas (R1-R4) que forman el dominio de unión al microtúbulo (MBD) en el cual está la secuencia consenso KXGS, susceptible a fosforilaciones. La fosforilación normal de Tau tiene lugar en los residuos Serina214 y Treonina403. Cuando los aminoácidos Ser (S) y Thr (T) van seguidos de Prolina (P), son fosforilados por las quinasas GSK-3β y Cdk5 (y su subunidad activadora p25 o MAPK), lo que resulta en una hiperfosforilación de Tau. En el recuadro también se muestran las quinasas Fyn, PKA, PKB, CaMKII y MARK. *Adaptado de Querfurth H. et al (2010) Alzheimer's Disease. N Engl J Med 44, 329-362*

Vamos a ver a continuación con más detalle las consecuencias de estos agregados proteicos que ya hemos ido nombrando. Hablamos del fallo mitocondrial (y subsecuente fallo energético y estrés oxidativo), la alteración del transporte axónico y el fallo sináptico, que llevan a la disfunción cognitiva.

## 6. CONSECUENCIAS DE LA AGREGACIÓN PROTEICA <sup>6, 35, 44</sup>

### 6.1. FALLO ENERGÉTICO, ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO MITOCONDRIAL <sup>37-40</sup>

Ya hemos comentado con anterioridad que el péptido A $\beta$  inhibe varias enzimas mitocondriales esenciales para el funcionamiento del orgánulo. La enzima **citocromo c oxidasa** (complejo IV) se ve especialmente atacada, alterándose con ello el transporte de electrones (fosforilación oxidativa). Es importante señalar que las mitocondrias dañadas, dado que la autofagia es disfuncional, suelen acumularse en las zonas de sinapsis, generando con ello el fallo sináptico.

La interrupción de la fosforilación oxidativa afecta a la mitocondria principalmente de tres maneras:

- Se da una reducción en la producción de ATP, lo que genera un fallo energético que impide que se lleven a cabo muchas reacciones fundamentales para la supervivencia celular.
- Disminuye el consumo de oxígeno como receptor de electrones, por lo que éste se reduce a anión superóxido (radical libre) comenzando así la formación de ROS. Estas especies reactivas causan estrés oxidativo y diversos daños moleculares. Por ejemplo, la peroxidación de los lípidos de membrana produce aldehídos tóxicos que dañan varias enzimas importantes.
- Desequilibra el potencial de membrana, dándose un aumento en la permeabilidad para el calcio y otros iones. Elevados niveles de iones como el hierro, el cobre y el aluminio interaccionan con las especies reactivas de oxígeno mediando el daño neuronal. También promueven un aumento en la fosforilación de Tau. Por su parte, niveles altos de calcio citosólico promueven una mayor agregación de A $\beta$  y síntesis de APP.

Todo esto se agrava por el hecho de que A $\beta$  por sí solo ya es un potente generador de ROS y RNS, y además modifica los canales de calcio del RE y de la membrana plasmática, aumentando aún más los niveles de este ion en el citosol. Puesto que el calcio es clave en muchas vías de señalización, la alteración de su homeostasis contribuye a la progresiva degeneración neuronal y cognitiva.

### 6.2. DEFICITS EN EL TRANSPORTE AXÓNICO <sup>41-43</sup>

Podemos distinguir dos tipos de transporte axónico según en el sentido en que se recorran los microtubulos. El transporte anterógrado se da desde el cuerpo celular hasta las terminaciones del axón. En él participan distintas proteínas de la familia de las kinesinas, que suelen transportar mitocondrias, vesículas o enzimas. Recientemente se ha visto que APP, BACE-1 y PSEN-1 también participan en este tipo de transporte con el objetivo de liberar A $\beta$  y otros derivados proteolíticos en la zona de la sinapsis. Por su parte, el transporte retrogrado se da de las terminaciones del axón hacia el cuerpo de la neurona. En este caso participan proteínas de la familia de las dineínas y suelen transportar material exógeno absorbido, membranas vesiculares degradadas o factores neurotróficos.

