



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Final de Grado

Escritura de una revisión sobre las Bases Moleculares de la Enfermedad de Alzheimer

David González Sureda

Grado de Bioquímica

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 43171276T

Trabajo tutelado por Xavier Busquets Xaubet
Departamento de Biología

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Palabras calve del trabajo:
Alzheimer, β -amiloide, Tau, Acetilcolina, Neurodegeneración.

Índice

Introducción.....	4
Epidemiología	5
Cuadro clínico	5
Diagnóstico	6
Etiopatogenia	6
Hipótesis colinérgica	6
Hipótesis excitotóxica.....	6
Daño oxidativo y procesos neuroinflamatorios.....	7
Hipótesis proteína tau	7
Hipótesis beta-amiloide	7
Bases moleculares de la formación de las placas seniles.....	8
Generación del péptido A β	9
Papel fisiológico de A β en la función sináptica	11
La alteración del procesamiento de APP y la Oligomerización de A β	12
Dianas de A β	13
<i>Aβ y los Canales Iónicos</i>	13
<i>Aβ y mitocondrias</i>	14
Bases moleculares de la formación de los ovillos neurofibrilares	16
Las funciones fisiológicas de tau.....	17
Agregación patológica de tau.....	19
Las causas de anomalías de tau en la enfermedad.....	20
Neurodegeneración mediada por Tau.....	22
Efecto de ApoE en la EA	23
Propiedades bioquímicas de apoE.....	23
ApoE y A β	24
ApoE y tau	25
ApoE y la sinapsis neuronal.....	25
Farmacología actual y dianas terapéuticas	26
Terapias actuales.....	26
Terapias emergentes.....	26
Otras posibles terapias	27
Bibliografía.....	29

Objetivos y Metodología

En este trabajo resumo, mediante una memoria de carácter bibliográfico, las distintas bases moleculares que comprende una de las enfermedades neurodegenerativas actualmente más importantes en el ser humano, la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, mi objetivo es agrupar el conocimiento actual sobre la enfermedad para facilitar su comprensión de modo que a partir de ahí se pueda utilizar para mejorar tanto la docencia de la misma como las futuras investigaciones enfocadas a elaborar un tratamiento.

Para una correcta elaboración de la memoria ha sido necesario utilizar bases de datos científicas en las que extraer la información. MEDLINE es probablemente la base de datos de bibliografía médica más amplia que existe, es por ello que ha sido la fuente de información más utilizada para la elaboración del trabajo. Primero fue necesario realizar un estudio preliminar de la enfermedad para adquirir los conocimientos básicos y facilitar la decisión de palabras clave que utilizar en la búsqueda de información

PubMed es un motor de búsqueda que comprende más de 23 millones de citas de literatura biomédica de MEDLINE, revistas científicas y libros online. La palabra clave “alzheimer” muestra un total de 74000 artículos publicados, el primer artículo publicado sobre esta enfermedad fue “Alzheimer, Alois. «Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde». Allg. Zschr. Psychiat. 1907; 64: 146-148”. Fue en la década de los 60 cuando se aprecia un crecimiento exponencial de la literatura científica hasta más de 4700 artículos publicados en 2013. Se repite un patrón similar en la utilización de palabras clave como “acetylcholine”, “beta-amyloid”, “tau” y “apoE”, las cuales junto con la palabra clave “alzheimer” dieron lugar a los artículos seleccionados para elaborar la memoria. Cabe destacar que hay aproximadamente 1700 publicaciones que contienen las palabras clave “alzheimer + acetylcholine”, estas se inician a finales de los años 70 y alcanzan su máximo en la década del 2000, a partir de entonces hay alrededor de 100 publicaciones anuales. En cambio, hay entre 6000 y 6500 publicaciones que contienen las palabras clave “alzheimer + beta-amyloid” y “alzheimer + tau”, se inician a finales los 80 y crecen linealmente hasta alcanzar entre 400 y 650 publicaciones en el año 2013.

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa y la causa más frecuente de demencia, es incurable y terminal. La enfermedad presenta deterioro cognitivo, pérdida progresiva de la memoria y trastornos en la conducta a medida que las células nerviosas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. Por lo general, el síntoma inicial es la inhabilidad de adquirir nuevos recuerdos, pero suele confundirse con actitudes relacionadas con la vejez o con el estrés. Ante la sospecha de padecer EA, el diagnóstico se realiza con evaluaciones de conducta y cognitivas o mediante neuroimágenes. A medida que progresa la enfermedad, aparecen confusión mental, irritabilidad y agresión, cambios del humor, trastornos del lenguaje, pérdida de la memoria de largo plazo y una predisposición a aislarse a medida que los sentidos del paciente declinan. Gradualmente se pierden las funciones biológicas que finalmente conllevan a la muerte.

El primer caso documentado de esta enfermedad fue en 1907, cuando Alois Alzheimer describió el caso de una mujer de 51 años de edad que fue atendida en su consulta porque presentaba un deterioro de la memoria relativamente rápido, junto con trastornos psiquiátricos. Cuando la mujer falleció, un examen de su cerebro reveló la presencia de “Senile Plaques” (SPs) y “Neurofibrillary Tangles” (NFTs) siendo estas formaciones la primera vez que se describían en caso de demencia hasta el momento. Los SPs y los NFTs son las características principales de la EA, a lo largo de este texto desarrollaremos estas características y otras cuya comprensión es más reciente. Las SPs son depósitos extracelulares de beta-amiloide en la sustancia gris del cerebro, están asociadas a estructuras neuronales degeneradas y a abundantes cantidades de microglía y astrocitos. El péptido beta-amiloide es un fragmento de la proteína denominada “Amiloid Precursor Protein” (APP) que se encuentra ampliamente extendida en la membrana plasmática de las neuronas. El corte de la APP mediante secretasas puede provocar la liberación del péptido beta-amiloide al espacio extracelular, donde formará agregados tóxicos. Los NFTs están formados por la hiperfosforilación de la “microtubule-associated protein” (MAP) proteína conocida como tau (MAP-Tau o MAPT) que da lugar a agregados insolubles. Los microtúbulos se desensamblan dañando el sistema de transporte celular lo que provoca la muerte neuronal. Las neuronas en ciertas regiones del cerebro se desconectan unas de otras provocando la pérdida de memoria y la atrofia cerebral.

Epidemiología

La EA supone aproximadamente el 70% de todos los casos de demencia¹. La mayoría de casos se diagnostica en personas mayores de 65 años (conocido como “late-onset Alzheimer disease” o “LOAD”), aunque existen casos de inicio temprano de la enfermedad que surgen a partir de los cincuenta o incluso entre los treinta y los cuarenta en casos más extremos (conocido como “early-onset Alzheimer disease” o “EOAD”). Esta última es un porcentaje muy bajo de los afectados y normalmente está asociado a factores genéticos (por eso reciben con frecuencia el nombre de “familiar AD” o “fAD”). Las tasas de incidencia de la patología aumentan significativamente con la edad, doblándose cada 5-10 años². También hay diferencias de incidencia dependiendo del sexo, ya que se aprecia un riesgo mayor de padecer la enfermedad en las mujeres, en particular entre la población mayor de 85 años (1,5 a 3 veces mayor que en los hombres)³. El aumento del riesgo de EA en las mujeres coincide con la menopausia y, en consecuencia, con la deficiencia de estrógenos en el cerebro. Los estrógenos, de hecho, parecen tener un efecto protector contra la patología de la EA.

Se estima que aproximadamente en la Unión Europea, 3.286.000 personas tienen demencia y 824.000 nuevos casos se desarrollarán cada año⁴. En España, entre la población de 60 o más años, el número de dementes estimado respecto a la década de los 80 aumentó un 50% en el año 2000. Se estima que se duplicarán tales cifras para el año 2025. El incremento de las tasas es debido al progresivo envejecimiento de la población, que supone un mayor porcentaje de personas en edad de riesgo y a los avances en el tratamiento médico que ofrecen mayor supervivencia después del inicio de la enfermedad⁴. El pronóstico para cada individuo es difícil de determinar, el promedio general es de 7 años⁵, menos del 3% de los pacientes viven por más de 14 años después del diagnóstico⁶.

Cuadro clínico

En el cuadro clínico de la EA se distinguen cuatro etapas o fases. La primera fase es la etapa de pre-demencia se caracteriza por tener algunas pérdidas de memoria, las cuales pueden pasar inadvertidas por ser bastante leves pero con el tiempo pueden tener un efecto sobre las actividades de la vida diaria. La deficiencia más notable es la dificultad de recordar hechos recientemente aprendidos y una inhabilidad para adquirir nueva información. También se presentan dificultades leves en las funciones ejecutivas (atención, planificación, flexibilidad) o ligeros trastornos en la memoria semántica (el significado de las cosas y la interrelación entre los concepto). Puede aparecer apatía, siendo esta uno de los síntomas neuropsiquiátricos persistentes a lo largo de la enfermedad.

La segunda fase se denomina demencia inicial, es la fase cuyos síntomas implican una pérdida de memoria que puede ser desde esporádica e inusual hasta una pérdida de memoria persistente y severa también conocida como pérdida de memoria a corto plazo. Además de la recurrente pérdida de la memoria, los pacientes comienzan a presentar dificultades para el lenguaje, el reconocimiento de las percepciones o en la ejecución de movimientos. La memoria a largo plazo, la memoria semántica (de los hechos aprendidos) y la memoria implícita (sobre cómo realizar las acciones) se afectan en menor grado que las capacidades para aprender nuevos hechos o el crear nuevas memorias.

En la tercera fase, o demencia moderada, los problemas del lenguaje aumentan debido a una inhabilidad para recordar el vocabulario. Las capacidades para leer y escribir empeoran progresivamente. Las secuencias motoras complejas se vuelven menos coordinadas, reduciendo la habilidad de la persona de realizar sus actividades rutinarias. Durante esta fase, también empeoran los trastornos de la memoria y el paciente empieza a dejar de reconocer a sus familiares y seres más cercanos. La memoria a largo plazo, que hasta ese momento permanecía intacta, se deteriora.

La demencia avanzada es la última etapa en la que se produce el deterioro de la masa muscular perdiéndose la movilidad, el paciente experimenta incapacidad de alimentarse a sí mismo. Incontinencia urinaria y posible muerte por causas externas (infecciones por úlceras de decúbito o neumonía, por ejemplo). El lenguaje se torna severamente desorganizado llegándose a perder completamente. A pesar de ello, se conserva la capacidad de recibir y enviar señales emocionales. Los pacientes no podrán realizar ni las tareas más sencillas por sí mismos y requerirán constante supervisión, quedando así completamente dependientes.

Diagnóstico

Actualmente no existe un test pre-mortem para diagnosticar de manera concluyente la EA. Deben hacerse pruebas histológicas sobre tejido cerebral, generalmente obtenidas en la autopsia⁷. Las pruebas de imagen cerebral como la Tomografía Axial Computarizada (TAC), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) muestran diferentes signos de que existe una demencia aunque no detallan de cuál se trata. Por tanto, el diagnóstico de la EA se basa tanto en la presencia de ciertas características neurológicas y neuropsicológicas tras una observación clínica (examen físico y neurológico) y el apoyo de un escáner cerebral para detectar signos de demencia. Actualmente existen en desarrollo nuevas técnicas de diagnóstico basadas en el procesamiento de señales electroencefalográficas.

Etiopatogenia

La investigación acerca de la EA ha sido muy intensa y como resultado de ella se están postulando un gran número de hipótesis que ayudan a entender cada día más este complejo proceso neurodegenerativo. Si bien hoy en día no se conoce la etiología de esta enfermedad todos los datos acumulados a lo largo de las últimas décadas apuntan a un conocimiento del origen la misma cada vez más próximo. A continuación examinaremos las hipótesis más relevantes.

Hipótesis colinérgica

La denominada hipótesis colinérgica, iniciada en los años 80, se basa en conseguir un aumento del neurotransmisor acetilcolina en el espacio intersináptico. Según esta hipótesis, la EA tiene sus orígenes en una deficiencia de acetilcolina, el neurotransmisor del sistema colinérgico que juega un papel clave en los procesos de aprendizaje y memoria.

La acetilcolina (ACh) se sintetiza en el interior de la neurona a partir de colina y por acción de un enzima denominado acetilcolíntransferasa (ChAT). Una vez sintetizada, la ACh se almacena en vesículas en el interior de la neurona presináptica. Cuando se produce el impulso nervioso, la ACh se vierte al espacio intersináptico e interacciona con receptores colinérgicos de la neurona postsináptica. Este tipo de receptores son de dos clases distintas: receptores nicotínicos y receptores muscarínicos y su interacción con la ACh transmite la señal nerviosa. El tipo de receptores muscarínicos que se encuentran en las neuronas postsinápticas son los conocidos por M1, mientras que en la neurona presináptica se sitúan los conocidos receptores M2. Estos últimos tienen como misión regular por un mecanismo de retro-alimentación la concentración de ACh en el espacio intersináptico. Es decir, la interacción con la ACh con los receptores M2 indica a la neurona que no debe de verter más neurotransmisor al exterior. En el espacio intersináptico hay además otro enzima que se encarga de regular la concentración de ACh por degradación de la misma. La acetilcolinesterasa (AChE) degrada al neurotransmisor en colina y acetilo. La colina es recaptada por la neurona y el ciclo sináptico comienza de nuevo⁸.

Hipótesis excitotóxica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y de hecho el sistema glutamatérgico está implicado en los acontecimientos excitotóxicos que tienen lugar en otras muchas patologías neurodegenerativas. La excitotoxicidad es el proceso patológico por el cual las neuronas son dañadas y destruidas por las sobreactivaciones de receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato, como el “N-Methyl-D-aspartate receptor” (receptor NMDA) y el “ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor” (receptor AMPA). Las excitotoxinas como el NMDA y el ácido kaínico que se unen a estos receptores, así como altos niveles patológicos de glutamato, pueden provocar la excitotoxicidad al permitir que niveles elevados de iones de calcio⁹ entren en la célula. La entrada de Ca⁺⁺ en las células activa una serie de enzimas, incluyendo las fosfolipasas, las endonucleasas, y proteasas tales como la calpaína. Estas enzimas continúan dañando estructuras celulares como las que componen el citoesqueleto, la membrana y el ADN.

Daño oxidativo y procesos neuroinflamatorios

Otra de las hipótesis que intentan explicar la patogénesis de la EA es la hipótesis de los radicales libres. El daño producido por el exceso de las especies radicales se asocia a los procesos de envejecimiento y, en la EA, el daño oxidativo juega un papel importante ya que los radicales libres atacan a las neuronas produciendo la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, lo que se traduce en la muerte neuronal. En condiciones normales las especies reactivas de oxígeno (ERO) son controladas por una eficiente cascada de mecanismos de antioxidación, que incluye tanto la intervención de diferentes enzimas antioxidantes como de agentes antioxidantes no-enzimáticos. Sin embargo, durante los procesos neurodegenerativos se produce una descompensación entre la producción de los radicales libres y la defensa antioxidante celular, como consecuencia se producen fallos en diferentes funciones biológicas conduciendo a la muerte celular. Por otro lado, en cerebros de pacientes con EA se produce un gran número de factores neuroinflamatorios como inmunoproteínas y citoquinas generadas por neuronas, astrocitos y microglia. De manera que el daño oxidativo y la cascada neuroinflamatoria contribuyen de forma paralela a la patogénesis de esta enfermedad¹⁰.

