

2

Muerte celular y neurodegeneración

Violetta N. Pivtoraiko y Kevin A. Roth

Departamento de Patología, University of Alabama, Birmingham, AL, EE.UU.

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disfunción neurológica progresiva, que normalmente se asocia con la pérdida neuronal en áreas seleccionadas del sistema nervioso adulto. Dada la limitada capacidad neurogénica del sistema nervioso de los adultos, la muerte celular neuronal marca una fase irreversible y catastrófica del progreso neurodegenerativo. Un enorme esfuerzo científico se ha enfocado en definir las vías celulares y moleculares que regulan la muerte neuronal porque esto puede llevar al descubrimiento de nuevas intervenciones terapéuticas que podrían detener o enlentecer el progreso de las enfermedades neurodegenerativas.

Definición

Se han descrito tres tipos morfológicos principales de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: el apoptótico, el necrótico y el autofágico.¹ La *apoptosis* se caracteriza por condensación cromatinica, fragmentación nuclear y vacuolización citoplasmática.² La apoptosis ha sido implicada en muchas enfermedades neurodegenerativas y es la forma más estudiada de muerte celular en el sistema nervioso.¹ La *muerte celular necrótica* se caracteriza por edematización de la célula y los orgánulos o rotura de las membranas celulares acompañadas por derramamiento de los contenidos intracelulares.³ En general, la necrosis se considera una forma accidental (o sea, no programada) de muerte celular y se observa después de traumatismos o infecciones.⁴ Sin embargo, la necrosis también está presente en las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington, y en la esclerosis lateral amiotrófica.⁵ Los mecanismos moleculares que inician la muerte celular necrótica en las enfermedades neurodegenerativas aún no se comprenden bien, pero pueden incluir excitotoxicidad, aumento del calcio intracelular y depleción de ATP.⁶ La *muerte celular autofágica* se caracteriza por la acumulación de vacuolas autofágicas junto con marcadores de apoptosis o necrosis.⁷ Hay cada vez más consciencia del posible papel de la muerte celular autofágica en las enfermedades neurodegenerativas. Recientemente la investigación se ha enfocado en comprender la interrelación de estas vías de muerte celular, en especial entre la apoptosis y la autofagia.

Apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas

La apoptosis es un proceso muy bien regulado que puede activarse mediante vías mediadas por receptores (extrínseca) o mediadas por las mitocondrias (intrínseca), que convergen en la activación mediada por segmentación de caspasas efectoras específicas de aspartato (caspasas 3, 6 y 7). Una vez activadas, las caspasas efectoras dividen muchos componentes celulares, lo que produce la fragmentación del DNA y las proteínas del citoesqueleto y causa fragmentación nuclear, degradación de los componentes subcelular y colapso del citoesqueleto (Fig. 2.1A). La apoptosis le permite a una célula morir sin afectar la viabilidad de las células y los tejidos que la rodean.⁸

La pérdida de poblaciones celulares neuronales es una característica de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas; por lo tanto, la posibilidad de que las moléculas y los procesos asociados con la apoptosis sean responsables de la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas ha recibido una atención significativa. La implicación de la apoptosis como mecanismo general de la muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas ha sido apoyada por la evidencia de experimentos en modelos animales y estudios de cultivos de tejidos celulares, aunque las investigaciones en cerebros humanos post mórtem han mostrado resultados contradictorios.⁹ Sin embargo, identificar la muerte celular apoptótica en autopsias de cerebros humanos puede resultar difícil porque el proceso neurodegenerativo es crónico y las células apoptóticas desaparecen a las pocas horas.¹⁰ A pesar de esto, se hallaron niveles elevados de proteínas y mRNA de varias caspasas en cerebros con enfermedad de Alzheimer post mórtem.⁹ Las caspasas 3 y 6 también han sido implicadas en la generación de especies tóxicas mediadas por división de proteínas de amiloide y en la enfermedad de Alzheimer,^{11,12} y se han detectado niveles elevados de caspasas 3 y 6 activadas en axones de pacientes con enfermedad de Alzheimer junto con agregados proteicos.^{13,14} Un miembro proapoptótico de la familia de proteínas Bcl-2, Bax, ha sido implicado en la inducción apoptótica y en la progresión de la enfermedad de Huntington y de Parkinson.⁹ No obstante, aún no se sabe si la disfunción neurológica observada en enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, la de Parkinson y la de Huntington es una consecuencia directa de la muerte neuronal

