

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

**ENFERMEDADES NEURALES
Y NEURODEGENERATIVAS:
Nuevos avances moleculares
y farmacológicos**

Ciclo de conferencias organizado por el Instituto
de España en octubre de 2003



INSTITUTO DE ESPAÑA

Madrid, 2004

Portada:

Neuronas granulares de cerebelo en cultivo. En rojo inmunofluorescencia del receptor de nucleótidos P2X₁, en verde de Sinaptofisina y en amarillo la mezcla de los dos (Tesis de Cristina Hervás).

Para la elaboración de las figuras del texto he contado con la inestimable ayuda de Rosa Gómez Villafuertes.

ISBN: 84-85559-59-2

Depósito legal: M. 11.477-2004

Imprime: REALIGRAF, S. A.

Pedro Tezano, 26

28039 Madrid

Índice

	<u>Págs.</u>
Prólogo	7
Capítulo 1: Epilepsias	9
Enfermedades neurodegenerativas:	
Capítulo 2: Enfermedad de Alzheimer	61
Capítulo 3: Enfermedad de Parkinson	93
Capítulo 4: Esclerosis lateral amiotrófica	115
Capítulo 5: Enfermedad de Huntington	125

Prólogo

El conocimiento de las bases moleculares del funcionamiento neural, identificando las proteínas responsables y los genes que las codifican ha permitido una visión más amplia e integrada de la complejidad del sistema nervioso. La secuenciación del genoma humano y la aplicación de técnicas de genómica y proteómica están permitiendo analizar el funcionamiento neural en estados fisiológicos y en diferentes situaciones patológicas. En las enfermedades neurales descritas desde hace muchos años, como la epilepsia, la esquizofrenia, la depresión, etc., las neurodegenerativas como el mal de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, entre otras muchas, se constata al estudiarlas con las nuevas técnicas de biología molecular, que no constituyen una única entidad, si no un conjunto de variantes que van desde los casos más severos a los más benignos, con cursos evolutivos muy diversos y causas genéticas o ambientales dispares. En muchas de estas enfermedades se observa la existencia de una muerte neural temprana, aunque las causas sean aparentemente diversas, entre ellas el no poder responder a los requerimientos energéticos, o hacer frente a los problemas oxidativos, o de renovación y vida media de sus proteínas, o de su correcta localización topográfica.

El afán por paliar los efectos devastadores de las enfermedades neurales y neurodegenerativas ha sido el motor de la investigación en el sistema nervioso, que ha conducido a la comprensión de los mecanismos básicos de su funcionamiento, tanto en requerimientos energéticos

y metabolismo, como en las propiedades excitables de sus membranas, o los aspectos únicos de su desarrollo y mantenimiento funcional. El conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades neurales, sean o no neurodegenerativas, ha facilitado la búsqueda de fármacos más específicos con menos efectos secundarios y ha confirmado el valor y utilidad de algunos fármacos empleados desde antaño, al descubrir la diana exacta de su acción. En un futuro, gracias a la genómica y farmacogenómica, se podrá conocer si las dianas farmacológicas y los transportadores y enzimas necesarios para su correcta farmacocinética son normales o están específicamente alteradas en un paciente dado, pudiendo de este modo adecuar el tipo de fármaco y su dosificación a la capacidad catabólica del propio individuo. Pero estos datos optimistas derivados del incremento en el conocimiento básico, no pueden ocultar que la mayoría de las dianas recientemente incorporadas para su desarrollo farmacológico para las que se buscan fármacos específicos (¿si estos existen?), tienen muy amplia distribución y otras muchas funciones en el organismo en general y el sistema nervioso en particular. Los efectos secundarios derivados de interferir en otros procesos alejados de la diana específica de acción necesitan ser evaluados para sopesar si vale la pena correr riesgos con medicaciones cuando menos inciertas.

No pretende esta monografía convertirse en un tratado exhaustivo de todas las alteraciones del funcionamiento neuronal y sus enfermedades asociadas, si no analizar de modo integrado los datos más relevantes en enfermedades de alta incidencia y repercusión social, así como en aquéllas que introduzcan elementos novedosos en la renovación y evolución del pensamiento.