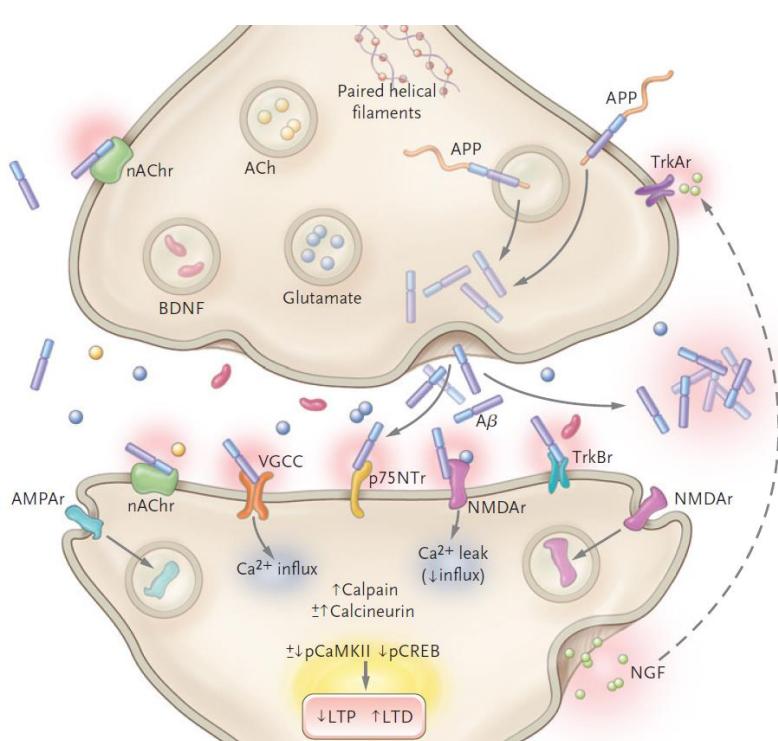
En la enfermedad de Alzheimer encontramos una reducción en el transporte axónico debido a la hiperfosforilación y agregación de Tau. Esta forma anormal de la proteína la hace incapaz de estabilizar y mantener el espacio correcto entre microtubulos, provocando su desembalaje y dejando por tanto a las kinesinas y dineínas sin vía por la que transportar la carga.

Así, un fallo en el transporte causa la acumulación de vesículas, proteínas motoras y APP a lo largo del axón, causando la deposición local de A $\beta$  e inflamación. Algunas de estas vesículas son autofagosomas, que no llegan a fusionarse con los lisosomas de las zonas de sinapsis, agravando la situación.

### 6.3. FALLO SINÁPTICO

Las sinapsis es un proceso que permite el paso de información, de una neurona a otra, al transformar una señal eléctrica en otra química. Se lleva a cabo mediante la liberación de vesículas contenedoras de neurotransmisores desde la terminación de la neurona pre-sináptica hasta la de la post-sináptica. Estas vesículas también pueden contener neurotrofinas, que son una familia de proteínas que promueven la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas y las células de la glía. Además median el aprendizaje, la memoria y el comportamiento.

El envejecimiento causa pérdida sináptica, afectando en particular a la región dentada del hipocampo. En los pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI, por sus siglas en inglés), un déficit cognitivo que a menudo precede a la demencia, las sinapsis del hipocampo contemplan una reducción aún mayor<sup>1</sup>. En la fase moderada de la enfermedad de Alzheimer se da además una disminución de alrededor del 25% de sinaptofisina. Esta es una proteína pre-sináptica que en una situación fisiológica interacciona con el calcio para inducir la liberación de los neurotransmisores. En la enfermedad de Alzheimer, los oligomeros de A<sub>β</sub> alteran los distintos receptores de tal manera que cesa la liberación de neurotransmisores y neurotrofinas (**Figura 8**). Esto resulta en fallo sináptico (donde se ven inhibidas muchas de las moléculas señal que son importantes para la memoria), pero no siempre tiene porque desencadenar la muerte celular. Así, en la fase avanzada de AD se ha visto que el número de sinapsis perdidas está en desproporción con el número de neuronas perdidas, es decir, se muestra que no se pierden tantas neuronas como se pierden sinapsis.