Hipótesis proteína tau

Los NFT están formados por la hiperfosforilación de MAPT que forman agregados insolubles dentro del citoplasma de las neuronas. Estos agregados de la proteína tau hiperfosforilada se suelen agrupar como filamentos helicoidales emparejados (PHF), aunque pueden hacerlo de otras formas. La principal función de tau es promover la estabilidad de los microtúbulos (MTs), la presencia de NFT indica el fallo de las neuronas para mantener su citoesqueleto correctamente, el cual compromete el flujo axonal y contribuye en la disfunción sináptica y neurodegeneración. Hay evidencias de que la formación de pequeñas cantidades de NFTs son la consecuencia universal del envejecimiento, no obstante en la EA se observan grupos de neuronas que están preferentemente afectados por los ovillos. Son frecuentes en áreas del hipocampo relacionadas con el procesamiento de experiencias antes de su almacenamiento como recuerdos permanentes, lo cual está correlacionado con los déficits clínicos observados en las primeras etapas de EA en el aprendizaje, la creación de nuevos recuerdos y la preservación de recuerdos establecidos.

Hipótesis beta-amiloide

Los péptidos A β provienen de la escisión por secretasas de la proteína precursora amiloide (APP). En primer lugar esta proteína transmembrana sufre la acción de la β -secretasa que corta a APP por su dominio extracelular liberando un fragmento, posteriormente este fragmento es cortado por el complejo γ -secretasa. Los depósitos contienen una mezcla de varias isoformas de A β , las más comunes son el péptido A β 40 y el péptido A β 42, este último contiene dos aminoácidos de más (Ala y Ile) lo cual confiere mayor hidrofobicidad al péptido y mayor capacidad de oligomerizar y polimerizar que las demás isoformas. Esta hipótesis sugiere que los agregados de A β son el factor desencadenante de multitud de vías neurotóxicas, entre las que se pueden incluir excitotoxicidad, alteraciones en la homeostasis del calcio, producción masiva de radicales libres y procesos neuroinflamatorios.

Sin embargo, hoy en día no existe consenso acerca de cómo la deposición del amiloide lleva a la demencia y si los depósitos de A β son suficientes por sí sólo para causar la enfermedad. Los estudios de Alzheimer ya indicaban que las placas seniles se encontraban tanto en cerebros con la enfermedad como en los controles siempre que se tratara de ancianos, lo que sugería que tales placas podrían ser marcadores de senilidad más que de demencia. Además se ha visto que los pacientes pueden tolerar ciertos niveles de amiloidosis antes de presentar signos de alteraciones cognitivas.

Por otro lado, la formación de componentes del amiloide es común en el envejecimiento normal, y en casos muy raros se encuentran ovillos sin la presencia de amiloide, lo que sugiere que la presencia de A β es un evento previo a los NFTs. Sin embargo, es posible que ambos eventos celulares, aunque son fenómenos molecularmente independientes, lleven de forma complementaria a la pérdida de la actividad de las neuronas afectadas.

Bases moleculares de la formación de las placas seniles

Como se ha descrito antes, las características patológicas de la EA son la presencia de placas seniles extracelulares principalmente compuestas del péptido β -amiloide ($A\beta$), la aparición de ovillos neurofibrilares intracelulares constituidos por agregados hiperfosforilados de la proteína tau asociada a microtúbulos, la masiva pérdida neuronal y conectividad alterada. A pesar de estos claros cambios patológicos post-mortem, se sabe que las señales cognitivas y cambios cerebrales están ligeramente presentes antes del diagnóstico clínico, indicando una etapa 'pre-clínica' de la EA, en la que los individuos afectados sólo presentan cambios muy leves en la cognición a pesar de que el proceso de la enfermedad que está en curso. En esta fase pre-clínica, no hay muerte neuronal pero sí un déficit en la comunicación entre las neuronas. El signo clínico más temprano de la EA es la pérdida de la memoria episódica (dependiente del hipocampo) como resultado de cambios en la función sináptica más que en la pérdida neuronal. Este error sináptico es un evento temprano en la patogénesis que puede ser detectado en los pacientes con deterioro cognitivo leve. Las espinas dendríticas (protuberancias de las dendritas que realizan la sinapsis neuronal cuya plasticidad está implicada en el aprendizaje y la memoria) son los primeros elementos afectados en el deterioro cognitivo.

La EA es principalmente una patología esporádica aunque también son conocidas formas raras de tipo familiares con herencia autosómica dominante (EA familiar, EAF). La observación de que la presencia de una copia extra del cromosoma 21, que causa el Síndrome de Down, conduce a una demencia con neuropatología similar a EA, dirigió las sospechas hacia el cromosoma 21 como un posible locus responsable de la EAF. Posteriormente, en el gen que codifica la proteína precursora amiloide (APP) en el cromosoma 21, fue identificada la primera mutación responsable para EAF.

Más adelante fueron identificados otros dos genes como responsables de la EAF: la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1. Las mutaciones en estos tres genes son responsables de la mayoría de los casos familiares de aparición temprana de EA y numerosas mutaciones en la APP y en los genes PS1 y PS2 se han descrito en todo el mundo. La mutación en uno de estos genes conduce al desarrollo de la EA con una penetrancia cercana al 100%. Además de estos "genes EA", el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE) se ha identificado como un factor de riesgo o un gen de susceptibilidad de la EA. La apoE está involucrado en el metabolismo de lipoproteínas y la homeostasis del colesterol en el cerebro, y hay tres isoformas diferentes de la proteína (E2, E3 y E4), que son codificadas por tres alelos diferentes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, respectivamente. Los portadores del alelo $\epsilon 4$ de la apoE tienen un riesgo dosis-dependiente de desarrollar EA, por otra parte los individuos homocigotos para el alelo $\epsilon 4$ de la apoE generalmente desarrollarán EA antes de los individuos heterocigotos.

Un traumatismo en la cabeza también aumenta el riesgo de la EA. La influencia de la lesión cerebral traumática grave como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA parece ser mayor entre los sujetos que carecen del alelo apoE $\epsilon 4$. Además, los factores cardiovasculares, presentes durante la mediana edad (años antes de la aparición de la demencia), como la hipertensión, la hiperlipidemia y la diabetes se han identificado como factores de riesgo para desarrollar EA.

Además, varios estudios comentan la existencia de una relación entre el estilo de vida y la disminución de riesgo de EA¹¹. Una dieta saludable, el consumo moderado de vino, el placer por el conocimiento y el ejercicio cerebral se consideran protectores contra EA. Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) identificaron variantes en los loci de diferentes genes de susceptibilidad a la aparición tardía EA como CR1 (complement receptor 1), CLU (clusterin/apolipoprotein J), PICALM (phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein) y BIN1 (bridging integrator 1)¹². Recientemente, se han identificado otras variantes relacionadas con la aparición tardía EA: ABCA7 (ATP-binding cassette, subfamily A, member 7), MS4A6A/MS4A4E (membrane-spanning four-domain subfamily A), EPHA1 (ephrin type-A receptor 1), CD33 (myeloid cell surface antigen CD33) y CD2AP (CD2-associated protein)¹³. Estos estudios demuestran la complejidad de variantes genéticas implicadas en la susceptibilidad a EA e indican que la EA de aparición tardía es una enfermedad multifactorial compleja, en la que el estilo de vida, los factores ambientales, el envejecimiento y la variabilidad genética puede contribuir al proceso patológico.

Generación del péptido A β

En 1984 se secuenció el péptido de 4 kDa de masa molecular conocido como β -amiloide¹⁴, además los investigadores afirmaron que el péptido β -amiloide podría ser derivado de un precursor único¹⁴. Posteriormente, en 1987, se produjo el descubrimiento de la APP¹⁵. Como hemos mencionado antes, el gen APP está localizado en el cromosoma 21 y codifica una proteína transmembranal que contiene un dominio extracelular grande, un dominio transmembrana hidrófobo y un dominio intracelular corto. La APP se sintetiza en el retículo endoplásmico, modificada en el aparato de Golgi y finalmente transportada a la superficie celular a través de la vía secretora. También es endocitada a partir de la superficie celular y metabolizada en la vía endosomal/lisosomal. La APP incluye un grupo heterogéneo de polipéptidos que provienen del splicing alternativo, el cual produce tres isoformas principales de APP (695, 751 y 770 residuos), y una variedad de modificaciones post-traduccionales. Las isoformas de empalme de APP que contienen 751 o 770 aminoácidos se expresan ampliamente en las células no neuronales aunque también están presentes en las neuronas, en cambio, la isoforma de 695 aminoácidos ácido se expresa en grandes cantidades en las neuronas y en menor número en células no neuronales¹⁶.

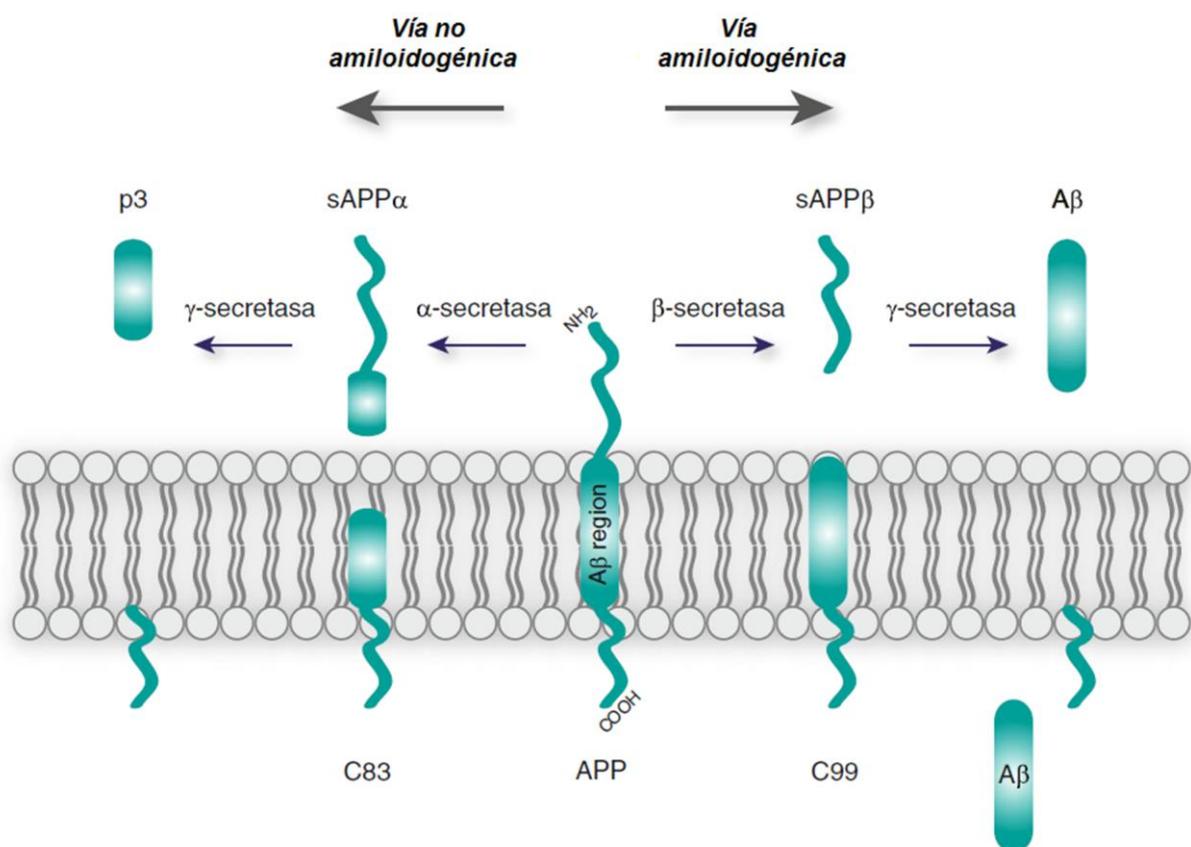


Figura 1: Representación esquemática del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). La proteína transmembrana APP es cortada secuencialmente por medio de dos vías distintas: la vía no amiloidogénica (izquierda) y la vía amiloidogénica (derecha). La primera escisión de APP por la α -secretasa en la región que contiene la secuencia A β impide la formación del péptido A β . Por el contrario, la escisión alternativa llevada a cabo por β -secretasa conduce a la liberación del péptido A β del después de la escisión γ -secretasa. (El tamaño de los elementos en el dibujo no está a escala). Ilustración extraída de Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. A β Toxicity in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2012; 45: 366–378

Como se ha descrito, la APP puede sufrir una variedad de escisiones proteolíticas llevadas a cabo por enzimas o complejos enzimático con actividad α -, β - y γ -secretasa (fig. 1), que da lugar a la secreción de fragmentos grandes y solubles y de “C-Terminal Fragments” (CTF) asociados a la membrana. Las enzimas con actividad α -secretasa pertenecen a la familia ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase enzyme family), la actividad β -secretasa se ha identificado en el “ β -site APP-Cleaving Enzyme 1” (BACE1, proteína integral de membrana de tipo I que pertenece a la familia de la pepsina de las aspartilproteasas) y γ -secretasa es un complejo enzimático compuesto de la presenilina 1 o 2 (PSEN1 o PSEN2), nicastrina (NCSTN), “Anterior Pharynx-defective 1” (APH-1) y “Presenilin Enhancer 2” (PSENEN-2), y actúa en residuos dentro del dominio transmembrana.

La APP se procesa preferentemente a través de la vía no amiloidogénica en la que la α -secretasa rompe la APP en el aminoácido 83 del extremo C-terminal, produciendo un CTF de 83 residuos retenido en la membrana y un fragmento N-terminal (sAPP) soluble y de gran tamaño liberado en el espacio extracelular. Posteriormente el CTF se divide por la γ -secretasa dando lugar a la producción de un fragmento corto llamado p3. En la vía no amiloidogénica de procesamiento de APP, la escisión α -secretasa se produce en la secuencia de A β , previniendo la formación de péptido A β . En la vía alternativa amiloidogénica, la primera división de APP se lleva a cabo por la β -secretasa en el aminoácido 99 del extremo C-terminal produciendo un CTF alternativo de 99 residuos (C99) retenido en la membrana y un fragmento (sAPP β) soluble liberado en el espacio extracelular. El fragmento C99 comienza en el residuo 1 de la región A β . La siguiente escisión por γ -secretasa conduce a la liberación del péptido A β . Como se ha dicho con anterioridad, la mayor parte de la A β producido es la variante de 40 residuos (A β 40), a pesar de que también se puede producir una forma más larga de 42 residuos (A β 42). Este último contiene dos aminoácidos de más (Ala y Ile) lo cual confiere mayor hidrofobicidad al péptido y mayor capacidad de oligomerizar y polimerizar que las demás isoformas, es la forma predominante que hay presente en las placas. El complejo γ -secretasa presenta su actividad catalítica en la presenilina, es por ello que las mutaciones de PSEN1 y PSEN2 del complejo γ -secretasa favorecen la formación de residuos residuos (A β 42).