CAPÍTULO 1

Epilepsias

INTRODUCCIÓN

El análisis de los diferentes tipos de epilepsias, y sus causas ha sido expresamente seleccionado para ser estudiado en esta breve monografía, pues permite analizar los mecanismos básicos de mantenimiento de la neurona y su comunicación con las neuronas adyacentes. Su ubicación, en primer lugar, se ha realizado teniendo en cuenta que desde un punto de vista didáctico permite entrever los delicados mecanismos del funcionamiento neural y cómo en la mayoría de los casos existe una base genética para comprender las alteraciones correspondientes a cada patología. En el caso de las epilepsias son las mutaciones generalmente mínimas, de la secuencia proteica de canales iónicos, ya sean dependientes de voltaje, o dependientes de ligando, sin descartar la formación correcta de las conexiones neuronales en el desarrollo, lo que lleva a la aparición de las crisis convulsivas.

Las epilepsias, de las que se han descrito hasta unas 40 variantes, se encuentran entre los desórdenes neurológicos más fácilmente observables, y por ello descritos desde la antigüedad. Ya los griegos relacionaron ciertos tipos de movimientos convulsivos y pérdida del conocimiento con lesiones cerebrales, en algunos casos deducibles por la presencia de fuertes traumatismos en la cabeza en donde las anomalías del movi-

miento eran más frecuentes en la parte contralateral del cuerpo. En la edad media los ataques epilépticos se atribuían a posesión o influencia demoníaca y habría que esperar hasta mediados del siglo XIX para desarrollar un estudio sistemático y científico de la enfermedad, y clasificar los diferentes tipos según su intensidad y sus causas. Hoy en día, gracias a los avances de la genética y la biología molecular, se intenta asociar con cada tipo o subtipo de epilepsia una determinada proteína, generalmente con función en la membrana plasmática, cuya alteración pueda dar cuenta de la hiperactividad y/o pérdida de control de las neuronas afectadas. Esta aproximación no es válida en el caso de las epilepsias post-traumáticas, en las que es la propia lesión y/o los intentos del organismo por repararla lo que lleva a la aparición del foco epiléptico, sin necesidad de que incidan aspectos genéticos.

La farmacología de la epilepsia ha sido uno de los grandes logros terapéuticos, aun en ausencia de un conocimiento exacto de las causas de la enfermedad. Actualmente el arsenal de fármacos antiepilépticos disponible es inmenso y su eficacia probada, pero un análisis genómico de los elementos más corrientemente implicados podría proporcionar una perfecta exactitud en el diagnóstico y la adecuación de la terapéutica a emplear.

Finalmente, el conocimiento básico de las disfunciones que llevan a la epilepsia es el mismo necesario para comprender mediante qué mecanismos podríamos proteger los tejidos neurales en situaciones comprometidas y actualmente muchos neuroprotectores proceden de la farmacología previamente desarrollada en la búsqueda de antiepilépticos.

TIPOS DE EPILEPSIAS

Los ataques epilépticos para ser considerados como tal tienen que tener el carácter de repetitivos con una cierta periodicidad, a pesar de su amplia variabilidad y etiología se pueden clasificar desde el punto de vista clínico en dos grandes grupos: con **ataques parciales** y **ataques generalizados**, lo que facilita en un primer momento su análisis y la tipificación del tratamiento farmacológico inicial. *Es de destacar que en*

Epilepsias

numerosas situaciones de estrés neural, como pueden ser: escasez de oxígeno, escasez de glucosa, tóxicos neurales hiperestimulantes, o incluso envenenamiento con pesticidas y otros tóxicos, pueden producirse convulsiones similares a las presentes en las crisis epilépticas. No obstante aunque sus mecanismos a nivel celular puedan ser coincidentes, no se consideran crisis epilépticas, pues carecen de la periodicidad y repetición que define el estado epiléptico.



Figura 1.—Tipos de epilepsias.

Las clasificaciones de las epilepsias pueden realizarse de acuerdo con diversos criterios, uno de ellos se basa en la localización del foco epiléptico. Si este foco tiene una localización precisa en la corteza, desde donde se propagan las ondas más activas en el electroencefalograma durante un ataque epiléptico, y solamente se observa la actividad en uno de los hemisferios cerebrales, el tipo se denomina como **epilepsia parcial**. Puede ocurrir que la actividad del foco se propague hasta zonas más profundas y desde ahí vuelva a la corteza de modo generalizado, se define este tipo como **epilepsia generalizada secundaria**. Si el foco no está localizado en la corteza y se encuentra en las zonas talámicas más profundas, las ondas de propagación durante el ataque epiléptico alcanzan los dos hemisferios y se conoce como **epilepsia generalizada primaria**.