**Figura 8. Disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer.** A<sub>β</sub> suprime la transmisión nerviosa al facilitar la endocitosis de NMDAr y AMPAr (receptores post-sinápticos para el neurotransmisor glutamato) y al unirse a otros receptores y canales, bloqueando su acción. Hablamos de los receptores post-sinápticos de neurotrofinas TrkB y p75NTr, el receptor de acetilcolina nicotínica nAChr, y el canal VGCC mediante el cual altera el balance de calcio. Todos estos receptores son esenciales para el procesamiento cognitivo, con lo que su bloqueo en la enfermedad de Alzheimer causa neurodegeneración. Adaptado de Querfurth et al (2010) *Alzheimer's Disease*. N Engl J Med 364; 329-362

## 7. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS PARA EL ALZHEIMER<sup>45</sup>

### 7.1. ESTRATEGIAS ENFOCADAS A LA MEJORA DE LA AUTOFAGIA<sup>29, 30</sup>

La orientación terapéutica actual de la autofagia en la enfermedad de Alzheimer está limitada por una comprensión incompleta de cómo el proceso contribuye a la patogénesis en cada caso, la escasez de compuestos específicos que influyan en la autofagia, y la disponibilidad limitada de terapias candidatas con eficacia clínica.

Parece ser que, en la primera fase de AD (Alzheimer leve), el tratamiento con agentes inductores de autofagia puede prever la acumulación de placas y ovillos al degradar estos agregados. Sin embargo, la promoción autofágica puede agravar la patología de los estados avanzados de AD, donde la fusión autofagosoma/lisosoma o la función lisosomal está dañada (se daría una mayor acumulación de vesículas). Así, las estrategias que mejoren la fusión autofagosoma/lisosoma y la actividad lisosomal serán esenciales para las terapias de AD avanzados.

Al idear las estrategias también hay que tener en cuenta que muchas proteínas autofágicas y fármacos inhibidores, pueden afectar a otros procesos biológicos; con lo que el diseño de agentes terapéuticos es complicado.

#### EL PROBLEMA DE LA INHIBICIÓN DE mTORC1<sup>46</sup>

Como ya hemos comentado al principio del apartado 4, en muchos casos ocurre que el problema de los agregados proteicos viene de que la autofagia se da a un nivel basal en vez de verse estimulada. Esto se debe a una constante actividad inhibidora de mTORc1. Por este motivo, la inhibición del complejo mTORc1 ha sido, durante mucho tiempo, el principal objeto de estudio en el campo de la regulación autofágica como estrategia terapéutica en neurodegeneración.

El primer fármaco que se identificó como inductor de la autofagia por inhibición de mTOR fue la **Rapamicina**. Aunque después se ha visto que su inhibición no es total, se ha demostrado en varios modelos animales que este inmunosupresor disminuye los niveles cerebrales del péptido neurotóxico Aβ<sub>42</sub> y atenúa la acumulación de tau hiperfosforilada. Así, este fármaco podría ayudar a los pacientes que están en las primeras fases de la enfermedad<sup>47, 48</sup>. También debemos hablar de una pequeña molécula activadora de la Rapamicina, **SMER28**, que disminuye considerablemente los niveles de Aβ y APP<sup>50</sup>.

Poco a poco se han ido identificando otros compuestos inhibidores de la acción de mTOR. Un ejemplo es el fármaco **Latrepirdine**<sup>51</sup>, también conocido como Dimebon, que además se ha visto implicado en el metabolismo de APP. Como resultado estimula la autofagia y reduce la neuropatología de Aβ. Actualmente se encuentra en fase III de ensayo clínico. Por su parte, el agonista de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), **Metformina**, que inhibe la hiperfosforilación de Tau tras inhibir el complejo mTORc1, está en fase II de ensayo clínico<sup>52</sup>.