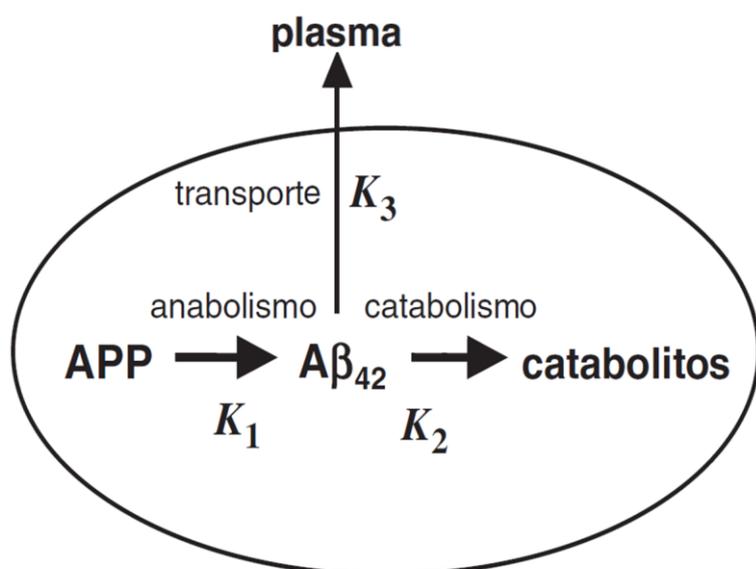


Figura 2: Relaciones cinéticas entre la producción, la degradación dentro del cerebro y el transporte fuera del cerebro. El estado de equilibrio del nivel A β (A β 42) en el cerebro, [A β] ([A β 42]), es principalmente una función del nivel de APP, [APP], y las constantes de velocidad de producción, [K1], de degradación en el cerebro, [K2] y del transporte fuera del cerebro, [K3]. Ilustración extraída de Saido T. Metabolism of amyloidOpeptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 89. 2013; 7: 321-339.

Los niveles del péptido A β es una consecuencia del equilibrio entre su síntesis y su degradación, en otras palabras, su anabolismo, su catabolismo y su transporte al torrente sanguíneo. Las relaciones cinéticas entre los tres procesos metabólicos de anabolismo, catabolismo y transporte al sistema circulatorio se esquematizan en la figura 2. K1, K2, y K3 son las constantes de velocidad para la producción, degradación y el transporte de A β fuera de cerebro, respectivamente. Suponiendo que la cinética de las reacciones pueden ser analizada linealmente, que estas constantes de velocidad son independientes entre sí, y que estos procesos existen en un equilibrio dinámico en estado estacionario^{17,18}, la relación entre las cantidades de A β 42 y APP, representado como [A β 42] y [APP], respectivamente, se puede expresar por la siguiente ecuación :

$$[A\beta 42] = K1 / (K2 + K3) \times [APP] \quad [1]$$

La fórmula [1] es coherente con los fenotipos de casi todas las mutaciones en los genes APP y PSEN1 que provocan la EA familiar. K1 es aproximadamente 1,5 veces mayor que en los controles normales, lo que significa que [A β 42] también es 1,5 veces mayor. Esto coincide con uno de los fenotipos del síndrome de Down causado por la trisomía del cromosoma 21, el cual lleva el gen de APP, de modo que [APP] es 1,5 veces mayor que en los controles normales y [A β 42] también se convierte en 1,5 veces mayor.

Por lo tanto, un aumento en la constante de velocidad para la producción de (K1) o una disminución en las constantes de velocidad de degradación (K2) y el transporte fuera del cerebro (K3) puede elevar [A β 42] y provocar la deposición patológica de A β . Esta lógica también indica que la regulación negativa de K1 o regulación positiva de K2 y K3 puede reducir la deposición de A β en el cerebro.

Ha habido una cierta discusión sobre la importancia relativa entre K2 (degradación) y K3 (transporte fuera del cerebro) en desaparición de A β ¹⁹. Si K2 es excesivamente superior a K3, la fórmula [1] tendería hacia $[A\beta_{42}] \approx K1/K2 \times [APP]$, mientras que, si K2 es excesivamente inferior a K3, sería $[A\beta_{42}] \approx K1/K3 \times [APP]$. Suponemos que las constantes de velocidad son tales que $K2 > K3$ y por lo tanto $[A\beta_{42}] \approx K1/K2 \times [APP]$. Las bases de este razonamiento son: (i) los cerebros son fuentes ricas en varias peptidasas que pueden proteolizar A β siempre que sean accesibles al sustrato; (ii) las cantidades de A β en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o plasma están poco correlacionados entre sí en los pacientes con EA, los niveles de A β en el cerebro son entre 1.000-10.000 veces mayor que en los cerebros normales y no parece existir un mecanismo de transporte que dependiente de la concentración expulse A β fuera de la cerebro; (iii) en caso de que la principal causa de la deposición de A β fuera la reducción en la eficiencia del transporte, se esperaría que la deposición de amiloide surja primero en el sistema circulatorio, pero la realidad suele ser al revés, sobre todo en los seres humanos; (iv) la función primaria de la proteólisis es el reciclaje de aminoácidos, desde un punto de vista metabólico es más económico (menor consumo de energía) la degradación en el propio cerebro que su transporte al torrente sanguíneo.

Las constantes de velocidad pueden verse afectadas por diferentes factores. Por ejemplo la activación de α -secretasas contribuye a reducir K1 puesto que su actividad corta la APP en el centro del péptido β -amiloide, mientras que el péptido A β normalmente es degradado por diferentes peptidasas como “Insulin-Degrading Enzyme” (IDE), “Angiotensin-Converting Enzyme” (ACE) y neprilisina que colaboran en el aumento de K2. Varios estudios moleculares y celulares en modelos de ratones transgénicos y en los pacientes con AD han demostrado que los niveles de las enzimas de degradación de A β disminuyen durante la progresión de la enfermedad²⁰. En conjunto, estos tres objetivos son potenciales para la intervención terapéutica destinadas a prevenir la acumulación de A β en la EA, no obstante es importante tener en cuenta que el procesamiento de APP y la consiguiente producción de A β es un proceso fisiológico y no patológico. Es sólo cuando los niveles de A β son excesivos que se inicia una condición patológica.

Papel fisiológico de A β en la función sináptica

La observación de que el cerebro de un paciente con EA se caracteriza por la deposición extracelular de agregados insolubles del péptido A β apoya la idea de que los procesos patológicos eran responsables de la producción de este péptido de 4 kDa. Hace casi 20 años, este concepto se ha extendido por la observación de que el péptido A β también se produce en su forma soluble en condiciones normales durante el metabolismo celular. Las diferentes especies de A β (A β 40 y A β 42) están presentes en niveles bajos en el cerebro durante la vida, lo que sugiere que en un estado saludable, A β desempeña funciones fisiológicas, que pueden ser diferentes cuantitativa o cualitativamente de sus efectos cuando los niveles están elevados durante condiciones de la enfermedad.

Estudios genéticos *in vivo* empleando modelos knock-outs y knock-in de la familia APP han demostrado el papel esencial de la familia APP para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso periférico y central. En particular, destaca el papel en la formación de sinapsis, la liberación de transmisores, la plasticidad sináptica y el comportamiento²¹. Además, varios estudios indican que el procesamiento de APP y la presencia del péptido A β están asociadas con la actividad sináptica. Los fármacos que promueven un incremento de la actividad neuronal aumentan la producción de A β (tanto A β 40 y A β 42), mientras que los tratamientos farmacológicos que disminuyen la actividad neuronal reducen la acumulación de A β . Dado que los altos niveles de A β pueden interrumpir la función sináptica, es interesante observar que el aumento de la actividad neuronal puede mejorar la producción de A β que, a su vez, deprime la función sináptica disminuyendo la actividad neuronal. En este contexto, el péptido A β podría tener una función de retroalimentación negativa para la prevención de la excitotoxicidad, es decir, podría prevenir la sobreactivación de receptores del neurotransmisor excitatorio de glutamato.

Como consecuencia de las funciones fisiológicas de A β , se ha demostrado que la inhibición de la producción de péptido A β induce la muerte celular. El tratamiento de células neuronales con inhibidores β - y γ -secretasa reduce la viabilidad celular, mientras que la coincubación de A β 40 evita la toxicidad de estos inhibidores, lo que indica que la neurotoxicidad está estrictamente ligada a la producción de A β . Es interesante la observación de que diferentes tipos de células no-neuronales no muestran efecto cuando están sometidas a los mismos tratamientos²².

En un trabajo reciente se demostró la importancia fisiológica de A β endógena para la plasticidad sináptica del hipocampo²³. Por medio de innovadoras técnicas bioquímicas (mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra A β de roedores) y genéticas (por siRNA dirigidos a la expresión de APP), los autores demostraron que se requiere A β endógeno para la inducción de la memoria (tanto la memoria de referencia como la memoria asociativa).

La alteración del procesamiento de APP y la Oligomerización de A β

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que las mutaciones en tres genes (APP, PS1 y PS2) pueden causar EA de inicio temprano (EOAD). El factor común de estas mutaciones es que cada uno de ellas afecta el metabolismo o la estabilidad de A β . La identificación de estas mutaciones permite la generación de modelos de ratones transgénicos de la EA, lo que ayuda a comprender la base molecular de la enfermedad.

Todas las mutaciones de APP observados en la EAF alteran el procesamiento fisiológico de APP, que conlleva a la sobreproducción del péptido tóxico A β 42. Una doble mutación común de APP (Lys670→Asn y Met671→Leu), conocida como la mutación Swedish (APP^{swe}), da lugar a un aumento de la escisión de APP por la β -secretasa. Esta doble mutación se encuentra antes de la región del péptido A β de APP y provoca una mayor producción y secreción de A β ²⁴. Se cree que la escisión de BACE1 ocurre principalmente en la red trans-Golgi y en las vesículas endosomales, en cambio, la escisión α -secretasa se produce en la superficie celular y en la red trans-Golgi. De este modo es en la red trans-Golgi donde la β -secretasa y la α -secretasa pueden competir directamente por el sustrato de APP. Si hubiese APP^{swe} en altos niveles dentro de la red trans-Golgi, la competencia entre las α - y β -secretasas podría causar un aumento en la generación de A β .

Otras mutaciones de APP, tales como la mutación Arctic (APP^{arc}, Glu693→Gly) aumentan la agregación de A β , dando lugar a un inicio precoz de formas agresivas de la enfermedad. Los portadores APP^{arc} reducen los niveles de A β 40 y A β 42 en el plasma y aumentan tasa de formación de protofibrillas A β , que puede acelerar la acumulación de A β insoluble²⁵. La mutación APP^{arc} está situada cerca del sitio de corte de la α -secretasa, sin embargo, ensayos enzimáticos *in vitro* demuestran que la mutación no perjudica la eficiencia de la escisión α -secretasa, sino que más bien parece reducir el acceso de la α -secretasa de APP. La localización alterada de APP^{arc} puede explicar el cambio entre las vías no amiloidogénica y amiloidogénica.

No sólo las mutaciones de APP provocan EA, sino también el aumento de la dosis del gen. La triplicación del cromosoma 21, de hecho, lleva a una acumulación temprana A β .

Además, las mutaciones de PSEN afectan el procesamiento de APP, causando un aumento de la producción de A β 42. Las presenilinas son proteínas de transmembrana que participan en varias vías de señalización y localizadas principalmente en el retículo endoplasmático y en las membranas de Golgi de las células neuronales y no neuronales. Las presenilinas desempeñan un papel crítico en la escisión γ -secretasa de APP, mutaciones en este gen aumentan la producción de A β 42.

La “hipótesis amiloide” iniciada por Glenner y Wong¹⁴ ha sido la teoría central de la patogénesis de la EA mediante la propuesta de que la acumulación de A β puede inducir la disfunción sináptica y la muerte celular neuronal. Los estudios de “genes EA” basados en modelos en animales han apoyado la “hipótesis amiloide”, lo que le confiere un papel principal a A β en el inicio de la cascada patogénica de la EA y sostiene que el proceso de la enfermedad neurodegenerativa es la consecuencia de un desequilibrio entre la generación y degradación de A β . Esta hipótesis está apoyada por muchos hallazgos en estudios genéticos, moleculares, bioquímicos y neuropatológicos²⁶. El apoyo principal para la “hipótesis amiloide” proviene de la evidencia de que la mayoría de las mutaciones de la EAF de aparición temprana dan lugar a un fenotipo bioquímico similar, que es un aumento de la relación A β 42/A β 40 (A β 42 es más propenso a formar fibrillas de amiloide y es una forma más tóxica del péptido). En este contexto, es importante destacar que mayor factor de riesgo conocido para la EA es la edad, que hace que el cerebro sea más vulnerable a la acumulación de A β . Por lo tanto, la disminución de la eliminación de residuos a causa de la edad, el deterioro progresivo de las funciones mitocondriales, junto con un aumento progresivo de los niveles de A β en regiones clave del cerebro son fundamentales en la iniciación de un proceso patológico que conduce a la disfunción y muerte de neuronas.

Las fibrillas A β pueden ser definidas como agregados de polipéptidos fibrilares con una estructura cross- β . Las estructuras cross- β representan el ensamblaje intermolecular del polipéptido, donde la estructura de lámina β y la cadena que conecta las distintas hojas β están orientados en paralelo al eje principal de fibrillas. De ello se deduce que las hojas β corren de forma perpendicular ("en cruz") a esta dirección. La presencia de una estructura cross- β común en todas las fibrillas de amiloide se demostró inicialmente por difracción de rayos X²⁷. Recientemente, los estudios de cristalografía de microcristales de péptidos revelaron las llamadas cremalleras estéricas²⁸ que se presupone que se producen en muchas fibrillas amiloides. Las unidades de cremallera estéricas consisten en un par de dos láminas de cross- β con interdigitación de cadenas laterales (fig. 3). Pueden estar formadas por varias cadenas de péptidos cortos (generalmente 4-7 aminoácidos), como los residuos de A β 37-42 o 35-40²⁸. Se sugirió que las cremalleras estéricas constituyen la columna vertebral estructural de las fibras amiloides.

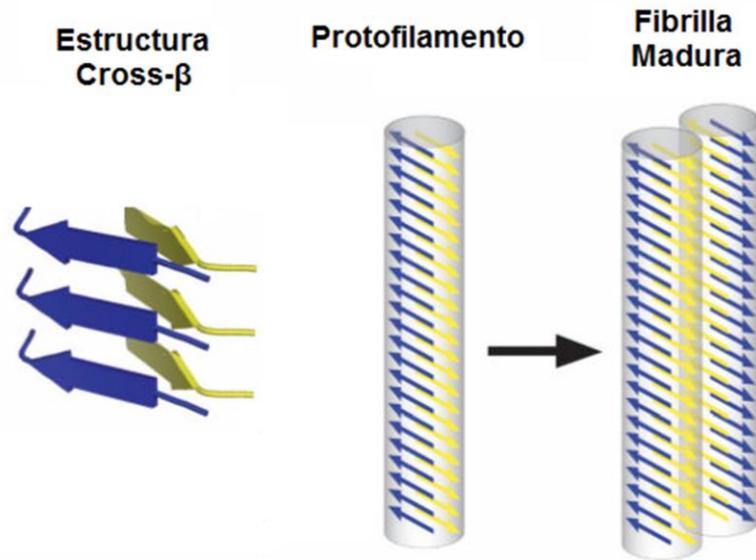


Figura 3: La estructura cross- β representada como un diagrama de cintas, esta estructura forma la columna vertebral estructural de un protofilamento amiloide. Uno o varios protofilamentos se unen mediante unidades de cremallera estéricas, formadas por los residuos de A β 37-42, para componer las fibrillas amiloides maduras. Ilustración extraída de Fändrich M, Schmidt M, Grigorieff N. Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures. Trends Biochem Sci. 2011; 36(6): 338-345.