El electroencefalograma realizado en pacientes con ataques epilépticos constituye una valiosa herramienta de diagnóstico, pues nos indica la mayor o menor actividad eléctrica en zonas específicas de la corteza cerebral. En principio los electrodos adheridos al cuero cabelludo se colocan unos en disposición coronal, para captar la actividad de las diferentes secciones del cortex, y otros de modo sagital en la separación de los dos hemisferios cerebrales. Las actividades eléctricas registradas en el electroencefalograma proceden de la mayor o menor actividad de las terminales sinápticas que estimulan las dendritas apicales de las células piramidales del cortex cerebral.

Los **ataques epilépticos parciales** se originan dentro de un pequeño grupo de neuronas conocido como foco epiléptico, con localización en

uno de los hemisferios cerebrales, la zona más activa del cortex puede ser localizada con la ayuda del electroencefalograma. Si la actividad del foco es suficientemente intensa puede extenderse a otras células alcanzando otras regiones cerebrales. Los caminos cerebrales que recorre no son arbitrarios, sino que siguen las vías propias neurales que están generalmente organizadas en columnas verticales y están limitados a uno de los hemisferios cerebrales. En algunos casos este foco epiléptico localizado en la corteza, al enviar la señal hacia las zonas talámicas más profundas, puede originar una redifusión desde estas mismas zonas y producirse una epilepsia generalizada afectando a los dos hemisferios.

Los **ataques epilépticos generalizados** se denominan así porque muestran una alteración de la actividad normal del cerebro en ambos hemisferios cerebrales de modo simultáneo. En este tipo de epilepsias el foco de propagación se encuentra generalmente en zonas más profundas del cerebro y proviene de los circuitos subcorticales-talámicos, que tienen una proyección en el cortex más difusa.

La clasificación inicial basada en las características observables de las convulsiones, tanto directamente como de la información obtenida mediante el electroencefalograma, es solamente una primera fase del diagnóstico, pues **la mayoría de las epilepsias tienen una base genética**. Se puede generalizar que todas las proteínas implicadas en lo que afecta el mantenimiento del gradiente iónico de la membrana, ya sea su funcionalidad o su recuperación, así como el establecimiento de los contactos sinápticos correctos y el aislamiento de los axones, podría llevar a la aparición de descargas rítmicas, descontroladas, capaces de propagarse y originar las convulsiones típicas de la epilepsia.

Para comprender las bases genéticas de la epilepsia es necesario conocer cómo funciona una neurona y cómo establece sus contactos sinápticos, que serán analizados en el siguiente epígrafe.

FUNCIONAMIENTO DE LAS MEMBRANAS NEURALES, RELACIÓN CON LA EPILEPTOGÉNESIS

En cualquier ataque epiléptico, sea del tipo que sea, existe siempre una actividad incrementada en un grupo de neuronas denominadas hiperexcitables. Para explicar esta hiperexcitabilidad neuronal es necesario conocer los mecanismos básicos que mantienen la funcionalidad y la integridad de la membrana plasmática, así como los mecanismos que regulan la zona funcional pre y post sináptica (Avanzini y Franceschetti, 2003).

La membrana plasmática de la neurona requiere para su función de la existencia de un gradiente iónico, es decir, de la distribución desigual de iones a un lado y a otro de la membrana. Fuera de la célula se encuentran los iones Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- , en mayor concentración, mientras que dentro de la célula es más abundante el K^+ .

El mantenimiento del gradiente iónico a un lado y otro de la membrana requiere de un gasto de energía en forma de ATP, que permite funcionar a las bombas de la membrana plasmática, que son en realidad enzimas que intercambian iones a ambos lados de la membrana. La ATPasa de membrana mejor conocida es la bomba sodio potasio, que intercambia tres sodios de dentro por dos potasio de fuera por cada molécula de ATP consumido, lo que permite restaurar el gradiente después de una despolarización. Entre los primeros compuestos utilizados en animales de experimentación para provocar convulsiones y así ensayar el efecto de fármacos antiepilépticos, se encontraban sustancias que impedían la obtención de ATP por el metabolismo aerobio, como era el fluorocitrato que inhibe el ciclo de Krebs, lo que impedía la formación del gradiente de membrana. Con este mismo objetivo de impedir la restauración del gradiente se ha empleado la ouabaina, que es un inhibidor de la Na,K-ATPasa. Otra proteína de membrana importante en el funcionamiento neural, que puede estar alterada en algunos tipos de epilepsias es el intercambiador Na^+/H^+ , que permite mantener el pH intracelular.