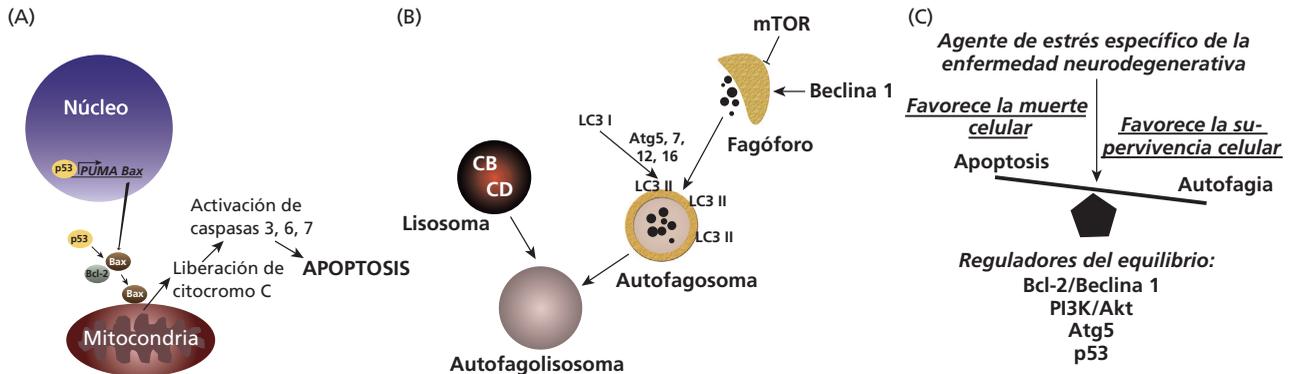


Figura 2.1 El equilibrio entre la apoptosis y la vía autofagia-lisosomal determina el destino de las neuronas afectadas por enfermedades neurodegenerativas. Las proteínas proapoptóticas como p53 pueden iniciar la apoptosis afectando directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial y liberando citocromo C o induciendo la transcripción de otras proteínas proapoptóticas (A). La vía autofagia-lisosomal proporciona energía y estructuras metabólicas a las células reciclando los orgánulos dañados o envejecidos y los agregados proteicos (B). Por lo tanto, se considera que la vía autofagia-lisosomal favorece la función de supervivencia celular ante condiciones de estrés. Sin embargo, varios reguladores proapoptóticos puede amenazar la integridad de esta vía e inclinar la balanza hacia la muerte celular (C). CB, catepsina B; CD, catepsina D.

apoptótica o de la disfunción neuronal que se produce antes de la pérdida franca de neuronas.

Regulación de la muerte y la supervivencia celular mediante la vía de la autofagialisosomal

Muchas enfermedades neurodegenerativas se acompañan de la acumulación de agregados proteicos.¹⁵ Estas enfermedades se llaman colectivamente proteinopatías.¹⁶ Este grupo incluye las enfermedades de Parkinson, de Huntington y de Alzheimer, en las que los agregados proteicos son principalmente citosólicos o extranucleares. Se cree que los agregados proteicos se forman como resultado de la producción tóxica de mutaciones o modificaciones funcionales. Se debate si los productos más tóxicos son los monómeros proteicos solubles propensos a la agregación, sus oligómeros o agregados más grandes.¹⁷ Sin embargo, en general la capacidad de las proteínas para agregarse se asocia con su toxicidad (aunque no necesariamente con la agregación en sí misma). Dos sistemas principales son los responsables de la destrucción proteica dentro de las células: el sistema de la ubiquitina-proteosoma (UPS, *Ubiquitin-Proteasome System*) (véase Cap. 5) y la vía autofagia-lisosomal (ALP, *Autophagy-Lysosomal Pathway*).¹⁸