Pese a los buenos resultados que estas moléculas están dando en la patología del Alzheimer, el uso de estos fármacos muestra distintos efectos secundarios en los pacientes, incluyendo inmunosupresión y problemas en la cicatrización. Esto es debido a que mTOR tiene otras funciones independientes de la autofagia, con lo que su inhibición perjudica a otros sistemas.

## INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR ACTIVACIÓN DE AMPK<sup>6</sup>

La autofagia también puede ser inducida activando la quinasa AMPK. Recientemente, varios experimentos y ensayos clínicos sugieren que el **litio** puede mejorar la patogénesis de AD al actuar en una combinación de mecanismos que induce la activación de AMPK, y por tanto la del complejo ULK1 induciendo la autofagia. Se ha mostrado neuroprotector en diversos modelos animales, donde además se observó un aumento en el número de mitocondrias y neuronas. También se ha visto como una administración diaria en pacientes humanos consigue retrasar la progresión de la enfermedad.<sup>53</sup>

Por su parte el **Resveratrol** y sus análogos RSVA314 y RSVA405, llevan a cabo una serie de acciones moleculares que incluyen la activación de AMPK y muestran un efecto protector contra el Alzheimer<sup>54</sup>.

El Resveratrol es un compuesto fenólico (abundante en el vino tinto y las uvas y numerosas frutas) que debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, es usado como terapia alternativa en varias patologías como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. Debido al estrés oxidativo que se genera en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, se consideró el uso de Resveratrol como terapia. En modelos animales se ha visto que el Resveratrol reduce la neurodegeneración en el hipocampo y el déficit en el aprendizaje tras bajar los niveles de péptido Aβ intracelular<sup>55</sup>. Hoy sabemos que esto es debido a su implicación en la activación de AMPK<sup>54</sup>. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos en fase III para tratar pacientes con AD leve y moderada.

## ESTRATEGIAS ENFOCADAS A RESOLVER EL PROBLEMA LISOSOMAL

En los casos en los que el fallo está en la última fase del proceso de macroautofagia, el tratamiento óptimo sería el de mejorar la función lisosomal.

Actualmente se está estudiando el factor de transcripción **TFEB**<sup>56</sup> (cremallera de leucina de la familia MiT), en el que se ha visto que una sobreexpresión lo trasloca al núcleo y promueve la biogénesis lisosomal. Así, los nuevos y sanos lisosomas pueden mediar en la retirada de los autofagosomas acumulados y llevar a cabo la correcta degradación de la carga. Sin embargo, no está claro por cuánto tiempo se puede mantener esta síntesis adicional de lisosomas. Otra función que se ha visto es que induce y enlaza los diferentes tipos de autofagia.

En el modelo de ratón rTg4510 se ha observado que al inducir la autofagia a través de la expresión exógena de TFEB en el cerebro, la patología causada por tau se ve disminuida, así como la neurodegeneración general y los déficits en el comportamiento<sup>57</sup>. Así mismo, en el modelo de ratón APP/PS1 la expresión de TFEB en los astrocitos facilita la reducción de las placas de Aβ. Esto se da tanto por la inducción de la degradación lisosomal como por la inducción del consumo del péptido por los astrocitos<sup>58</sup>. En este mismo modelo de ratón también se ha probado con inyecciones de virus adeno-asociados (AAV)-TFEB bajo un promotor de citomegalovirus (CMV). Se ha observado una reducción de APP por su degradación en los lisosomas, y con esto, una menor producción de Aβ y de formación de placas<sup>59</sup>.