La propagación del impulso eléctrico en las neuronas se inicia por la apertura transitoria de un canal de sodio dependiente de voltaje, con

entrada de Na^+ , lo que induce la apertura de los canales de K^+ y salida de este ión a favor de su gradiente. El avance de los potenciales de acción al llegar a la zona sináptica induce la entrada de calcio mediante los canales de calcio acoplados a voltaje y es la entrada masiva de este ión la que produce finalmente la salida mediante el mecanismo de exocitosis de los neurotransmisores y su acción sobre la neurona post-sináptica. Los neurotransmisores cuyo papel parece relevante en la epilepsia, son aquellos que tienen receptores ionotrópicos, es decir, que permiten la entrada a las neuronas de diferentes iones, ya sea Na^+ y/o Ca^{2+} , produciendo una despolarización, o Cl^- favoreciendo la hiperpolarización de la membrana. De hecho la mayor parte de las epilepsias idiopáticas en humanos donde se ha podido identificar el gen responsable de la enfermedad, pertenecen a mutaciones en proteínas constituyentes de los canales o de los receptores ionotrópicos, presentes en la membrana plasmática.



Figura 2.—Aspectos funcionales de la membrana plasmática de la neurona.

El correcto funcionamiento de la membrana neuronal es esencial para la comunicación en el sistema nervioso y requiere de múltiples sistemas que pueden mantener, alterar o restaurar los gradientes iónicos en función de las señales. En primer lugar están las **bombas iónicas**, que son enzimas de membrana capaces de intercambiar iones, la más conocida es la ATPasa Na/K, que restaura el gradiente iónico después de una despolarización, para funcionar requiere energía en forma de ATP y por lo tanto de un correcto funcionamiento del metabolismo neuronal. Las proteínas, clave en la señalización y responsables en mayor medida de las epilepsias de origen familiar, son los **canales iónicos**. Se clasifican en dos grandes grupos, según sea el mecanismo que induce su apertura. Si para abrirse se requiere de un neurotransmisor, al que por unirse se le denomina de forma genérica ligando, se los conoce como **canales operados por ligando**, si por el contrario para abrirse se requiere de un cambio en el potencial de la membrana se les conoce como **canales operados por voltaje**. Es de destacar que cada grupo incluye una amplia variedad de proteínas, que se van a denominar según sea la selectividad de paso de sus iones respectivos, o el ligando que induce su apertura.

EPILEPTOGÉNESIS RELACIONADA CON LA NEUROTRANSMISIÓN RÁPIDA: CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE LIGANDO Y DE VOLTAJE

Las enfermedades hereditarias estuvieron durante muchos años limitadas a las enfermedades del metabolismo, conocidas como errores congénitos del metabolismo, pero poco a poco el campo de las enfermedades hereditarias ha ido incluyendo mutaciones de los receptores, de proteínas del citoesqueleto, y más recientemente de los canales iónicos de la membrana y otras proteínas con función transportadora o de diferenciación tisular (Lehmann-Horn y Jurkat-Rott, 1999). La existencia de mutaciones en los canales iónicos en las epilepsias de origen familiar es un hecho constatado en la gran mayoría de los casos, generalmente la transmisión de la enfermedad, que se corresponde a una alteración monogénica es autosómica dominante (Scheffer y Berkovic, 2003). En modelos de ratón en los que se han introducido las mutaciones correspondientes a los genes humanos, o bloqueado su función, se constatan los mismos o similares síntomas epilépticos. El modelo de ratón ha sido muy útil para identificar qué tipos de canales y receptores ionotrópicos son esenciales en la generación de disfunciones neurales que cursan con epilepsia y predecir qué podemos encontrarnos en humanos que sufren epilepsia en un futuro (Meisler et al., 2001). Una excelente revisión del tema de las patologías de los canales iónicos (canalopatías) en castellano ha sido realizada por el Profesor Tamargo (2003).

A) Canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales de sodio dependientes de voltaje están constituidos por una subunidad α de gran tamaño, 260kD, que es esencial para la función y mantiene la estructura del canal, y dos subunidades auxiliares la β_1 y β_2 (SCN1B y SCN2B) que son moduladoras. De la subunidad α existen al menos 10 genes diferentes en el genoma humano. Esta subunidad contiene cuatro subdominios repetidos en donde cada uno de ellos contiene seis hélices transmembranares. Para evitar el empleo de letras griegas los genes de las subunidades alfa se denominan SCN1A al SCN10A (Sodium ChanNel) y tienen distribuciones tisulares, e in-

cluso subcelulares diferentes, siendo muy abundantes en el sistema nervioso central y periférico, así como en músculo esquelético. Los efectos de cada una de sus mutaciones dependen no solamente de la gravedad de la mutación si no también de su localización a nivel tisular y distribución en una célula dada. En el sistema nervioso central se expresan abundantemente las subunidades SCN1A, SCN2A, SCN3A que presentan hasta 85% de homología y se encuentran consecutivamente agrupadas en el cromosoma 2; también es abundante la SCN8A. Como era de esperar todas estas subunidades son especialmente relevantes en la epileptogénesis.

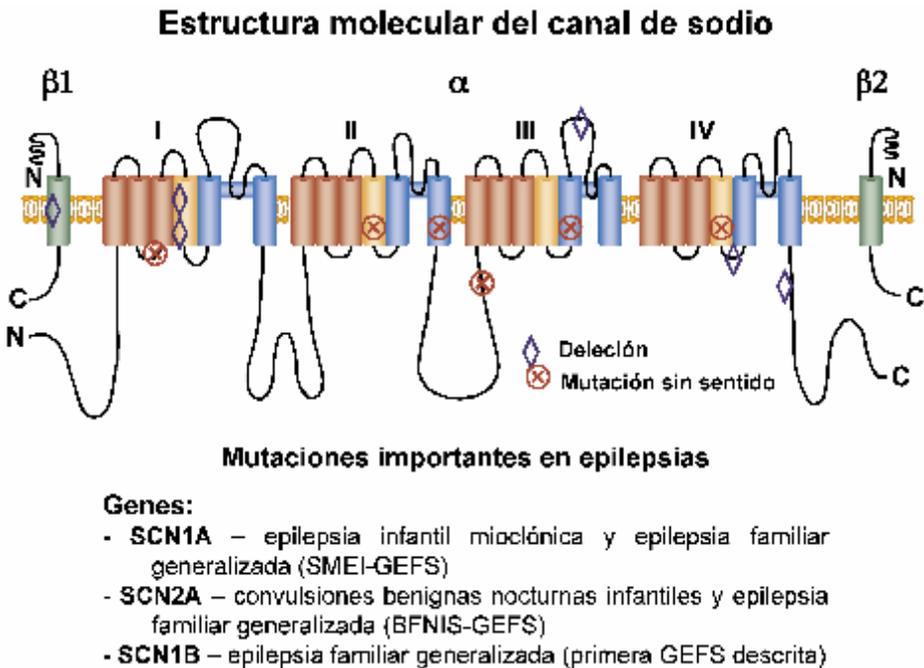


Figura 3.—Estructura molecular del canal de sodio.

Los canales de sodio están constituidos por varias subunidades, la más importante y formadora del canal central por donde pasa el sodio es la **subunidad α** que contiene cuatro subdominios similares con seis hélices cada uno. Existen varias isoformas de esta subunidad que son el producto de los 10 genes conocidos hasta el momento como SCN1A hasta el SCN10A. Otras subunidades necesarias para el funcionamiento del canal de sodio son las **subunidades β1 y β2**, que tienen una función moduladora sobre el tiempo de apertura del canal, sus genes se conocen con la denominación SCN1B o SCN2B. En algunas epilepsias familiares existen alteraciones en los genes SCN1A, SCN2A y también en el SCN1B. Al corresponder a un fallo genético se manifiestan como epilepsias generalizadas primarias, cuya gravedad depende del tipo de mutación.