La función principal de la ALP es regular el equilibrio energético intracelular reciclando los componentes celulares supervivientes o dañados como complejos proteicos y orgánulos. Se han definido 3 tipos principales de autofagia: la macroautofagia (en adelante llamada simplemente “autofagia”), la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La autofagia se inicia mediante la generación de un fagóforo de doble membrana, que rodea los componentes celulares para su degradación, formando una vesícula autofágica.¹⁹ La iniciación de la autofagia es regulada en parte por la activación de proteínas mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) que inhiben la autofagia afectando las

interacciones entre las proteínas asociadas con la autofagia (Atgs) mediante la regulación de la formación de vesículas autofágicas.²⁰ Para completar la autofagia, la carga de las vesículas autofágicas debe ser degradada y esto se logra mediante la fusión de las vesículas con lisosomas (Fig. 2.1B).²⁰

Cada vez más evidencia indica que la autofagia desempeña un papel crítico en la destrucción de los agregados proteicos y la regulación de la muerte neuronal en varias enfermedades neurodegenerativas.²¹ Aunque muchas proteínas asociadas con proteinopatías (como la sinucleína- α y la huntingtina) son parcialmente dependientes del UPS para su degradación, la autofagia se convierte en la ruta de destrucción para las proteínas propensas a la agregación, sus oligómeros y agregados que no pueden ser eficientemente destruidos por los proteosomas. La dependencia de las proteínas a la autofagia para su destrucción se asocia con su propensión a la agregación.^{22,23} Por ejemplo, la inhibición de la autofagia tiene un efecto mucho menor sobre la degradación del fragmento de la huntingtina correspondiente al exón 1 de tipo silvestre o la sinucleína- α de tipo silvestre que sobre la destrucción de las especies propensas a la mutación.^{22,23}

El papel crítico de la autofagia en la destrucción de las proteínas propensas a la agregación y sus agregados está apoyado por estudios en ratones que carecen de la expresión neuronal de *Atg5* o *Atg7*, genes responsables de la formación de vesículas autofágicas y de la iniciación de la autofagia. Estos ratones murieron siendo adultos jóvenes y mostraron fenotipos neurodegenerativos y neurológicos sorprendentes, incluida la acumulación de agregados que aumentan en tamaño y en número con la edad, y la pérdida de neuronas en el cerebro y el cerebelo.^{24,25} La insuficiencia metabólica crónica, como la inducida por el inhibidor mitocondrial rotenona, también ha mostrado que puede producir una declinación en la actividad de la ALP y que tiene capacidad de degradar especies de agregados proteicos.²⁶ Por lo tanto, la acumulación de agregados proteicos en las enfermedades neu-

rodegenerativas también puede explicarse a través de una disminución en la capacidad de las neuronas para soportar el estrés metabólico, como fue informado en algunos modelos de enfermedad de Parkinson, e inducir la autofagia suficiente para eliminar estas inclusiones proteicas.⁹

Inhibición de la autofagia

La inhibición de la autofagia por alteración de la función lisosómica también se ha asociado con la neurodegeneración.²⁷ Por ejemplo, la deficiencia en la catepsina D, una aspártico proteasa lisosómica, produce una muerte neuronal extensa y está acompañada por la acumulación de cuerpos similares a los autofagosomas/autolisosomas que contienen el cerioide lipofusina.²⁸ Los ratones con deficiencia combinada de catepsinas B y L, proteasas de cisteína lisosómicas, mueren en las primeras 4 semanas de vida; estos animales muestran una muerte celular masiva en ciertas neuronas de la corteza cerebral y el cerebelo. La neurodegeneración está acompañada por la acumulación de cuerpos lisosómicos y por el agrandamiento axonal, indicadores del deterioro de la capacidad de degradación de la ALP en estos ratones.²⁷

El descubrimiento de una mutación en el gen *ATP13A2*, que codifica una proteína lisosómica que causa una enfermedad de Parkinson familiar de inicio temprano, ilustra la importancia de la ALP en las enfermedades neurodegenerativas. El *ATP13A2* codifica una ATPasa lisosómica, un grupo de proteínas implicadas en el mantenimiento del ambiente ácido dentro del lisosoma, que es crucial para el correcto funcionamiento de las proteasas.²⁹ Es interesante que también se hayan detectado niveles elevados de expresión de *ATP13A2* en los cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica, lo que sugiere que probablemente esta proteína desempeña un papel en la enfermedad de Parkinson idiopática.²⁹ Además, se ha demostrado que la función lisosómica disminuye con la edad en el cerebro humano, y así el deterioro de la autofagia puede contribuir con las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad.³⁰