Otro compuesto relacionado con la función lisosomal es la **Nicotinamida** o Niacina. Se trata de una vitamina hidrosoluble que actúa en el metabolismo celular como grupo prostético de

distintas coenzimas. Sus derivados son NADH y NADPH, esenciales en el metabolismo energético de la célula y en la reparación del ADN.

El uso de Nicotinamida como terapia previene la patología y la disminución cognitiva al mejorar la acidificación del autofagolisosoma (lo que reduce la acumulación de autofagosomas y la correcta degradación de la carga) en modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer. Actualmente se encuentra en la fase I de ensayo clínico<sup>60</sup>.

## 7.2. OTRAS ESTRATEGIAS

### TERAPIAS ENFOCADAS A LA DISMINUCIÓN DE LOS AGREGADOS PROTEICOS DE UNA MANERA INDEPENDIENTE DE LA AUTOFAGIA<sup>36, 61</sup>

Como los problemas de la enfermedad de Alzheimer se han visto relacionados con la agregación proteica, la estrategia se ha enfocado sobre todo en disgregar estas agregaciones. Por tanto, diversos tratamientos están enfocados a combatir la agregación de las proteínas A $\beta$  y tau hiperfosforilada. En ambos casos se juega tanto con un aumento de su degradación como con una disminución de su producción.

En el caso de A $\beta$  lo que se propone para disminuir su producción es diseñar fármacos que inhiban las secretasas  $\gamma$  y  $\beta$ , encargadas de formar el péptido a partir de su precursor APP. Aunque estas enzimas están identificadas desde hace tiempo, ha sido complicado desarrollar fármacos que inhiban la rotura de APP sin afectar la rotura de otros sustratos. De hecho, un ensayo clínico en fase III fue suspendido recientemente porque como efecto secundario se daba un daño cognitivo aún mayor en los pacientes<sup>62</sup>. Otra estrategia que se propone es la de modular el corte de la  $\gamma$ -secretasa sobre APP para que en vez de producir A $\beta_{42}$  se produzcan péptidos más cortos, que resultan menos tóxicos (aunque no podemos asegurar que no contribuyan a una disfunción neuronal)<sup>63, 64</sup>. Por esto, lo que se está intentando conseguir son inhibidores de  $\gamma$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa que resulten seguros y eficaces.

Los tratamientos ideados para disminuir la cantidad de A $\beta$  mediante la inducción de su degradación, se han diseñado entorno a un experimento en ratón que demostró cómo la inmunización activa contra A $\beta$  quitaba las placas de amiloide<sup>65</sup>. En cambio, un ensayo clínico de inmunización activa en humanos tuvo que ser detenido por los efectos secundarios inmunopatológicos<sup>66</sup>. Otro ensayo de inmunización pasiva por infusiones repetidas de anticuerpo monoclonal anti-A $\beta$ , fue más tolerado pero también dejó efectos secundarios incluyendo edemas vasogenicos y micro-hemorragias en una parte de los pacientes<sup>67</sup>. Actualmente este estudio está en fase III, pero se necesita una mayor investigación para evaluar el potencial terapéutico y la seguridad de estas estrategias.

En el caso de Tau, el número de ensayos clínicos llevados a cabo es mucho menor. No obstante, el interés en enfocar la estrategia terapéutica hacia esta proteína ha aumentado en los últimos años en parte por las dificultades encontradas en las terapias contra A $\beta$ .

En pacientes con AD, el azul de metileno mostró una ralentización en la progresión de la enfermedad en un ensayo clínico en fase II. El azul de metileno inhibe la interacción tau-tau, y además se cree que puede reducir la forma soluble de tau a través de otros mecanismos. Está planificada una fase III del ensayo clínico con una nueva formulación del azul de metileno<sup>68</sup>.

Otra estrategia terapéutica para tau es la de inhibir las quinasas que participan en su hiperfosforilación. Sin embargo, dado que estas quinasas tienen otros substratos además de tau, hay una gran preocupación sobre la seguridad de estos inhibidores. Por ahora ningún inhibidor de quinasas ha llegado a fases avanzadas de ensayo clínico en AD.