Las fibrillas A β forman el núcleo de las placas amiloides densas dentro del parénquima cerebral, una de las características patológicas del cerebro con EA, o se acumulan en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales, dando lugar a una angiopatía amiloide cerebral (AAC). Como agregados fibrilares insolubles son neurotóxicos *in vivo* e *in vitro*, durante mucho tiempo se ha planteado la hipótesis de que las fibrillas causan la neurodegeneración en la EA. Sin embargo, el número de placas y los niveles de A β insolubles pobremente se correlacionan con la extensión local de la muerte neuronal y la pérdida sináptica, o con el deterioro cognitivo. Por otro lado, los niveles de oligómeros A β solubles parecen correlacionarse fuertemente con progresión de la enfermedad en modelos animales y sujetos con EA. Se cree que los intermedios de fibrilación, más que las fibrillas A β , son las que participan en la aparición de la enfermedad.

Dianas de A β

La caracterización de los mecanismos moleculares por los cuales A β deteriora la función sináptica y contribuye al deterioro progresivo de la sinapsis, es un campo fascinante que ha crecido en las últimas décadas. Importantes investigaciones demuestran que A β se acumula en la sinapsis, que conduce a una toxicidad sináptica progresiva y al trastorno de la red neuronal.

A β y los Canales Iónicos

Las complejas relaciones entre A β y la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica se han demostrado durante la progresión de la EA. Sistemas de glutamato y acetilcolina parecen estar implicados en la EA, puesto que los receptores de acetilcolina $\alpha 7$ -, $\alpha 4$ -nACh ($\alpha 7$ -, $\alpha 4$ -nAChRs), y los receptores de glutamato AMPA y NMDA, (AMPArs y NMDARs, respectivamente) son ampliamente expresado en el neocórtex y el hipocampo, las regiones clave del cerebro que regulan la función de la memoria.

En particular, los déficits neocorticales de la colina acetiltransferasa llevaron a postular la “hipótesis colinérgica”⁸. Esta hipótesis ha sido apoyada por correlaciones positivas entre la expresión de las subunidades $\alpha 7$ -y $\alpha 4$ -nAChR y la acumulación intracelular de A β , y por la colocalización de $\alpha 7$ -nAChR con placas. Además de estas observaciones morfológicas, se ha demostrado que el A β se une a $\alpha 7$ -nAChR en preparaciones de membranas sinápticas corticales y del hipocampo, y esta interacción conduce a la inhibición de la liberación de acetilcolina y el flujo de calcio provocando la desaparición neuronal²⁹.

Hallazgos similares han sido demostrados en el sistema glutamatérgico. El receptor de NMDA es altamente permeable al Ca²⁺ y los oligómeros A β desencadenan un aumento de flujo de Ca²⁺, lo cual interrumpe la transmisión neuronal. El flujo de calcio estimulado provoca la activación de la calcineurina que, a su vez, activa la “Striatal-Enriched Phosphatase” (STEP). STEP es una fosfatasa que desfosforila la subunidad NR2B del NMDAR y provoca la endocitosis del receptor. Recientemente, se ha demostrado que STEP también está implicada en la desfosforilación y la internalización de las subunidades GluR1 y GluR2 de AMPAR cuando aumentan los niveles de A β ³⁰. En uno de estos estudios realizados en un modelo de ratón de la AD, se ha demostrado que la eliminación sináptica de AMPAR juega un papel clave en la disfunción sináptica inducida por A β ³¹. Se ha observado que A β conduce a una activación sináptica de la caspasa 3, una proteasa que activa la calcineurina, esta a su vez activa la STEP, la cual desfosforila subunidad GluR1 de AMPARs, provocando su eliminación de los sitios postsinápticos.

Esta modificación postsináptica debido a la eliminación de NMDAR o AMPAR es un evento crucial que causa una reducción de receptores ionotrópicos de glutamato provocando la disminución de la LTP (mediada por NMDAR) o a un aumento de LTD (mediada por AMPAR). La long-term potentiation o LTP es una intensificación duradera en la transmisión de señales entre dos neuronas que resulta de la estimulación sincrónica de ambas, en cambio, la long-term depression o LTD es una reducción en la eficacia de la sinapsis neuronal. Se ha demostrado que estas modificaciones actuales conducen a un deterioro de la plasticidad sináptica y a una degeneración progresiva de las sinapsis.

A β y mitocondrias

Las mitocondrias desempeñan un papel crítico en el metabolismo del cerebro, y la disfunción mitocondrial está implicada en muchas enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA, como se ha demostrado en líneas celulares que expresan mutantes de APP, en células tratadas con A β , en modelos transgénicos de EA en ratón y en los cerebros postmortem de pacientes con EA³². La observación de que A β está presente dentro de las mitocondrias, principalmente en las crestas, ha proporcionado un vínculo directo entre la acumulación de A β y la disfunción mitocondrial en EA (fig. 4). Estudios posteriores demostraron los mecanismos mediante los que la acumulación de A β provoca la disfunción mitocondrial.

En primer lugar, se han estudiado las proteínas estructurales de las mitocondrias en cerebros postmortem de pacientes con EA en diferentes etapas de la progresión de la enfermedad y en los sujetos de control³³. Es de destacar que el A β intraneuronal está presente en todas las etapas de EA (temprana, moderada y grave), mientras que los depósitos de A β son abundantes sólo en etapas posteriores de la enfermedad (moderada y grave). “Dynamin-Related Protein 1” (DRP1), una proteína presente sobretodo en el citoplasma que se localiza en la membrana externa mitocondrial para promover la fragmentación mitocondrial, interactúa con monómeros y oligómeros de A β en sujetos con EA, y esta interacción aumenta con la progresión de la enfermedad. Esta observación sugiere que la interacción entre A β y Drp1, posiblemente, puede iniciar la fragmentación mitocondrial en las neuronas, dañar la estructura y la función mitocondrial y que conduce a la disfunción neuronal en cerebros con AD³³. También se ha observado una interacción entre A β y ciclofilina D, un marcador de la matriz mitocondrial, que da lugar a una alteración en la expresión de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial. En particular, el análisis de la expresión de genes (en forma de ARNm y los niveles de proteína) en las neuronas primarias de ratones transgénicos revela un desequilibrio en las proteínas de fisión y la fusión mitocondrial (unión y división mitocondrial) que predicen un aumento en la fisión mitocondrial³⁴.

En segundo lugar, estudios morfológicos y bioquímicos demostraron que cuando A β se asocia con las mitocondrias disminuyen los niveles de consumo de oxígeno y se reduce la actividad enzimática en los complejos respiratorios III y IV a causa de la liberación de citocromo C al citoplasma³⁵.

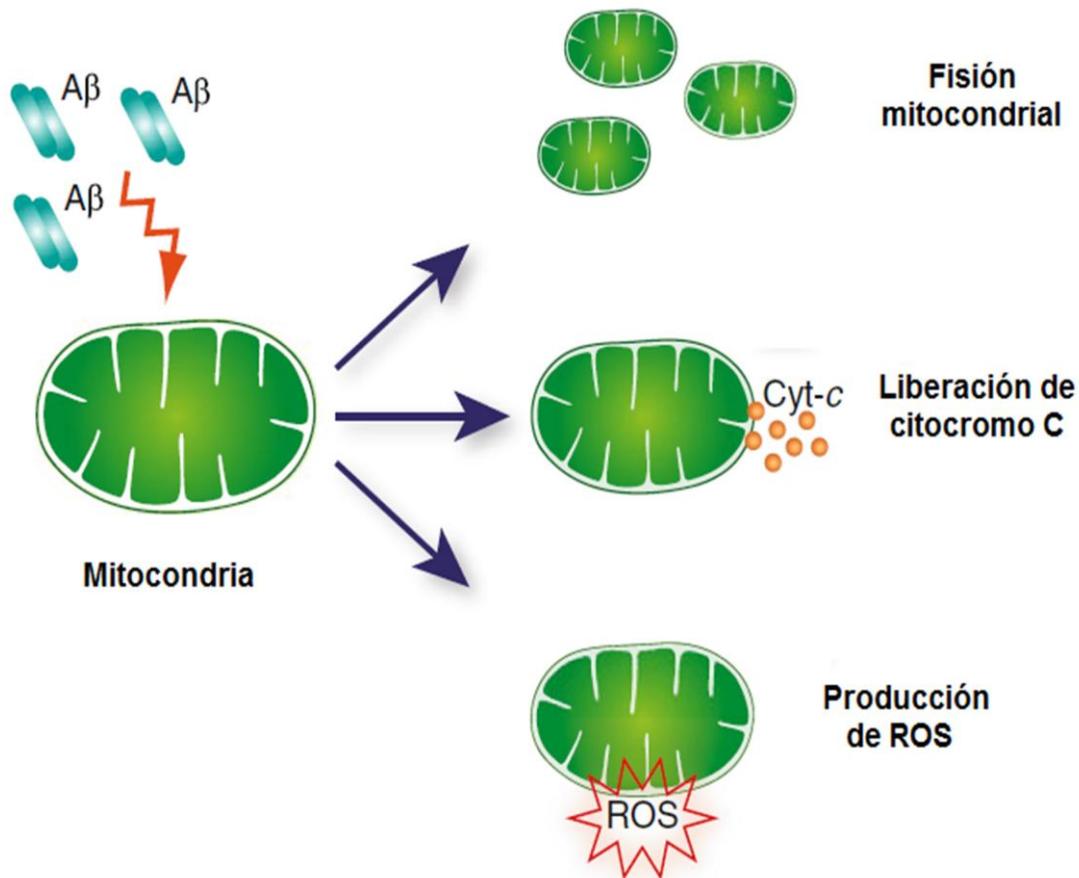


Figura 4: **Toxicidad de Aβ mitocondrial.** Los péptidos Aβ inducen la disfunción mitocondrial mediante distintas vías. Alterando el equilibrio de fisión/fusión, liberando citocromo c (Cyt c) en el citosol y promoviendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ilustración extraída de Cavallucci V, D'Amelio M, Cecconi F. Aβ Toxicity in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2012; 45: 366–378.

Además, se ha visto que el daño oxidativo (medido como inmunoreactividad a 8-OHG) en la corteza cerebral depende del envejecimiento en ratones de tipo salvaje, mientras que en ratones transgénicos depende de la acumulación de derivados de APP mutante. Y que los niveles de peróxido de hidrógeno son más altos en las mitocondrias de ratones transgénicos en comparación con los ratones de tipo salvaje de la misma edad. De este modo, el aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno se correlaciona directamente con Aβ solubles, lo que sugiere una relación entre la acumulación de Aβ solubles y la producción de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias³⁶.

En lo que respecta a la dinámica mitocondrial se ha investigado en células que sobreexpresan la mutación Swedish de APP (APP^{swe}) y las de APP tipo salvaje (APP^{wt})³⁷. Las células mutantes muestran alteraciones en la morfología y distribución mitocondrial en comparación con las células control, en particular, las mitocondrias de células de control se distribuyen uniformemente por todo el citoplasma (>95% de células), mientras que las células APP^{swe} tienen una alteración en la distribución de las mitocondrias, que se acumulan alrededor de la zona perinuclear y no están presentes de forma homogénea en el citoplasma (ocurre en el 30-50% de células). En cuanto a la morfología, la mayoría de las células control (>95%) exhiben mitocondrias tubulares normales, mientras que las células APP^{swe} muestran una estructura fragmentada puntiforme de las mitocondrias (40-60%). Los autores observaron una correlación positiva significativa entre los niveles de Aβ en el medio y el porcentaje de células con una distribución y morfología anormal de mitocondrias. En consecuencia, el tratamiento con inhibidor de BACE IV (que es capaz de prevenir la producción de Aβ sin afectar a la expresión de APP) impide de manera eficiente las anomalías mitocondriales³⁷.

La acumulación de A β en las mitocondrias sinápticas muestra alteraciones patológicas y funcionales tales como, una disminución en la respiración mitocondrial, una reducción de la actividad en enzimas clave de la cadena respiratoria, un elevado estrés oxidativo y una utilización del calcio comprometida. Estas alteraciones en las mitocondrias sinápticas ocurren mucho antes que los daños en las mitocondrias no sinápticas de los ratones transgénicos y que en las mitocondrias sinápticas de los ratones salvajes, lo que sugiere que las mitocondrias sinápticas son más susceptibles a la lesión inducida por A β y que el estrés mitocondrial sináptico podría ser una alteración patológica temprana en la EA. Además, se ha demostrado recientemente que la vía intrínseca de la apoptosis mitocondrial es responsable de la activación local de la caspasa 3 en las espinas dendríticas del hipocampo de ratones transgénicos. La activación sináptica de la caspasa 3 es responsable de la disfunción sináptica temprana. De hecho, la caspasa 3 sináptica no causa la muerte de las células neuronales, pero activa la calcineurina fosfatasa en las espinas dendríticas. Los cambios moleculares postsinápticos producidos por la caspasa 3 provocan alteraciones de la transmisión sináptica basal, incremento del LTD, la degeneración de la espina dendrítica y el deterioro conductual. Los cuales son eventos tempranos de la EA, esto sugiere el deterioro mitocondrial como marcador para la detección de la enfermedad antes de que alcance su estado patológico y es interesante dirigir dianas terapéuticas a este punto.

Bases moleculares de la formación de los ovillos neurofibrilares

La proteína MAPT se encuentra anormalmente hiperfosforilada en los cerebros de pacientes con EA, en esta forma, es la mayor subunidad proteica de los “Straight Filaments” (SFs), “Paired Helical Filaments” (PHFs), “Twisted Ribbons” (TRs) u otras conformaciones que darán lugar a los “Neurofibrillary Tangles” (NFTs), “Neuropil Threads” (NTs) o “Dystrophic Neurites” (DNs), que son las lesiones clave en el diagnóstico del sistema nervioso central³⁸. La función de estas lesiones específicas en las diferentes etapas de la EA aún no se comprende completamente, no obstante, es cada vez más evidente que la neurodegeneración mediada por MAPT puede resultar de la combinación entre la ganancia de función tóxica adquirida por los agregados o sus precursores y los efectos perjudiciales que surgen de la pérdida de la función normal de tau en el estado de la enfermedad. Descubrir el papel exacto de los diferentes agregados y sus precursores en la neurodegeneración es una tarea difícil, pero es probable que siga siendo el objetivo de las investigaciones futuras para descubrir los mecanismos de la patología de la enfermedad, así como para desarrollar mejores diagnósticos y terapéuticos.

Hasta el momento, varias líneas de investigación han sugerido diferentes relaciones de causa y efecto entre las proteínas patológicas de la enfermedad y los agregados que se forman. Estas diferencias reflejan las limitaciones inherentes a cada uno de los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se utilizan para estudiar las tauopatías neurodegenerativas. Por ejemplo, las especies neurotóxicas que contribuyen a la aparición y la progresión de la enfermedad pueden estar “escondidos” en las fases previas al agregado de proteínas, de este modo se complica el diseño experimental y la interpretación de los resultados. Además, aparte de su conocido papel en la promoción de la estabilización de los microtúbulos (MTs), tau puede tener funciones adicionales como resultado de sus interacciones con otras estructuras y enzimas³⁸ (por ejemplo, con la membrana plasmática, la actina del citoesqueleto y con Src tirosina quinasas como Fyn). Estas interacciones y funciones de tau dificultan la comprensión de cómo provoca la neurodegeneración. Por último, se ha visto que el inicio de la enfermedad y la progresión son procesos dinámicos que tienen lugar con el paso del tiempo (a menudo más de varios años), procesos como la agregación alterada de tau puede producir una amplia variedad de efectos diferentes en las distintas etapas de la enfermedad.