Las primeras evidencias de que mutaciones en el canal de sodio estaban implicadas en la epilepsia, provienen del estudio realizado en una familia australiana con alta incidencia de epilepsia generalizada con crisis inducibles por la fiebre (GEFS+1) y descubiertas en 1998 (Wallace et al., 1998). En este caso la alteración se encontraba no en cualquiera de las subunidades α presentes en cerebro, si no en la subunidad $\beta 1$, SCN1B. La mutación en esta subunidad produce una proteína incapaz de modular las subunidades SCNA, que permanecen más tiempo abiertas, permitiendo una mayor entrada de Na^+ y facilitando la despolarización de las membranas neurales con más facilidad. Esta proteína es muy abundante en las zonas postsinápticas donde modula la subunidad grande de los canales, la SCN1A.

El segundo hallazgo de mutaciones en canales sodio relacionados con epilepsias se correspondía también con epilepsias generalizadas inducibles por la fiebre (GEFS+2) y eran debidas a diversas mutaciones en el gen SCN1A, que fue el primer canal de sodio voltaje dependiente identificado, es muy abundante en el sistema nervioso y suele tener una localización eminentemente postsináptica. En las SCN1A presentes en los individuos epilépticos con GEFS+2, las mutaciones producen canales que se recuperan muy rápido y pueden ser activados de nuevo sin que exista el tiempo refractario entre una apertura y la siguiente (Escayg et al., 2000).

Este mismo gen, el SCN1A, está implicado en la epilepsia mioclónica severa de la infancia (SMEI), existen varias posibles mutaciones, pero en este caso la proteína mutada ha perdido por completo su función, ya sea porque el mensajero ha introducido un codón sin sentido, o no puede leerse y ser traducido, o porque la proteína está truncada. Muchas de estas mutaciones son de novo y no existen en los padres, además basta con que una de las dotaciones, paterna o materna, tengan el correspondiente alelo para que se produzca la enfermedad, lo que originaría una deficiencia cuantitativa en la proteína funcional.

Mutaciones en el gen SCN2A también aparecen en algunas epilepsias generalizadas inducibles por la fiebre (GEF+2), en edades tempranas. Este canal es más abundante en la zona presináptica y las mutacio-

nes conocidas cursan con una entrada sostenida de sodio, lo que favorece la despolarización presináptica. Por el momento no se han detectado familias con alta incidencia de epilepsia en las que estén alterados los canales de sodio conteniendo las subunidades SCN3A y SCN8A, aunque su expresión es muy abundante en el sistema nervioso.

Referente a los canales de sodio es necesario constatar dos aspectos importantes: 1) Que algunas epilepsias que presentan síntomas similares (GEF+) pueden ser ocasionadas por mutaciones en genes diferentes, como es el caso con los genes: SCN1A, SCN2A, SCN1B. 2) Que mutaciones de un mismo gen, pero con diferente localización en la secuencia, y dependiendo de su gravedad, pueden producir distintos tipos de epilepsias, a tenor de los síntomas, como son las diversas mutaciones conocidas del gen SCN1A (GEF+2, SMEI).

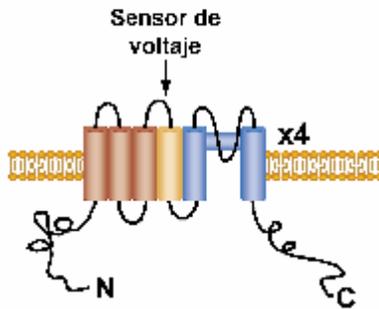
B) Canales de potasio dependientes de voltaje

Existen múltiples tipos de canales de potasio que se diferencian en su estructura, mecanismos de activación, mecanismos de regulación y farmacología. El amplio conocimiento de estos canales se debe al esfuerzo del grupo dirigido por Roderick McKinnon de la Universidad Rockefeller de Nueva York, quien ha sido galardonado con el Premio Nobel de química del año 2003. Desde el punto de vista de la estructura, los canales de potasio tienen una gran variabilidad, lo que se utiliza para realizar una primera clasificación, en primer lugar los que contienen seis hélices transmembranares, con la invaginación que forma parte del poro, se requieren cuatro de estas unidades para formar el tetrámero funcional, de hecho la estructura es similar a uno de los subdominios de la subunidad alfa del canal de sodio o calcio (Morais-Cabral et al., 2001; Yellen, 2002; Jiang et al., 2003). Existen otros constituyentes del canal de potasio que son aparentemente mucho más simples, pues contienen solamente dos hélices transmembrana y los elementos del poro, así como otros con cuatro hélices en donde existen dos elementos para formar el poro. Estos canales de potasio, aparentemente más simples, suelen estar unidos a elementos reguladores de gran tamaño, baste recordar aquí los canales de potasio dependientes de ATP que regulan la secreción de

insulina en las células beta pancreáticas, los cuales son regulados por la subunidad de gran tamaño sensible a las sulfonilureas hipoglucemiantes y todos sus análogos.