La degradación de tau puede verse inducida por una inmunización activa. Se ha visto que reduce el número de filamentos y la disfunción neuronal en ratones<sup>69</sup>. El mecanismo por el cual los niveles de esta proteína intracelular son disminuidos no se conoce, pero puede que tengan que ver con la degradación lisosomal.

También señalar la estrategia enfocada a estabilizar los microtúbulos. Un ejemplo es el uso de Eptilonina D, que aumenta el número de microtúbulos y mejora la cognición en modelos de ratón<sup>70</sup>. Así mismo, el péptido natriurético atrial (NAP) estabiliza los microtúbulos y reduce la hiperfosforilación de tau, lo que sugiere que los compuestos estabilizadores de microtúbulos pueden tener más de un mecanismo de acción. NAP puede ser administrado de manera intranasal y ha mostrado eficacia en ensayos clínicos en fase II<sup>71</sup>.

Por último comentar el uso de Zinc para tratar AD. La suplementación con el ion Zn<sup>2+</sup> en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer ha conseguido mejorar la función mitocondrial y disminuir la cantidad de A<sub>β</sub> y Tau en el hipocampo. El problema es que la quelación del Zinc parece tener efectos tóxicos en algunos tipos celulares.

## TERAPIAS ENFOCADAS AL CONTROL DE LOS SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD<sup>35</sup>

Aunque no hay cura para la enfermedad de Alzheimer, desde hace tiempo existen medicamentos que ayudan a controlar los síntomas. Actualmente el pilar de la terapia para AD son los fármacos que tienen como objetivo el sistema de neurotransmisores y neurotrofinas en el cerebro<sup>1</sup>. Hemos de decir que estos tratamientos no ralentizan la progresión de la enfermedad ni revierten su curso.

Ya hemos comentado en el apartado 6.3. que los niveles de receptores de neurotrofinas en las neuronas colinérgicas están severamente reducidas en los pacientes con AD avanzado. Así, los niveles de neurotrofinas, como BDNF, se encuentran disminuidos. En modelos de ratón y primates no humanos se ha visto que un tratamiento con **BDNF** mantiene la supervivencia neuronal, la función sináptica y la memoria. Otra solución es la inyección de factor de crecimiento nervioso (**NGF**), que se ha visto como restaura las neuronas en modelos animales. La fase I de ensayo clínico para tratamiento de Alzheimer con NGF ha mostrado una mejora en la cognición y el metabolismo del cerebro.

Otros receptores afectados en AD son los receptores de acetilcolina, esenciales para el procesamiento cognitivo. Este fallo se correlaciona con los primeros síntomas cognitivos de la enfermedad de Alzheimer. Los **inhibidores de la acetilcolinesterasa** (enzima que hidroliza el neurotransmisor Ach) interfieren con la degradación de la acetilcolina, aumentando así los niveles del neurotransmisor en la sinapsis. Esto ayuda a mejorar la función de la memoria y la atención en los pacientes con AD, aunque pierden eficacia con el tiempo.

## 8. CONCLUSIÓN

Puesto que la autofagia mantiene la homeostasis en la célula y garantiza su supervivencia, un fallo en su regulación o en alguno de los pasos de la formación del autofagolisosoma, resulta en un desequilibrio que se ha visto relacionado con la enfermedad de Alzheimer. Para poder abordar esto, es esencial conocer el mecanismo por el que la autofagia actúa, así como sus vías de regulación.

Desde que Yoshinori Ohsumi (Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2016) descubriera parte de los genes implicados en la autofagia y esclareciese parte de su mecanismo molecular, demostrando la relevancia de este proceso, ha aumentado considerablemente nuestro entendimiento de la autofagia. Aun así, la interacción entre los diferentes complejos reguladores involucrados y los mecanismos específicos de la biogénesis del autofagosoma, su transporte y su fusión, necesitan una mayor investigación.