Las funciones fisiológicas de tau

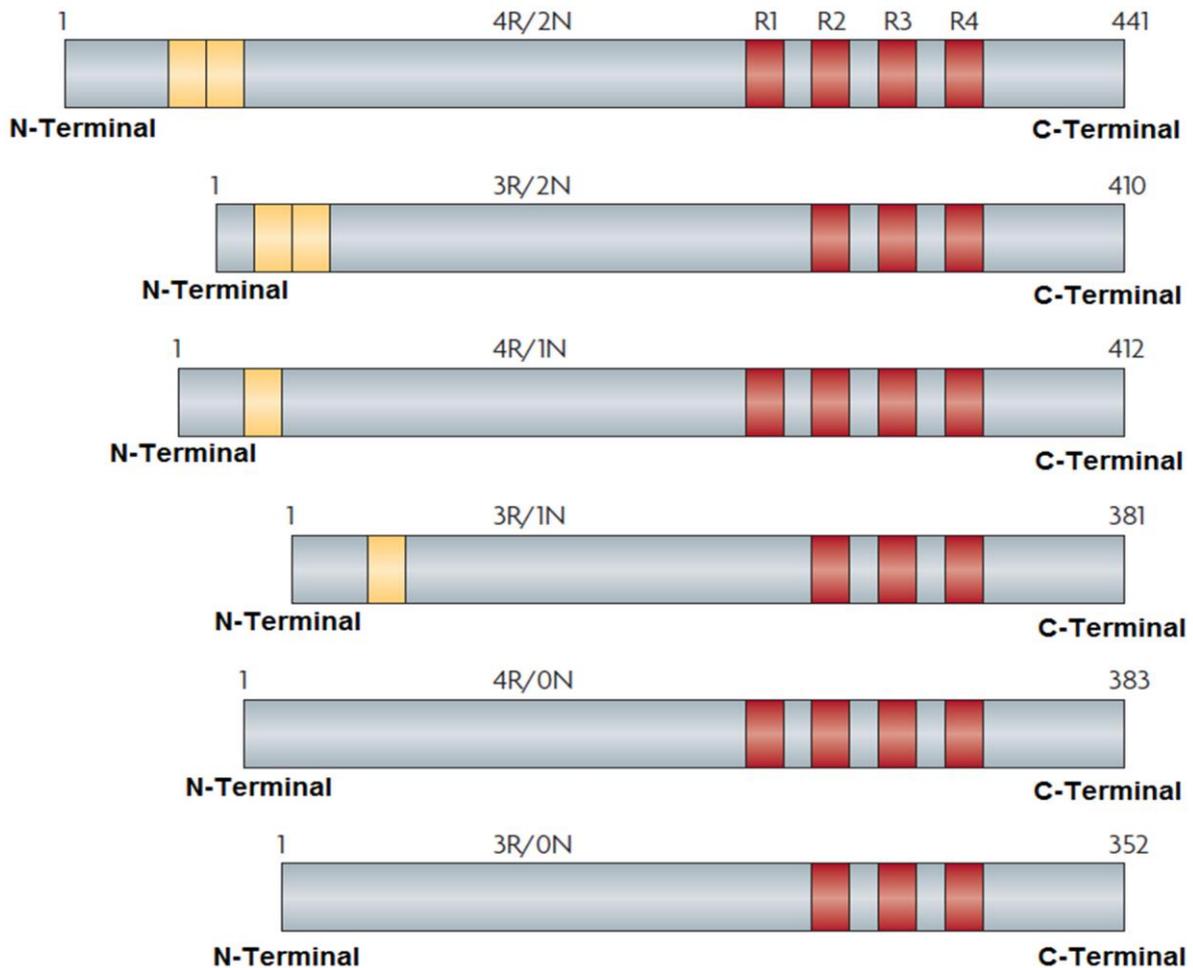


Figura 5: La estructura de los dominios de las isoformas de tau expresadas en el cerebro humano adulto. Las isoformas pueden diferir unas de otras en el número de dominios de unión a tubulina (tres o cuatro repeticiones situadas en la mitad C-terminal de la proteína, representadas en rojo), y se las conoce como isoformas 3R o 4R, respectivamente. También pueden diferir en la presencia o ausencia de uno o dos insertos de 29 aminoácidos altamente ácidos (representados en amarillo) en la parte N-terminal de la proteína (el dominio de proyección). Entre el dominio de proyección y el dominio de unión a microtúbulos se encuentra una región básica rica en prolina. Ilustración extraída de Ballatore C, Lee V.M, Trojanowski J.Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuroscience*. 2007; 8: 663-672.

Recordamos que Tau es el principal microtubulo asociado a proteínas (MAP) en las neuronas, los otros dos MAPs conocidos en las neuronas son MAP1 y MAP2. La función principal de MAPT es estabilizar los MTs. Como se resume en la figura 5, hay seis isoformas de tau expresadas en el cerebro humano adulto, expresadas a partir de un único gen del cromosoma 17 mediante splicing alternativo. Desde un punto de vista estructural, tau se caracteriza por la presencia de un dominio de unión a MT, que está compuesto por repeticiones de una región altamente conservada de unión a la tubulina y que comprende del extremo carboxiterminal (C-terminal) hasta la mitad de la proteína. Seguidamente una zona rica en prolina que confieren carácter básico y una zona aminoterminal (N-terminal) de carácter ácido que normalmente se conoce como el “dominio de proyección”. Las seis isoformas de tau difieren unos de otros en el número de repeticiones de 31-32 aminoácidos de la región de unión a tubulina (las isoformas se denominan como isoformas 3R y 4R de tau, respectivamente) y en la presencia o ausencia de uno o dos insertos de 29 aminoácidos en la zona N-terminal de la proteína, las cuales no participan en la unión a MT³⁹. Aunque las seis isoformas parecen ser funcionalmente similares, es probable que cada una tenga un papel fisiológico preciso y distintivo. Las distintas isoformas parecen ser expresadas diferencialmente durante el desarrollo, sin embargo, las isoformas de tau 3R y 4R se expresan en una relación 1:1 en la mayoría de regiones del cerebro adulto, y las desviaciones de esta relación son característicos de tauopatías neurodegenerativas⁴⁰.

Varias líneas de investigación sugieren un modelo en el que las regiones repetidas de unión a la tubulina se unen a los bolsillos específicos de β -tubulina en la superficie interior de los MTs, las regiones ricas en prolina cargadas positivamente están estrechamente ligados al MT de superficie que está cargado negativamente, y el dominio de proyección cargado negativamente ramifica de la superficie del MT, posiblemente debido a repulsiones electrostáticas. A pesar de que la ocupación de los bolsillos por tau parece ser suficiente para las conformaciones de tubulina que promueven el estado polimerizado, se cree que los bolsillos de tubulina de protofilamentos adyacentes pueden ser ocupados por diferentes repeticiones del dominio de unión a MT de tau causando el entrecruzamiento de tres o cuatro dímeros⁴¹. Además, las interacciones de la región rica en prolina de tau con la superficie de los MTs contribuyen a la estabilización de MT.

Curiosamente, aunque la función principal del dominio de unión a MT de tau es la estabilización de los MT, diversas líneas de investigación han indicado que también puede relacionarse con otras estructuras y enzimas, incluyendo RNA y la presenilina 1 (PSEN1). Del mismo modo, se han propuesto posibles parejas de unión para las regiones ricas en prolina y para los dominios de proyección. Los dominios SH3 de las tirosina quinasas de la familia Src (como por ejemplo Fyn) interactúan con las regiones ricas en prolina, mientras que los dominios de proyección interactúan con la membrana plasmática. Aunque la importancia de las interacciones específicas de tau con otras estructuras a parte de los MTs todavía no se conoce en el contexto de la neurodegeneración mediada por tau, colectivamente estos hallazgos apoyan la noción de que tau podría ser un aglutinante que es propenso a interacciones heterogéneas, particularmente cuando se desengancha del MT, que puede llevar a un mal plegamiento de proteínas y una agregación de las mismas⁴².

La capacidad de unión a MT de tau es post-traduccionalmente regulada principalmente por la fosforilación de serina/treonina quinasas (fig. 6), que pueden modular de manera efectiva la afinidad de unión de tau para MTs⁴³. Este se cree que es el mecanismo más importante que regula la afinidad de tau para los MTs⁴³, puesto que la hiperfosforilación de tau es observada en la neurodegeneración mediada por tau. Aparte de fosforilación, otras modificaciones post-traduccionales como glicosilación, glicación, ubiquitinación, sumolización, nitración y proteólisis también pueden tener un impacto directo sobre el equilibrio dinámico de tau dentro y fuera de los MTs. Aunque es conocido que la mayoría de estas modificaciones post-traduccionales puede tener lugar en varias etapas de la patología tau, su importancia, sobre todo en comparación con el papel bien establecido de la fosforilación, aún no se ha caracterizado completamente.

Con su capacidad para modular la dinámica del MT, tau contribuye directa o indirectamente a las funciones celulares estructurales y reguladoras. Por ejemplo, la acción de tau en la red de MT tiene gran importancia en el mantenimiento de una morfología apropiada de las neuronas, los procesos que realizan se extienden sobre distancias relativamente grandes, lo que convierte a las neuronas más en el tipo celular más asimétrico de todas las células. Por otra parte, la red de MT es clave para la sofisticada maquinaria de transporte (fig. 6) que permite viajar a lo largo de los axones (transporte axonal) a las moléculas de señalización, factores tróficos y otros constituyentes celulares esenciales, incluyendo orgánulos (por ejemplo, las mitocondrias y vesículas). Entonces tau tiene claramente efectos en el transporte axonal y, por lo tanto, en la función y viabilidad de las neuronas⁴⁴. Es importante destacar que, en condiciones fisiológicas normales, tau se encuentra en un equilibrio dinámico constante, dentro y fuera de las MTs. Este equilibrio se piensa que es controlado principalmente por el estado de fosforilación de tau, que a su vez está determinado por las acciones de quinasas y fosfatasas. De hecho, pueden ser necesarios frecuentes ciclos de unión y separación de tau a los MTs (correspondiente a fosforilaciones y desfosforilaciones, respectivamente) para permitir el transporte axonal eficaz (fig. 6).

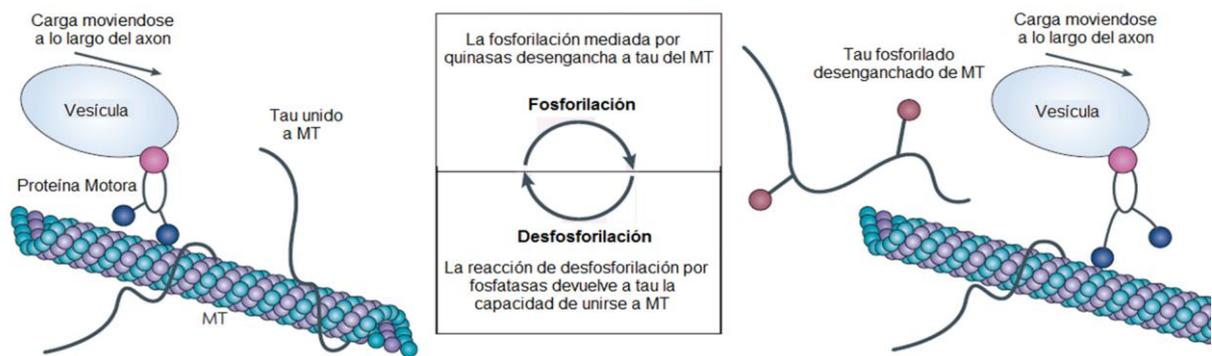


Figura 6: **El equilibrio dinámico de la unión de tau a microtúbulos (MT).** Una representación esquemática del equilibrio dinámico normal de tau, unido o no al MT, principalmente determinado por el estado de fosforilación de tau. Aunque la presencia de tau en los MTs presenta un obstáculo físico para las vesículas y otras cargas que se mueven a lo largo del axón, la unión de tau al MT es esencial para la integridad de MT. Por lo tanto, los ciclos relativamente frecuentes de unión tau-MT (promovidos por desfosforilación de tau) y el desprendimiento de la tau de la MT (promovido por la fosforilación de tau) son necesarios para mantener el transporte axonal eficaz. Ilustración extraída de Ballatore C, Lee V.M, Trojanowski J.Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuroscience*. 2007; 8: 663-672.

Agregación patológica de tau

En condiciones patológicas, el equilibrio de la unión de tau a los MTs se altera, lo que resulta en un aumento anormal en los niveles de la fracción de tau libre (no unido). Mayores concentraciones citosólicas de tau aumentan las posibilidades de cambios conformacionales patógenos que a su vez conducen a la agregación y la fibrilización de tau. En los últimos años se han conseguido importantes avances en la comprensión del mal plegamiento de tau y la formación de fibrilla. Se cree el paso de una unión normal de tau a los MTs al paso de la formación de grandes agregados como NFT es un fenómeno de múltiples etapas que comienza con el desprendimiento de tau de los MTs.

Tau tiene largos tramos con carga positiva o negativa que dificultan las interacciones hidrofóbicas intermoleculares. La estructura β en tau se concentra solo en las repeticiones R2 y R3, que pueden autoensamblarse en filamentos. Las zonas flanqueantes aminoterminal y carboxiterninal de las repeticiones de unión a microtúbulos parece que inhiben el autoensamblamiento a filamentos en la proteína tau normal, en cambio, la hiperfosforilación de tau puede fosforilar las zonas flanqueantes aminoterminal y carboxiterninal eliminando la inhibición y resultando en la formación de pretangles de PHF/SF (fig. 7).

En resumen, cuando se produce una liberación anormal de tau del MTs, producida por un exceso de fosforilación en la proteína, la concentración citosólica de tau libre se eleva. A continuación, se forman pequeños depósitos de tau no-fibrilar (normalmente denominados "pretangles"), y éstos se autoensamblan para formar NFTs.

Cabe destacar que estudios *in vitro* que efectúan la desfosforilación de PHFs o NFTs aislados de cerebros con EA resulta en su disociación y disgregación, dando lugar a la liberación de tau desfosforilada que se comporta como una proteína tau normal que promueve el ensamblaje de los microtúbulos⁴⁵. Del mismo modo, la desfosforilación de tau citosólica hiperfosforilada de pacientes con EA utilizando la fosfatasa PP-2A inhibe la capacidad de autoensamblarse en PHF/SF.