Papel de la autofagia a favor de la supervivencia o la muerte celular

Aunque la acumulación de vesículas autofágicas se ha observado en las neuronas afectadas de varias enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer, y en varios modelos de estas enfermedades, aún es controvertido si en ellas la autofagia desempeña un papel a favor de la supervivencia o de la muerte celular.²¹ La autofagia es mejor conocida por su papel homeostático en la degradación del citoplasma y los orgánulos, y en la degradación de proteínas propensas a la agregación y los orgánulos dañados (p. ej., las mitocondrias). Estos hallazgos a menudo se usan para apoyar el argumento de que la autofagia tiene una función a favor de la supervivencia.⁹ Sin embargo, la autofagia, como mecanismo de limpieza y reciclado, sólo puede ser efectiva si se completa la degradación lisosómica de vacuolas autofágicas.²⁷ Por lo tanto, una serie de factores que deterioran la formación y la degradación de vesículas autofágicas, o el exceso de formación de vesículas en relación con la reserva de degradación de la célula, pueden llevar a la “muerte celular por autofagia”, un término que para algunos investigadores es más preciso que “muerte celular autofágica”.³¹

Coordinación entre apoptosis y autofagia

A la luz de cada vez mayor conocimiento de las vías que favorecen la supervivencia o la muerte celular, no parece probable que una sola vía de muerte sea la única responsable de la pérdida de neuronas en las enfermedades neurodegenerativas (Fig. 2.1C). Por el contrario, para determinar el destino de la célula pueden interactuar varios mecanismos a favor de la supervivencia y la muerte celular.⁹ Además, la inhibición de una vía de muerte celular puede no evitar la pérdida neuronal sino, más bien, reclutar mecanismos de muerte alternativos; por ejemplo, la inhibición de la activación de las caspasas puede evitar la apoptosis pero estimular la autofagia o la muerte celular necrótica.³² Por lo tanto, hay cada vez más interés en determinar la interacción entre las vías de muerte autofágica y apoptótica.

La lista de reguladores apoptóticos que interactúan con los mecanismos autofágicos es cada vez más extensa. Por ejemplo, beclina α -1/Atg6, una proteína implicada en la regulación de la formación de vesículas autofágicas y la inducción de la autofagia, tiene un dominio homólogo Bcl-2 (dominio BH-3) y se ha demostrado que interactúa con miembros pro supervivencia de la familia de proteínas Bcl-2. Bcl-2 y Bcl-X₁ pueden unirse con Beclin1, evitando la interacción con los complejos implicados en la formación de vesículas autofágicas, lo que inhibe la autofagia.³³ Por lo tanto, la relación Bcl-2/Beclin1 es un determinante importante de si una célula activará la vía autofágica pro supervivencia o el programa apoptótico que induce la muerte celular.

Las vías que regulan la inducción de la autofagia también pueden activar vías que afectan la apoptosis. Por ejemplo, la fosforilación de Bad mediada por PI3K/Akt, un miembro BH3 de la familia Bcl-2, produce su disociación de la Bcl-2 y permite el secuestro de proteínas proapoptóticas de la familia, como Bax, y evita que induzcan la apoptosis. La Akt también antagoniza la actividad transcripcional de varios factores de transcripción proapoptóticos, como el p53, que lleva a la inhibición de la expresión de genes proapoptóticos y promueve la supervivencia celular.³² La Atg5, implicada en la formación de vesículas fagocíticas y la conversión de LC3I a LC3II, también puede influir sobre las vías de señalización apoptóticas. La Atg5 puede ser segmentada después de varios estímulos apoptóticos formando un producto N-terminal que se transloca por la membrana mitocondrial, interactúa con la Bcl-X₁, y promueve la apoptosis. Al mismo tiempo, la Atg5 segmentada produce una inhibición de la apoptosis cuando disminuye la cantidad de Atg5 disponible necesaria para la formación de vesículas apoptóticas.^{32,34}