De la misma manera, la falta de entendimiento sobre la primera etapa de la enfermedad de Alzheimer, es el mayor obstáculo para el desarrollo de nuevas terapias. Sí que se ha visto que las acumulaciones proteicas comienzan mucho antes de que se manifieste la enfermedad. Hablamos de años e incluso décadas. Por esto es tan importante la detección temprana de las agregaciones, y su intervención terapéutica correspondiente. El refinamiento de biomarcadores y procedimientos de diagnóstico permitirá a los investigadores identificar los individuos en riesgo (como por ejemplo las personas que sufren MCI) antes de que se manifiesten problemas cognitivos severos. Para esto, los esfuerzos en conseguir mejores biomarcadores deben continuar.

Una vez se manifiesta la enfermedad, el tratamiento debe enfocarse según la fase en la que se encuentre. Por ejemplo, una terapia de inducción a la autofagia en un paciente de AD severa donde lo que falla es la función lisosomal, solo agravaría la patología. En cambio, si se combina el tratamiento de inducción autófágica con otro de mejora lisosomal, como puede ser el uso de TFEB, tal vez se obtendrían buenos resultados. Así, algo importante por explorar es la combinación de las distintas terapias o el uso de fármacos que tengan como diana más de un factor molecular relacionado con la enfermedad.

Por último decir que dentro de las terapias enfocadas a la alteración de la autofagia también sería interesante tener en cuenta los distintos tipos de autofagia que coexisten en la célula.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. KOROLEV I (2014) Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *MSRJ* 4, 24-32
2. ALZHEIMER A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde (Sobre una enfermedad peculiar de la corteza cerebral). *Allg Z Psychiatr* 64, 146-48
3. MAURER K, MAURER U. Alzheimer: La vida de un médico, la historia de una enfermedad. 2<sup>a</sup> ed. España: Ediciones Díaz de Santos, 2006. ISBN: 87-7978-758-9
4. World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Disease International (ADI)* Londres 2015
5. ROSEN M. "Fertility" [en línea] <https://ourworldindata.org/fertility/> [Noviembre 2016]
6. GHAVANI S et al. (2014) Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 112, 24-49
7. GLICK D et al. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221, 3-12
8. DE DUVE C. (1963) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 28, 435-492
9. OHSUMI Y et al. (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169-174
10. OHSUMI Y et al. (1996) Structural and functional analyses of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *Gene* 178, 139-143
11. OHSUMI Y et al. (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192, 207-213
12. OHSUMI Y et al. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192, 245-250
13. OHSUMI Y et al. (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398
14. OHSUMI Y et al. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 174, 435-446
15. OHSUMI Y et al. (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* 18, 3888-3896
16. OHSUMI Y et al. (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J* 18, 5234-5241
17. OHSUMI Y et al. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150, 1507-1513
18. RAJAWAT S et al. (2008) Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. *Hormones (Athens)* 7, 46-61
19. CUERVO AM et al. (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 13, 805-811
20. CUERVO AM et al. (2010) Chaperone-Mediated Autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 7, 29-39
21. KLIONSKY DJ, HE C (2009) Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93
22. YANG Z, KLIONSKY DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131
23. TOOZE S, YOSHIMORI T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biol* 12, 831-835
24. RUBINSZTEIN D et al. (2010) Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Curr Biol* 22, 29-34