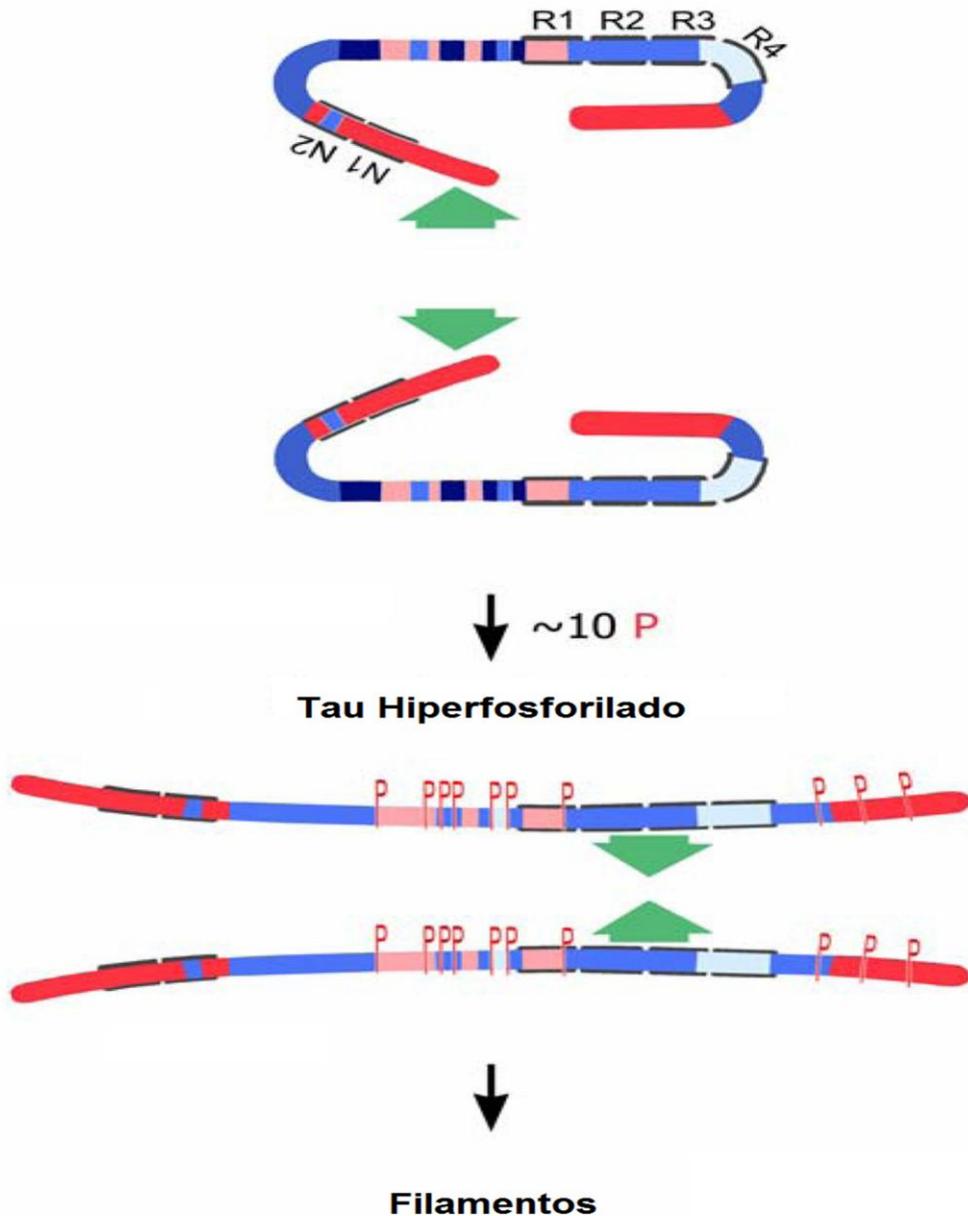


Figura 7: Esquema hipotético de la auto-ensamblaje de tau inducido por fosforilación. La proteína tau se auto-ensambla principalmente a través del dominio de unión a microtúbulos. No obstante, las regiones N-terminal y C-terminal inhiben el proceso, pero la hiperfosforilación de tau neutraliza estos dominios inhibitorios permitiendo la interacción tau-tau (la fosforilación se produce en los sitios indicados por las P en rojo). De este modo, las proteínas tau adoptan la conformación necesaria para polimerizar en filamentos. Ilustración extraída de Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso A, Grundke I. Mechanism of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2009; 118(1): 53–69.

Las causas de anomalías de tau en la enfermedad

Se cree que varios eventos patogénicos pueden contribuir, ya sea directa o indirectamente, a la hiperfosforilación de tau, mal plegamiento y la agregación. Mutaciones del gen tau (*MAPT*) pueden dar lugar a la expresión de mutantes tau con mayor predisposición para ensamblarse en filamentos dando lugar a una rápida fibrilación, mutantes con mayor facilidad para fosforilarse o menos propensos a la desfosforilación, o mutantes que muestran un deterioro en las propiedades de unión a MT. Además, las mutaciones *MAPT* pueden alterar el splicing alternativo de tau para perturbar la relación normal 1:1 de las isoformas 3R y 4R, provocando la sobreproducción de la isoforma 4R. Estos estudios genéticos proporcionan evidencia inequívoca de que el mal funcionamiento de tau es suficiente para desencadenar la neurodegeneración y la demencia.

Existe una relación causa y efecto entre el mal funcionamiento de tau y un desequilibrio en los niveles de actividad o la regulación de las quinasas y fosfatasa de tau. En condiciones fisiológicas, las moléculas de tau son fosforiladas en un pequeño grupo de aminoácidos de entre todos los que tienen capacidad de aceptar fosfatos. Durante la etapa tardía de la EA, el estado de fosforilación de una sola molécula de tau puede alcanzar niveles tan altos que la mayoría de residuos con capacidad de aceptar fosfatos son fosforilados y, al mismo tiempo, una mayor proporción de moléculas de tau están en este estado hiperfosforilada. Se ha visto que tau normalmente contiene 2-3 moles de fosfato/mol de proteína, en cambio, durante la EA la proporción se convierte de tres a cuatro veces mayor^{46,47}.

Aunque se han encontrado varias quinasas capaces de fosforilar a tau *in vitro*, todavía no está claro si todas ellas participan en la fosforilación de tau en condiciones fisiológicas o patológicas *in vivo*. No obstante, la “Glycogen Synthase Kinase 3” (GSK3), la “Cyclin-Dependent Kinase 5” (CDK5), la “Protein Kinase A” (PKA), el “Microtubule-Affinity-Regulating Kinase” (MARK), la “Calmodulin-dependent protein kinase-II” (CaMKII), la “Casein Kinase-1” (CK-1) y las “Stress-Activated Protein Kinases” (SAPKs) son las más implicadas en la hiperfosforilación anormal de tau, y han recibido una atención especial como posibles objetivos para las terapias modificadoras de la enfermedad utilizando compuestos inhibidores. La fosforilación de tau se produce principalmente en la región rica en prolina, la GSK3 y la CDK5 fosforilan tau en una gran cantidad de sitios, la mayoría de los cuales son comunes para ambas enzimas. La expresión de GSK3 y CDK5 es muy alta en el cerebro y ambas enzimas están asociadas a todas las etapas de la patología neurofibrilar de la EA. Estudios de inhibición demuestran que la inhibición de GSK3 utilizando litio no sólo reduce la fosforilación de tau *in vivo*, sino que también reduce el nivel de tau agregado en comparación con los controles⁴⁸. Además, los efectos del litio en ratones transgénicos de AD muestran una reducción en la producción de A β , posiblemente como resultado de la inhibición de GSK3, que se requiere para el procesamiento de APP⁴⁹.

Del mismo modo, se han identificado las proteínas fosfatasa PP1, PP2A, PP2B y PP2C, que podrían conducir a la desfosforilación de tau. Las actividades de PP2A y PP1 se reducen al 20% en cerebros con EA. En los cerebros de mamíferos adultos la desfosforilación de tau esta principalmente regulada por la concentración de PP2A, esta fosfatasa representa el 70% de la actividad fosfatasa en los cerebros humanos. La PP2A también regula la actividad de varias tau quinasas en el cerebro, su inhibición con ácido ocadaico en cultivos celulares provoca la hiperfosforilación de tau en los mismos sitios que en la EA, no solo directamente por el decrecimiento en la desfosforilación sino indirectamente por la promoción de las actividades CaMKII, PKA y de otras quinasas. Entonces es posible inhibir la hiperfosforilación de tau mediante la inhibición de la actividad de una o más quinasas de tau o mediante la recuperación o el aumento de la actividad de PP2A.

El efecto general del aumento de la velocidad de fosforilación y el aumento del estado de fosforilación parece ser la liberación anormal de tau de los MTs. Además, es probable que otros eventos patológicos, incluyendo la toxicidad causada por A β , el estrés oxidativo y la inflamación, puedan provocar o contribuir (de forma independiente o en combinación) a una liberación anormal de tau de los MTs. Por ejemplo, se ha sugerido que el estrés oxidativo podría ser responsable de las modificaciones covalentes perjudiciales de tau, que incluyen la formación de puentes disulfuro y la nitración de tirosina. Estas modificaciones son propensas a causar mal plegamiento, hiperfosforilación y agregación, y por lo tanto contribuir a la retirada anormal de tau de los MTs, así como a la formación de agregados. Sin embargo, a pesar de la clara implicación de estos procesos patológicos en la neurodegeneración mediada por tau, su posición relativa en la cascada de eventos que conduce a la pérdida neuronal aún no está clara. Por ejemplo, aunque el estrés oxidativo es a menudo considerado como un evento previo a la patología tau, estudios recientes han revelado que la presencia patológica de tau puede interferir con la función mitocondrial e inducir estrés oxidativo⁵⁰. Esto plantea la posibilidad de que, aunque el estrés oxidativo es probable que sea un evento relativamente temprano que podría desencadenar un mal funcionamiento de tau, es igualmente posible que el mal funcionamiento de tau, una vez iniciado, pueda agravar aún más los efectos del estrés oxidativo y de otros eventos previos.

Las conexiones entre la toxicidad producida por A β y la patología tau han sido propuestos en varias ocasiones. Sin embargo, los mecanismos que unen los SP y NFTs aún no se han establecido por completo, y esto sigue siendo uno de los enigmas más difíciles de la investigación de la EA. No obstante, nuevas líneas de investigación apoyan la noción de que el mal funcionamiento de tau, además de ser capaz de producir de forma independiente la neurodegeneración, incluso en la ausencia de depósitos de A β u otros eventos patológicos podría ser un mediador clave de la neurodegeneración en respuesta a otros eventos previos, incluyendo toxicidad inducida por A β . Un desarrollo interesante e inesperado de la función patológica de tau propuesto como un mediador común de la neurodegeneración es la hipótesis de que la supresión de tau puede ser potencialmente beneficiosa. De acuerdo con esta hipótesis, un estudio reciente⁵¹ ha demostrado que la reducción o eliminación

de tau endógena, en un modelo de ratón de AD que expresa la proteína precursora de amiloide humana (hAPP) con una mutación de AD familiar que aumenta la producción de A β , es beneficioso contra los déficits inducidos por A β . Estos resultados parecen justificar estudios anteriores basados en células que mostraron que las neuronas del hipocampo cultivadas de ratones knock-out de tau tratados con A β fibrilar no eran susceptibles a la toxicidad inducida por A β ⁵². Sin embargo, aunque el modelo más válido para las comparaciones con supresión de tau sería un ratón tau-knockdown, es apreciable que los ratones tau-knockout muestran alteraciones del comportamiento y anomalías estructurales con el avance de la edad⁵³, lo que sugiere que la supresión a largo plazo de tau como una terapia para tauopatías podrían estar llena de complicaciones.

Neurodegeneración mediada por Tau

En la EA tau ya no se une a los MTs, sino que es secuestrado en forma de NFTs en las neuronas y en células gliales como los astrocitos y la oligodendroglía. En términos generales, las consecuencias patológicas de estos eventos podría ser el resultado de una pérdida de la función normal de tau combinado con ganancias de funciones patológicas de tau hiperfosforilada, los filamentos formados de los mismos, y la agregación de estos filamentos.

La pérdida de la función normal de tau en la estabilización de MT conduce a una alteración patológica en las funciones estructurales y reguladoras normales del citoesqueleto, que pondría en peligro el transporte axonal y de este modo contribuir a la disfunción sináptica y a la neurodegeneración. Sin embargo, el descubrimiento de que el nivel total de NFT se correlaciona con el grado de deterioro cognitivo sugiere que la ganancia de funciones tóxicas por NFT podría desempeñar un papel importante en la progresión de la enfermedad. De hecho, estudios que utilizan técnicas inmunohistoquímicas para determinar los niveles de NFTs y SP en diferentes regiones del cerebro de pacientes con EA, así como las personas mayores no dementes, demostraron que el número de NFT, pero no el número de SP, se correlaciona con el grado de deterioro cognitivo.

Es posible que los efectos tóxicos de NFT puedan surgir a causa del tamaño relativamente grande del material fibrilar que se acumula dentro de las neuronas, y este material puede plantear una interrupción física directa para las funciones celulares tales como el transporte axonal. Además, los NFT también pueden contribuir a la progresión de la enfermedad mediante un secuestro más eficaz de tau y otras proteínas, y de ese modo reforzar y amplificar la pérdida de la función normal de tau.

Sin embargo, la idea de que los NFT podrían tener un papel predominante en la progresión de la enfermedad fue cuestionada recientemente por informes que demostraban que la supresión de tau en un modelo de ratón transgénico para una tauopatía neurodegenerativa produce mejoras en la función de la memoria, a pesar de que los NFT siguieran acumulándose. Sin embargo, cabe destacar que en el modelo utilizado, el grado de supresión de tau es relativo a un estado de tau completamente activado, en concreto sigue existiendo una sobreexpresión de tau 2,5 veces superior a la tau endógena. Otra observación importante fue en estudios con un modelo de ratón transgénico para una tauopatía (P301S) que revelaron que la pérdida de sinapsis y la activación microglial preceden a la aparición de NFT, debido a la alteración de transporte que resulta de hiperfosforilación de tau⁵⁴.

Colectivamente, estos estudios corroboran la idea de que los defectos de transporte axonal, la pérdida de sinapsis y la neuroinflamación pueden ser de los primeros signos de neurodegeneración que resulta de la hiperfosforilación de tau, mientras que los NFTs pueden ser manifestaciones en etapa tardía que pueden contribuir a la progresión de la enfermedad al interferir físicamente con las funciones celulares normales. Al mismo tiempo, los NFTs pueden secuestrar grandes cantidades de otras proteínas funcionalmente significativas, y por lo tanto amplificar las causas previas. De este modo la neurodegeneración causada por la ganancia de función tóxica frente a la causada por la pérdida de la función normal puede ser experimentalmente difícil de discernir, ya que la ganancia de función tóxica implica una amplificación de la pérdida de función. Además, una correlación exacta entre el tamaño de las NFT y estas la ganancia de función tóxica, es decir, la masa necesaria para que un depósito insoluble intracelular se convierta en un obstáculo físico, aún se desconoce.