Centrándonos en los canales de potasio con más interés en las epilepsias, nos encontramos con los canales dependientes de voltaje denominados Kv y los denominados KCNQ. Todos ellos tienen una estructura 6 hélices transmembrana y un elemento formador de poro, necesitando formar un tetrámero para ser funcionales. La familia de canales de tipo Kv contiene muchos miembros, pero hasta el momento para el único que se ha encontrado una relación con posibles convulsiones, es el KCN1A, que se encuentra

Estructura molecular de los canales de potasio dependientes de voltaje



Mutaciones importantes en epilepsias

Genes:

- **KCNQ2 y KCNQ3** – convulsiones benignas neonatales (BFNS)
- **KCNA1** – ataxias episódicas tipo 2 (EA)

Figura 4.—Estructura molecular del canal de potasio dependiente de voltaje.

Es importante señalar la gran diversidad de canales de potasio existentes en nuestro organismo. La clasificación se realiza según el número de hélices transmembrana y elementos formadores de poro. En las epilepsias familiares, por el momento, solamente se han demostrado mutaciones en los canales de potasio dependientes de voltaje que tienen una estructura general de seis hélices transmembranares y un elemento formador de poro por subunidad, necesiándose cuatro de estas subunidades para formar un canal funcional. Los genes para los que se han encontrado mutaciones son el KCN1A y los de la familia KCNQ (KCNQ2 y KCNQ3).

implicado en la recuperación del potencial de acción, la pérdida de función de este canal se traduce curiosamente en una entrada más prolongada de sodio, al no poder contrarrestar la entrada de este ión (Biervert et al., 1998). En ratones con inactivación dirigida específicamente a este gen se producen convulsiones espontáneas desde escasas semanas de vida hasta el final. En humanos las mutaciones de este gen resultan en episodios de ataxia y una predisposición a sufrir convulsiones, aunque no se observan las crisis convulsivas repetidas en las epilepsias clásicas. El otro tipo de canales KCNQ, es también una amplia familia, cuyos miembros tienen la característica de controlar la excitabilidad neuronal a través de la corriente denominada de tipo M, que controla el límite inferior del umbral para excitar la membrana y la respuesta sináptica (Avanzini y Franceschetti, 2003). Curiosamente la corriente se denomina M, porque la muscarina, agonista de los receptores metabotrópicos de acetilcolina de ese tipo, eran capaces de inhibir la acción de estos canales. *De entre los miembros de la familia de canales de potasio KCNQ, son el KCNQ2 y KCNQ3 para los que se han encontrado mutaciones que resultan en la aparición de las denominadas convulsiones neonatales benignas de origen familiar.*

C) Canales de calcio dependientes de voltaje

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CACN) tienen una estructura similar a la de los canales de sodio dependientes de voltaje, con una subunidad $\alpha 1$ de gran tamaño, conteniendo cuatro dominios, cada uno de ellos con seis hélices transmembrana y un elemento formador de poro, esta subunidad es el eje central del canal, al que se pueden unir otras tres subunidades auxiliares, que son las β , γ , y la $\alpha 2\delta$. De cada una de estas subunidades existen varios genes, cuyos productos proteicos al combinarse originan un gran número de isoformas del canal, cada una con propiedades y localización tisular específicas.