25. YOSHIMORI T et al. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogénésis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 759-774.
26. FIMIA A et al. (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature Lett* 447; 28, 1121-1125
27. SHEN H, MIZUSHIMA N (2014) At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem Sci* 39, 61-71
28. MOREAU K et al. (2013) Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem Sci* 38, 57-63
29. MENZIES F et al. (2015) Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews* 16, 345-357
30. NAH J et al. (2015) Autophagy in Neurodegenerative Diseases: From Mechanism to Therapeutic Approach. *Mol Cells* 38, 381-389
31. PICKFORD F et al. (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice. *J clin Invest* 118, 2190-2199
32. JAEGER P (2010) Beclin 1 Complex in Autophagy and Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 67, 1181-1184
33. LEE J et al (2010) Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell* 141, 1146-1158
34. VINTERS H (2015) Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 10, 291-319
35. QUERFURTH H et al. (2010) Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 44, 329-362
36. HANGER D et al (2016) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 15, 112-9
37. LIN M et al (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443 (19) 787-795
38. STARKOV et al (2008) Portal to Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 14 (10) 1020-1021
39. FEANY M et al (2013) Why size matters – balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trens Neurosci* 36, 325-335
40. SUPNET C et al (2010) The dysregulation of intracellular calcium un Alzheimer disease. *Cell Calcium* 47, 183-189
41. HOLZBAUR E et al (2006) Axonal transport and neurodegenerative disease. *ture Reviews Neuroscience* 14, 161-176
42. RODRÍGUEZ T et al (2012) Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiol Aging*. 34(9), 2146-2157
43. YANG Y et al (2013) Autophagy in axonal and dendritic degeneration. *Trends Neurosci* 1-11
44. JELLINGER K (2009) Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Coll Mol Med* Vol 14 No 3, 457-487
45. FRIGERIO C et al (2016) Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annu Rev Neurosci* 39, 57-79
46. TRAMUTOLA A et al (2015) Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnestic mild cognitive impairment and late-stage AD. *J Neurochem* 133, 739-749
47. SPILMAN P et al (2010) Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- $\beta$  Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 5(4)

48. BOVÉ J et al (2011) Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature Reviews* 12, 437-451
49. MOREAU K et al (2014) PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nature Communications* 5
50. TIAN Y et al (2011). A smallmolecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J.* 25, 1934-1942.
51. STEELE J, GANDY S (2013) Latrepirdine (Dimebon), a potential Alzheimer therapeutic, regulates autophagy and neuropathology in an Alzheimer mouse model. *Autophagy* 9, 617-618
52. KICKSTEIN E et al. (2010). Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21830-21835
53. FORLENZA O.V. et al (2012). Does lithium prevent Alzheimer's disease? *Drugs Aging* 29, 335-342.
54. VINGTDEUX V (2010). AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 9100-9113.
55. IWASAKI Y et al (2012) Sendai virus vector-mediated brain-derived neurotrophic factor expression ameliorates memory déficits and synaptic degeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 90, 981-989
56. MARTINI H (2016) The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends Neurosci* 39(4), 221-234
57. POLITO V.A et al (2014) Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Mol Med.* 6 1142-1160
58. XIAO Q et al. (2014) Enhancing astrocytic lysosome biogénese facilitates Aβ clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J. Neurosci.* 34, 9607-9620
59. XIAO Q et al (2015) Neuronal-targeted TFEB accelerates lysosomal degradation of APP, reducing Abeta generation and amyloid plaque pathogenesis. *J. Neurosci.* 35, 12137-12151
60. LIU D et al. (2013). Nicotinamide forestalls pathology and cognitive decline in Alzheimer mice: evidence for improved neuronal bioenergetics and autophagy procession. *Neurobiol. Aging* 34, 1564-1580.
61. HUANG Y, MUCKE L (2016) Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* 148
62. SCHOR N et al. (2011). What the halted phase III g-secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann. Neurol.* 69, 237–239
63. GOLDE T et al. (2011). Anti-ab therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron* 69, 203–213
64. KARRAN E et al(2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 698–712
65. SCHENK D et al. (1999). Immunization with amyloid-b attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177
66. GILMAN S et al. (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64, 1553–1562
67. SPERLING R et al. (2011). Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement.* 7, 367–385.
68. GURA T et al. (2008). Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nat. Med.* 14, 894.

69. ASUNI A. et al. (2007). Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J. Neurosci.* 27, 9115–9129.
70. BRUNDEN K et al. (2009). Advances in taufocused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 783–793.
71. GOZES I et al. (2009). Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 455–460.