Efecto de ApoE en la EA

Como hemos visto antes, las placas amiloides extracelulares y los ovillos neurofibrilares intracelulares son las lesiones producidas en la EA. Las mutaciones asociadas a la EA familiar de aparición temprana (early-onset familiar AD) son heredadas de forma dominante y se encuentran en los genes APP, PSEN1 y PSEN2, cuyos productos, junto con nicastrina, APOH1 y PSENEN2 son componentes esenciales de un complejo proteico que es responsable de la actividad γ -secretasa. Pero la gran mayoría de los casos de EA ocurren en etapas tardías de la vida, y se ha visto que las mutaciones en el alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (apoE) en el cromosoma 19 suponen el mayor factor de riesgo para el EA de aparición tardía (LOAD). El riesgo de este alelo ha sido validado en numerosos estudios de asociación genética, además, se ha observado que la apoE se une a A β en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

La apoE es una importante apolipoproteína y un portador de colesterol en el cerebro⁵⁵. En los humanos, el gen apoE existe como tres alelos polimórficos diferentes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), que generan seis genotipos diferentes ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$). $\epsilon 3$ es el alelo más común (77%) y $\epsilon 2$ el alelo menos común (8%)⁵⁵. La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ es de aproximadamente un 15% de la población general, pero es de un 40% en los pacientes con EA. Los individuos con un alelo $\epsilon 4$ son de tres a cuatro veces más propensos a desarrollar EA que los que no tienen alelos $\epsilon 4$ ⁵⁵. Los efectos del alelo $\epsilon 4$ en el riesgo de AD son máximos entre 60 y 70 años. Curiosamente, el alelo poco frecuente $\epsilon 2$ se asocia con una protección contra el LOAD en comparación con el alelo $\epsilon 3$. El alelo $\epsilon 4$ es también un factor de riesgo para aterosclerosis⁵⁵ y trastornos neurológicos adicionales, incluyendo angiopatía amiloide cerebral (AAC) y las hemorragias cerebrales asociadas a AAC, tauopatías y demencias de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple. Estas observaciones sugieren que el alelo $\epsilon 4$ puede estar asociada con una neurodegeneración acelerada en el desarrollo y la progresión de varias enfermedades neurodegenerativas.

Las tres isoformas de apoE (apoE2, apoE3 y apoE4) difieren entre sí por un solo aminoácido⁵⁵. ApoE4 actúa en la mayoría de las vías patogénicas de la EA ya sea disminuyendo la protección o aumentando la toxicidad en comparación con apoE2 y apoE3. Aun así, los mecanismos que determinan la naturaleza patogénica de la apoE4 en la EA no están completamente claros.

Propiedades bioquímicas de apoE

La apoE es una proteína de aproximadamente 34 kDa que transporta el colesterol y otros lípidos en el plasma y el sistema nervioso central mediante la unión a los receptores de apoE en la superficie celular⁵⁵. Se expresa en varios órganos, pero la mayor expresión es en el hígado y el cerebro. En la periferia, la apoE transporta las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) sintetizadas en el hígado, una subclase de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y los quilomicrones sintetizados en el intestino. En el cerebro, la apoE se sintetiza predominantemente por los astrocitos y en menor cantidad por la microglia.

La apoE humana contiene 299 residuos aminoacídicos y se pliega de forma independiente a los dominios aminoterminal y carboxiterminal, que están unidos entre sí por una región de bisagra flexible en el centro (fig. 8). La región que interactúa con los receptores de apoE (residuos 136-150) está en el dominio N-terminal, mientras que la región de unión a lípidos (residuos 244-272) está en el dominio C-terminal. Las tres isoformas, apoE2, apoE3 y apoE4, difieren en las posiciones 112 y 158⁵⁵. Estas diferencias de un solo aminoácido entre las tres isoformas de apoE alteran la estructura de la proteína e influyen en la asociación a lípidos y la unión al receptor. Por ejemplo, la apoE3 y la apoE4 se unen los receptores con una afinidad 50 veces mayor que apoE2. Como resultado, la apoE2 transporta los lípidos con menor eficiencia, y su presencia se asocia con hiperlipoproteinemia de tipo III. La apoE4 se une preferentemente a las lipoproteínas de mayor tamaño provocando un ligero aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular, esta preferencia a las lipoproteínas de mayor tamaño es atribuible a la presencia de un Arg en la posición 112, que afecta a la conformación de la cadena lateral de Arg61, resultando en un “dominio de interacción” entre este Arg61 del dominio N-terminal y la Glu255 del dominio C-terminal.

En todas las especies animales, excepto en los seres humanos, la apoE no tiene variantes genéticas y contiene una Thr en la posición que es equivalente a la Arg61 en el apoE4 humana. Por lo tanto, con respecto al dominio de interacción, las apoE de otras especies tienen un comportamiento funcional como la apoE3, independientemente de si se tiene una Arg en la posición 112. La introducción de un residuo de Arg en la posición 61 de la apoE murina, la convierte en una estructura similar a la apoE4 humana con un dominio de interacción. La apoE4 humana y la apoE Arg61 de ratón están presentes en niveles más bajos que otras isoformas en el cerebro, lo que sugiere que el dominio de interacción afecta directamente a la estabilidad de la apoE. La apoE4 también asume un estado inestable llamado “molten globule”, un estado proteico parcialmente plegado similar al encontrado en proteínas con un bajo pH o una alta temperatura. Las propiedades únicas del dominio de interacción y el estado de molten globule implican el papel patogénico de la apoE4 en la EA.

El LDLr es el receptor principal receptor de apoE y su función es crucial para homeostasis del colesterol, se unen tanto al apoB (que contiene LDL) como al apoE a través de interacciones electrostáticas entre los residuos aminoacídicos básicos en apoB o apoE y los residuos ácidos en el receptor. Estudios demuestran que la pérdida de la función del receptor a causa de mutaciones en el gen de LDLr provocan un aumento de los niveles plasmáticos de LDL, lo que conduce a la hipercolesterolemia familiar y la aterosclerosis, no obstante también se ha observado que la delección del gen provoca graves trastornos en la transmisión sináptica y la función motora⁵⁶. La causa de estos trastornos neurodegenerativos es la transducción de la señal que ocurre en el LDLr y otros receptores de apoE que provocan un aumento significativo de los niveles de Ca²⁺, esto afecta a los receptores de NMDA interrumpiendo la transmisión neuronal.

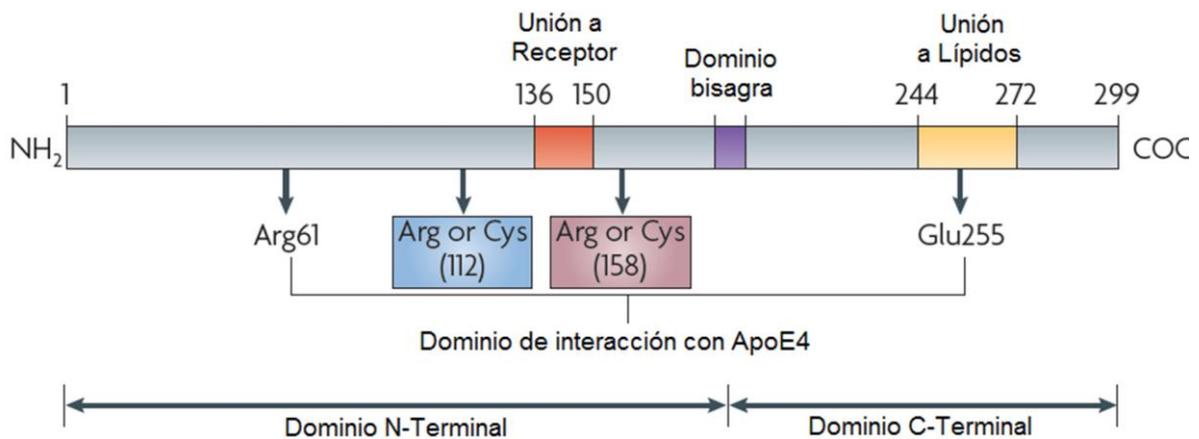


Figura 8: **Representación esquemática de la apoE humana.** La apolipoproteína E humana (APOE) es una proteína de 299 aminoácidos que contiene dos dominios plegados de forma independiente por un dominio bisagra. Un dominio amino-terminal que incluye la región de unión al receptor y un dominio carboxi-terminal que contiene la región de unión a lípidos. Los residuos que distinguen a las isoformas de apoE (112 y 158) están marcados. APOE2 tiene Cys en ambas posiciones, APOE4 tiene Arg en ambas posiciones y APOE3 tiene Cys en la posición 112 y Arg en la posición 158. El dominio de la interacción entre Arg61 y Glu255 en APOE4 también está indicado. Ilustración extraída de Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Neuroscience*. 2009; 10: 333-344.

ApoE y Aβ

La acumulación, la oligomerización y la deposición de Aβ en el cerebro son eventos cruciales en la patogénesis de la EA. Como hemos visto, el nivel de Aβ en el cerebro es el equilibrio neto de la producción y la eliminación de Aβ. En consecuencia, la acumulación de Aβ en el cerebro de pacientes con EA podría reflejar una sobreproducción, una eliminación ineficaz o ambos hechos. Los receptores de apoE y apoE desempeñan un papel importante en ambos procesos. En cuanto a la sobreproducción, se ha visto que varios receptores de apoE interactúan con la APP y modulan su procesamiento a Aβ, la unión se produce extracelularmente entre el receptor y el dominio KPI de la APP (APP751-APP770), la APP es endocitada y debido a que la β-secretasa BACE1 está presente de forma abundante y activa en los endosomas, se incrementa la vía amiloidogénica y la consiguiente producción de las isoformas de Aβ. En cuanto a la apoE, se ha demostrado que la apoE4 aumenta la producción de Aβ en mayor medida que apoE3⁵⁷, probablemente por modificaciones en los receptores de apoE.

En lo que concierne a la desaparición de A β , es ampliamente aceptado que los errores en la eliminación de A β son los eventos más patogénicos de LOAD. El péptido A β tiene un tiempo de vida relativamente corto en el cerebro, utilizando una microdialisis *in vivo* y un inhibidor de γ -secretasa, se observó que el tiempo de vida de A β era de 2 horas en ratones jóvenes y 4 horas en ratones adultos⁵⁸. Además, en los cerebros humanos la velocidad de eliminación de A β es del 8,3% cada hora⁵⁹, indicando que A β es activa y eficientemente eliminado del cerebro. Las dos principales vías por las que A β es eliminado del cerebro es la liberación al torrente sanguíneo por la acción de receptores de la barrera hematoencefálica y la degradación proteolítica por endopeptidas. Los receptores que median la eliminación de A β son los mismos receptores de apoE, los cuales están ampliamente expresados en las neuronas, los astrocitos y la microglia de la parénquima cerebral y en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Estos receptores se pueden unir a A β directa o indirectamente a través de chaperonas de A β , es decir, proteínas que facilitan su plegamiento. La apoE es la chaperona más característica de A β , estudios de inmunoreactividad han encontrado la apoE en las placas amiloides⁶⁰, sugiriendo que la apoE interactúa directamente con A β en los cerebros con EA. La región de apoE responsable de la unión a A β está en el dominio C-terminal, solapando con la región de unión a lípidos, lo que sugiere que la asociación de A β con apoE es un proceso análogo a la unión a lípidos. De hecho, la unión de apoE con A β compromete la capacidad de unión a lípidos. Además, A β modula la unión de las diferentes isoformas de apoE a sus receptores. Estos resultados demuestran que los péptidos de A β pueden interferir en la función de apoE en el metabolismo lipídico del cerebro y contribuir a la EA. Se ha observado que apoE3 se une a A β con mayor afinidad que apoE4⁶¹, de acuerdo con esto, apoE3 elimina A β a través de los receptores de apoE de forma más eficiente que apoE4. De hecho, varios estudios con modelos de ratón demuestran que aquellos que expresan la apoE3 humana desarrollan menos placas amiloides que aquellos que expresan la apoE4^{60,61}.

ApoE y tau

En condiciones normales la apoE es expresada por astrocitos y microglia, pero no por las neuronas. La sobreexpresión transgénica de apoE4 en las neuronas pero no en astrocitos aumenta la fosforilación de tau en ratones⁶², lo que sugiere que existe un efecto específico de apoE4 en las neuronas que favorecen la fosforilación de tau. Es posible que en cerebros con EA estresados se produzca una expresión anormal en las neuronas que facilita la hiperfosforilación de tau. No obstante, apoE y tau normalmente están separadas por la membrana plasmática de modo que se impide el contacto físico. Una hipótesis sugiere que los fragmentos C-terminales de apoE entran en el citosol e interactúan directamente con tau⁶². Alternativamente, las isoformas de apoE pueden regular diferencialmente la cascada de señalización mediada por los receptores de apoE afectando y modificando la función de las tau quinasas y fosfatasa.

ApoE y la sinapsis neuronal

Los errores en el proceso sináptico son de las primeras características patológicas de la EA. La señalización y redistribución lipídica mediada por apoE y los receptores de actúan en partes importantes de la integridad y plasticidad sináptica. Existen evidencias científicas de que las isoformas de apoE regulan diferencialmente la plasticidad sináptica y su reparación. Estudios con ratones transgénicos portadores del gen apoE4 humano muestran déficits sinápticos en ausencia neuropatológicas⁶³, también se observa un mayor daño del LTP en el hipocampo comparación con los ratones transgénicos apoE3 y de tipo salvaje.

La expresión de apoE está aumentada en los cerebros de ratas después de una isquemia y en las neuronas lesionadas por un tratamiento con ácido kaínico. La principal función de la expresión de apoE inducida por una lesión es redistribuir los lípidos y fortalecer la señalización mediada por apoE con el fin de hacer reparaciones neuronales y sinápticas. El apoE de las lipoproteínas aisladas a partir del LCR demostró que apoE3 aumenta el crecimiento de neuritas y protege de la apoptosis mientras que la apoE4 no tiene ese efecto. En conjunto, estos estudios indican que apoE4 es menos eficaz que apoE3 en el mantenimiento y la reparación de la sinapsis y las neuronas, lo cual puede explicar por qué en ciertas lesiones neuronales los individuos con apoE4 tienden a tener un pronóstico más desalentador. Es posible que LOAD sea el resultado de daño por acumulación de A β , la oxidación y la inflamación neuronal, y que apoE4 es menos eficaz en el mantenimiento y la reparación de la sinapsis y las neuronas lesionadas.

Farmacología actual y dianas terapéuticas

Terapias actuales

A lo largo de toda la revisión hemos visto diferentes puntos claves de la EA y describiendo sus mecanismos de acción se han destacado posibles dianas terapéuticas a varios niveles. Actualmente los fármacos más utilizados son los inhibidores de acetilcolinesterasa, una enzima que degrada la acetilcolina, un neurotransmisor con un papel fundamental en la función de la memoria. Cuatro de estos inhibidores están aprobados por la FDA *donepezil*, *rivastigmina*, *galantamina* y *tacrina*. Los inhibidores de acetilcolinesterasa han sido extensamente estudiados como terapia contra la EA y su eficacia está reconocida para etapas prematuras de la enfermedad.

Como se ha mencionado antes, la excitotoxicidad es un proceso común que desencadena la muerte celular y ha sido propuesto como un mecanismo del deterioro neuronal en la EA. La muerte celular ocurre por la sobreactivación de NMDAR, dando lugar a un excesivo flujo de calcio intracelular inviable con el correcto funcionamiento celular. Este proceso está implicado en numerosos desordenes del sistema nervioso incluyendo la neurodegeneración de la EA, varios estudios con modelos experimentales de la enfermedad han demostrado una perturbación en la homeostasis del calcio neuronal, y estudios pre-clínicos muestran que el bloqueo farmacológico de NMDARs elimina la neurotoxicidad inducida por A β . Basándose en estos estudios, la *memantina*, un bloqueador parcial de los NMDARs, fue introducido como un posible agente terapéutico en la EA. Bajo condiciones fisiológicas normales, la *memantina* tiene muy baja afinidad por el NMDAR, sin causar ningún efecto fisiológico⁶⁴. Sin embargo, cuando los niveles de NMDAR aumentan, o durante una activación prolongada (por ejemplo bajo condiciones excitotóxicas), la *memantina* se convierte en un fuerte bloqueante. La *memantina* está actualmente aprobada por la FDA para el uso en pacientes con EA en estado moderado o severo.