Recientemente se informó que el p53, un regulador bien estudiado de la apoptosis neuronal, también modula la autofagia.³⁵ Los efectos del p53 sobre la autofagia parecen depender de su localización intracelular. El p53 nuclear puede estimular la autofagia mediante la inducción de la transcripción del modulador de la autofagia regulada por daños (DRAM, *Damage-Regulated Autophagy Modulator*), una proteína que se cree se localiza en la membrana lisosómica, o inhibiendo la actividad mTOR.^{35,36} Por otra parte, se ha demostrado que el p53 citoplasmático inhibe la inducción de la autofagia activando las mTOR.³⁵ Varios estudios han informado niveles elevados de proteínas y mRNA de p53 en tejido cerebral post mortem afectado con enfermedades neurodegenerativas y en varios modelos animales de enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer, y también en cultivos

tisulares, lo que sugiere que el p53 puede estar involucrado en la regulación de la pérdida neuronal en estas enfermedades.^{37,38}

Perspectivas futuras

El enorme interés científico en los mecanismos de muerte celular apoptóticos y autofágicos y sus implicaciones en las enfermedades neurodegenerativas ha producido avances significativos en nuestra comprensión de los procesos celulares y moleculares que controlan la vida y la muerte de las neuronas. Aunque muchas de las preguntas sobre el papel preciso de estas vías en las enfermedades neurodegenerativas en los seres humanos siguen sin respuesta, no hay duda de que una neurona muerta es una neurona disfuncional. Se necesitan más estudios para idear estrategias que restablezcan la función de las neuronas lesionadas antes de que mueran, independientemente de que las vías de muerte estén o no activadas.

Referencias

- Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med* 2008;12(6A): 2263–2280.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239–257.
- Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(8): 589–598.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999; 399(6738 Suppl): A7–14.
- Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (review). *Int J Mol Med* 200 ; 7(5): 455–478.
- Ribe EM, Serrano-Saiz E, Akpan N, Troy CM. Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem J* 2008; 415(2): 165–182.
- Zaidi AU, McDonough JS, Klocke BJ et al. Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60(10): 937–945.
- Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53(3): 451–465.
- Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm* 2009; 116(9): 1111–1162.
- Roth KA. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60(9):829–838.
- Zhao M, Su J, Head E, Cotman CW. Accumulation of caspase cleaved amyloid precursor protein represents an early neurodegenerative event in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2003; 14(3): 391–403.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O' Leary DD, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 2009; 457(7232): 981–989.
- Louneva N, Cohen JW, Han LY et al. Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2008; 173(5): 1488–1495.
- Albrecht S, Bogdanovic N, Ghetti B, Winblad B, LeBlanc AC. Caspase-6 activation in familial Alzheimer disease brains carrying amyloid precursor protein or presenilin I or presenilin II mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68(12): 1282–1293.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002; 296(5575): 1991–1995.
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 2004; 10(10): 1055–1063.
- Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(11): 891–898.
- Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443(7113): 780–786.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4(2): 151–175.
- Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 2006; 25(48): 6347–6360.
- Chu CT. Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65(5): 423–432.
- Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 2002; 11(9): 1107–1117.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 25009–25013.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441(7095): 885–889.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441(7095): 880–884.
- Yu WH, Dorado B, Figueroa HY et al. Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein. *Am J Pathol* 2009; 175(2): 736–747.
- Pivtoraiko VN, Stone SL, Roth KA, Shacka JJ. Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(3): 481–496.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16): 2881–2890.
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38(10): 1184–1191.
- Termer A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* 2007; 211(2): 134–143.
- Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(12): 1004–1010.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009; 16(7): 966–975.
- Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008; 4(5): 600–606.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006; 8(10): 1124–1132.
- Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10): 691–700.
- Crighton D, Wilkinson S, O' Prey J et al. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; 126(1): 121–134.
- Trimmer PA, Smith TS, Jung AB, Bennett JP Jr. Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. *Neurodegeneration* 1996; 5(3): 233–239.
- LaFerla FM, Hall CK, Ngo L, Jay G. Extracellular deposition of beta-amyloid upon p53-dependent neuronal cell death in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; 98(7): 1626–1632.