Terapias emergentes

En la última década están surgiendo nuevas terapias que no se dedican a tratar los trastornos sinápticos, que no son más que una consecuencia de la enfermedad, sino a pasos previos de la misma que pueden considerarse origen y causa. Está ampliamente aceptado que los pacientes con EA presentan una progresiva deposición cerebral de placas de β -amiloide y de ovillos neurofibrilares. Y aunque el papel exacto de A β en la patogénesis de la EA sigue en debate, hay evidencias de que A β es un componente crítico de los mecanismos de presenta esta enfermedad.

Por ello, se han desarrollado varios tratamientos con el objetivo de eliminar el péptido A β , el que se encuentra está avanzado es la inmunización pasiva contra el péptido, los cuales presentan mejoras en la función cognitiva global incluso a pesar de ser portador de alelos $\epsilon 4$. El *solanezumab* es un anticuerpo monoclonal de A β que disminuye los niveles de deposición, pero aumenta los niveles de β en el líquido cefaloraquídeo⁶⁵, esto significa que favorece la degradación de A β cerebral aumentando su liberación al torrente sanguíneo.

Otro objetivo es disminuir la producción de A β mediante inhibidores de β - y γ -secretasa. La APP es secuencialmente escindida por β - y γ -secretasa para dar lugar al péptido A β , no obstante, ambas secretasas tienen importantes sustratos además de la APP, el más importante es Notch en el caso de la γ -secretasa. Notch es una proteína transmembrana altamente conservada esencial para muchos procesos que regulan eventos del destino celular, está presente en multitud de organismos incluido el humano. La desregulación de Notch tiene consecuencias perjudiciales, de modo que un compuesto terapéutico interfiere con las vías de señalización esenciales de la célula. Es por ello que el tratamiento con *semagacestat*, un inhibidor de γ -secretasa, no ofreció buenos resultados a largo plazo. Por otra parte, el desarrollo de fármacos inhibidores de β -secretasa (inhibidores de BACE1) ha demostrado ser un desafío, varios inhibidores de BACE1 prometedores han entrado recientemente en ensayos clínicos humanos. La seguridad y eficacia de estos medicamentos se están probando en la actualidad en pacientes con EA y en individuos sanos, y pronto serán probadas en personas con EA presintomático. Aunque hay muchas esperanzas de que los inhibidores de BACE1 podrían ser eficaces para la prevención o el tratamiento de la EA, se han planteado preocupaciones acerca de los posibles efectos secundarios basados en el mecanismo de estos fármacos, por ejemplo, los inhibidores *LY2886721* y *MK-8931* han presentado pacientes con intoxicaciones hepáticas⁶⁶.

Identificar y bloquear la vía de señalización patológica iniciada por A β puede representar una estrategia terapéutica para la EA. Múltiples estudios implican a la Fyn quinasa en la fisiopatología sináptica de la EA, que une la patología de A β y de tau. Fyn es un miembro de la familia de las Scr quinasas, una tirosina quinasa intracelular. En ratones transgénicos de EA, la eliminación genética de Fyn quinasa alivia la pérdida neuronal, y la sobreexpresión de Fyn acelera deterioros en la memoria espacial⁶⁷. En pacientes con EA, la expresión de Fyn esta alterada, sugiriendo que la vía de señalización caracterizada en modelos animales es aplicable a condiciones humanas. Además, otros estudios muestran que la “cellular prion protein” (PrP^C) actúa como un receptor de alta afinidad para los oligómeros tóxicos de A β ⁶⁸. Basándose en estos descubrimientos, el bloqueo de la Fyn quinasa o de la PrP^C en pacientes con EA representa una intervención terapéutica de alto potencial. Mientras que las terapias dirigidas a PrP^C se encuentran en estado pre-clínico, el estudio de *saracatinib*, un inhibidor de la familia Scr quinasa con un gran efecto sobre Fyn quinasa, está en la fase de estudio Ib.

A pesar de la consistente presencia de NFTs en los cerebros de EA, que consisten en la hiperfosforilación de tau, hasta hace pocos años se pensaba que esta proteína era un efecto secundario de la neurodegeneración iniciada por A β . Actualmente se considera como un evento independiente con la misma capacidad de causar la patogénesis de la EA. Una reducción del 50% de proteína tau endógena revierte el deterioro cognitivo en modelos de ratón para la EA y varios ensayos clínicos basados en terapias contra tau han comenzado.

La apoE también juega un papel crucial en las vías patogénicas de la EA, se conoce que la apoE4 es un importante factor de riesgo para la EA mientras que la apoE3 no lo es, por lo tanto un objetivo atractivo es convertir la apoE4 en una molécula parecida a la isoforma apoE3. El dominio de interacción que existe en apoE4 pero no en apoE3 parece ser responsable de la mayor parte de la neuropatología asociada a apoE4, se han identificado varias moléculas que pueden interrumpir este dominio de interacción. Entre ellos, *GIND-25*, un disulfonato, y *GIND-105*, un monosulfoalquilo, que disminuyen la producción de A β inducida por apoE4 a niveles similares a los inducidos por apoE3⁶⁹.

Otra potencial estrategia es la de aumentar los niveles de expresión de apoE en el cerebro. Sin embargo, esta estrategia requiere una cuidadosa consideración en cuanto a si los efectos de apoE4 en cerebros con EA son causados por la pérdida de la protección, el aumento de la toxicidad o ambos. Se ha demostrado que el promotor del gen *apoE* puede cambiar los niveles de expresión de apoE cuando altera la transcripción del gen. Por lo tanto, la regulación de la función del promotor *apoE* podría ser una estrategia para alterar la expresión de apoE. Los receptores X del hígado (LXRs) son receptores de oxisterol que actúan como factores de transcripción que regulan la homeostasis del colesterol. En el cerebro, los LXR aumentan la expresión de apoE y ABCA1, promoviendo así el flujo de colesterol en las neuronas y la glía. En el modelo de ratón amiloide Tg2576, los agonistas de LXR facilitan la eliminación de A β 42 y revierten el déficit de memoria contextual⁷⁰. Por lo tanto, los agonistas de LXR pueden representar un importante objetivo terapéutico para la EA.

Otras posibles terapias

Actualmente se está trabajando en la idea de elaborar una vacuna contra la EA. Aún en fase I, de carácter muy preliminar, se evalúa especialmente la tolerabilidad y la seguridad de la vacuna *ABvac40* en pacientes con EA leve o moderado, si bien no se analiza su efectividad. Su desarrollo se basa en la inmunización contra el beta-amiloide y se trata de una innovadora inmunoterapia activa específica frente a las proteínas beta-amiloides 40 y 42, utilizando la parte C-terminal de estas proteínas.

También, la terapia génica sobre la *Crtc1*, un gen que provoca la producción de una proteína bloqueada en los pacientes con EA permite desencadenar las señales necesarias para activar los genes implicados en la consolidación de la memoria a largo plazo.

En cuanto a la insulina, es crítica en la utilización de glucosa y juega un importante papel en la función sináptica. Investigaciones recientes han observado la desregulación de insulina en pacientes con EA. En un modelo de ratón que sobreexpresa el transgen APP se ha observado resistencia a la insulina, y los niveles de insulina en pacientes con EA están reducidos.

Cabe destacar que se puede encontrar en el mercado *Souvenaid*, un alimento médico desarrollado recientemente para su uso contra la EA. Contiene una mezcla de propiedades de nutrientes que son precursores de fosfátidos esenciales para la función neuronal saludable⁷¹.

Por último, hay un considerable interés en el papel del ejercicio como una estrategia terapéutica para la EA. Varios ensayos controlados han el papel de programas de ejercicio aeróbico en la EA. El mayor estudio fue realizado con 170 pacientes con EA, la mitad de los cuales realizador 50 minutos de ejercicio moderado (caminar) 3 veces por semana⁷². Después de 6 meses el grupo que realizo el ejercicio mostraba mejoras considerables. Aunque el tipo de ejercicio aeróbico no más efectivo contra pacientes con EA no se conoce todavía, es razonable incluir un régimen de ejercicio similar al mencionado como parte de la rutina del cuidado de la EA.

Bibliografía

1. Fratiglioni L, De Ronchi D, Aguero-Torres H. (1999) Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging*. 15.
2. Bermejo-Pareja, F., Benito-Leon, J., Vega, S., Medrano, M. J., Roman, G. C. (2008) Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J. Neurol. Sci.* 264, 63-72.
3. Andersen, K., Launer, L. J., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J. M., Stijnen, T., Hofman, A. (1999) Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM studies. EURODEM incidence research group. *Neurology*. 53, 1992-1997.
4. Launer LJ, H. A. (2000) Frequency and impact of neurologic diseases in the elderly of Europe: A collaborative study of the neurologic diseases in the elderly research group. *Neurology*. 54, 51-53.
5. Molsa, P. K., Marttila, R. J., Rinne, U. K. (1986) Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurol. Scand.* 74, 103-107.
6. Molsa, P. K., Marttila, R. J., Rinne, U. K. (1995) Long-term survival and predictors of mortality in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurol. Scand.* 91, 159-164.
7. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (July 1984). «Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease». *Neurology* 34 (7): pp. 939-44.
8. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414
9. Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E. Delayed (julio de 1989). «Increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death». *Molecular Pharmacology* (Washington DC: Fidia-Georgetown Institute for the Neurosciences) 36 (1): pp. 106-112.
10. Castro A, Martínez A. La enfermedad de Alzheimer: bases moleculares y aproximaciones terapéuticas. Instituto de Química Médica (CSIC).
11. Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y (2009) Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 302:627-637.
12. Harold D, Abraham R, Hollingworth P et al (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1088-1093.
13. Hollingworth P, Harold D, Sims R et al (2011) Common variants at *ABCA7*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1*, *CD33* and *CD2AP* are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:429-435.
14. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890 37.
15. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Mueller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
16. Haass C, Hung AY, Selkoe DJ (1991) Processing of b-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors a localization in internal vesicles over constitutive secretion. *J Neurosci* 11:3783-3793.
17. Saido, T.C. (1998) Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of Oamyloid. *Neurobiol. Aging* 19, S69-S75.
18. Saido, T.C. (2003) Overview-AO metabolism: from Alzheimer research to brain aging control. In *AO Metabolism and Alzheimer's Disease* (ed. Saido, T.C.). Landes Bioscience, Georgetown, pp. 1-16.
19. Zlokovic, B.V., Yamada, S., Holtzman, D., Ghiso, J. and Frangione, B. (2000) Clearance of amyloid O-peptide from brain: transport or metabolism? *Nat. Med.* 6, 718; Iwata, N., Tsubuki, S., Hama, E., Takaki, Y., Shirotani, K. and Saido, T.C. (2000) Reply to: 'Clearance of amyloid O-peptide from brain: transport or metabolism?' *Nat. Med.* 6, 718-719.
20. Reddy PH, Manczak M, Mao P, Calkins MJ, Reddy AP, Shirendeb U (2010) Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J Alzheimers Dis* 20:S499-S512

21. Aydin D, Weyer SW, Müller UC (2011) Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models. *Exp Brain Res Sep 20* [Epub ahead of print]
22. Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA (2003) The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23:5531–5535
23. Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O (2011) Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69:819–830
24. Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Med* 1:1291–1296
25. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L (2001) The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nature Neurosci* 4:887–893
26. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-356.
27. Sunde M, et al. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol.* 1997; 273:729–739.
28. Sawaya MR, et al. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature.* 2007; 447:453–457.
29. Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB (2000) Beta-Amyloid(1–42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275:5626–5632.
30. Zhang Y, Kurup P, Xu J, Anderson GM, Greengard P, Nairn AC, Lombroso PJ (2011) Reduced levels of the tyrosine phosphatase STEP block beta amyloid-mediated GluA1/GluA2 receptor internalization. *J Neurochem* 119:664–672.
31. D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14:69–76.
32. Reddy PH, Beal MF (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45–53.
33. Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:2495–2509.
34. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 20:4515–4529.
35. Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD (2005) Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19:2040–2041.
36. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15:1437–1449.
37. Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, Casadesus G, Zhu X (2008) Amyloid- β overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19318–19323.
38. Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130 (2000).
39. Binder, L. I., Frankfurter, A. & Rebhun, L. I. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371–1378 (1985).
40. Hong, M. et al. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914–1917 (1998).

41. Amos, L. A. Microtubule structure and its stabilisation. *Org. Biomol. Chem.* 2, 2153–2160 (2004).
42. Kuret, J. et al. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc. Res. Tech.* 67, 141–155 (2005). This review provides a model to rationalize the multistep pathway to tau fibril formation, as well as experimental methods for tau fibrillization assays.
43. Mazanetz, M. P. & Fischer, P. M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature Rev. Drug Discov.* 6, 464–479 (2007).
44. Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M.-Y. & Trojanowski, J. Q. Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 109, 5–13 (2005).
45. Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem* 1995;270:4854–4860.
46. Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, et al. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet* 1986;2:421–426.
47. Kopke E, Tung YC, Shaikh S, et al. Microtubule-associated protein tau Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1993;268:24374–24384.
48. Noble, W. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 6990–6995 (2005).
49. Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M. Y. & Klein, P. S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature* 423, 435–439 (2003).
50. David, D. C. et al. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280, 23802–23814 (2005).
51. Roberson, E. D. et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750–754 (2007).
52. Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. & Ferreira, A. Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 6364–6369 (2002).
53. Ikegami, S., Harada, A. & Hirokawa, N. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci. Lett.* 279, 129–132 (2000).
54. Yoshiyama, Y. et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351 (2007).
55. Mahley, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622–630 (1988).
56. Herz, J., Clouthier, D. E. & Hammer, R. E. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71, 411–421 (1992).
57. Ye, S. et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 18700–18705 (2005).
58. Cirrito, J. R. et al. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid- β metabolism and half-life. *J. Neurosci.* 23, 8844–8853 (2003).
59. Bateman, R. J. et al. Human amyloid- β synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nature Med.* 12, 856–861 (2006).
60. Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K. & Hyman, B. T. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11, 575–580 (1993).
61. LaDu, M. J. et al. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to β -amyloid. *J. Biol. Chem.* 269, 23403–23406 (1994).
62. Brecht, W. J. et al. Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J. Neurosci.* 24, 2527–2534 (2004).

63. Wang, C. et al. Human apoE4-targeted replacement mice display synaptic deficits in the absence of neuropathology. *Neurobiol. Dis.* 18, 390–398 (2005).
64. Lipton SA. Paradigm shift in neuro-protection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:160–170.
65. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebro-spinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol.* 2006;59:512–519.
66. Phase 1b Study of investigational BACE Inhibitor, MK-8931, in Patients with Alzheimer's Disease. White House Station, NJ:Merck&Co,2013.
67. Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, et al. Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011;31:700–711.
68. Laurén J, Gimbel D, Nygaard H, et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature.* 2009;457:1128–1132.
69. Mahley, R. W., Weisgraber, K. H. & Huang, Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 5644–5651 (2006).
70. Riddell, D. R. et al. The LXR agonist To901317 selectively lowers hippocampal A β 42 and improves memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 621–628 (2007).
71. Scheltens P, Twisk JW, Blesa R, et al. Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial. *J Alzheimers Dis.* 2012;31:225–236.
72. Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA.* 2008;300:1027–1037.