La familia de la subunidad $\alpha 1$ contiene al menos ocho genes diferentes, y la nomenclatura actual de los genes es la de CACNA1, a lo que se añade una letra posterior para designar el miembro de la familia: CACNA1A, CACNA1B, CACNA1C, etc... *En el cerebro son especial-*

mente relevantes las subunidades $\alpha 1$ que son el producto proteico del gen CACNA1A que origina los canales de calcio denominados tipo P/Q. La proteína de la forma P y la de la forma Q proceden del mismo gen por procesamiento alternativo del ARN mensajero (Beam, 1999). Es en esta subunidad donde se han realizado más cambios para producir modelos experimentales en ratón, y muy exitosos, aunque en humanos es más difícil de analizar, sobre todo teniendo en cuenta la complejidad de la señal de calcio y sus múltiples funciones como mensajero intracelular. En humanos, anomalías en este gen producen una amplia variedad de síntomas, según cuál sea el aminoácido cambiado, y van desde migraña y ataxia hasta epilepsia. Mutaciones en este gen CACNA1A parecen ser la causa más frecuente de las epilepsias generalizadas no convulsivas, conocidas como crisis de ausencia en niños y adolescentes.

Otras subunidades del canal de calcio abundantes en cerebro son la CACNA1B y la CACNA1E, de ambas se han obtenido mutantes de ratón que presentan disfunciones neurológicas y convulsiones, pero su implicación en las epilepsias familiares humanas es más discutida. La CACNA1B codifica la subunidad central del canal de calcio voltaje dependiente conocido como canal de tipo N (neural), justamente uno de los más abundantes en la terminal sináptica. La subunidad CACNA1E forma los canales R/T y su función está menos delimitada. Sorprendentemente veremos más adelante que la farmacología antiepiléptica actual dirigida a los canales de calcio, tiene en el canal tipo T su diana preferente.

No podemos olvidar que el canal de calcio tiene otras subunidades auxiliares, tanto en la misma membrana plasmática, como en la parte citoplasmática de la célula. En modelos de ratón, la alteración de alguna de estas subunidades lleva a la aparición de convulsiones y otras anomalías neurológicas. En un amplio estudio en humanos con epilepsias generalizadas suaves con crisis de ausencia y escasas convulsiones se han localizado anomalías en el gen CACNB4, que codifica la subunidad intracelular β tipo 4 que modula la apertura de los canales de calcio.

Una excelente revisión en castellano dedicada a la importancia de los canales de calcio en ataxia y epilepsia es la reciente publicación de Sandoval-Romero y Félix-Grijalva (2003).

D) Canales de cloruro. Receptores GABA_A

Aunque existen varias familias de canales de cloruro, a efectos de desarrollar epilepsias solamente nos interesan los receptores de GABA_A, que son canales de cloruro operados por ligando. El ligando que abre el canal es el ácido γ -amino-butírico, denominado GABA, el cual es un transmisor nervioso muy abundante en el sistema nervioso central, que se produce a partir del ácido glutámico por descarboxilación del grupo inicial. La apertura del canal permite la entrada de iones cloruro, lo que incrementa la carga negativa interna con respecto al medio extracelular, lo que resulta en un incremento del potencial de membrana. Esta hiperpolarización hace más difícil la estimulación neural y el inicio de un potencial de acción, por ello se dice que el GABA es un neurotransmisor inhibidor.

El receptor ionotrópico GABA_A tiene una estructura pentamérica, entrando en la composición tres tipos de subunidades distintas, las α , β , y γ , de cada una de ellas existen varios miembros que constituyen una familia. Los genes de las subunidades α se denominan GABRA y un número para indicar el subtipo, para la subunidad β se denominan GABRB y un número para indicar el subtipo, y de idéntico modo para los genes de la subunidad γ se denominan GABRG. La composición de los receptores en cerebro es muy diversa y depende de la etapa del desarrollo, del tipo neural, e incluso de la zona de la célula, siendo diferentes los receptores presentes en el soma neural, a los localizados en las dendritas, o en la zona pre o post-sináptica. *La abundante presencia en cerebro de los subtipos de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, y $\gamma 2$, del receptor GABA_A indujeron a realizar un estudio masivo de sus posibles mutaciones en familias con epilepsia hereditaria. Las primeras mutaciones encontradas correspondían a familias australianas y francesas con crisis generalizadas inducidas por fiebre (GEFS+3), en las cuales se encontraron diversas mutaciones en la subunidad $\gamma 2$, que es el producto proteico del gen GABRG2. En otro tipo de epilepsia conocido como síndrome de Angelman, la subunidad afectada es la $\beta 3$, que es el producto del gen GABRB3. Recientemente se han encontrado mutaciones en la subunidad $\alpha 1$, que es el producto del gen GABRA1. Estas mutaciones se han encontrado en pacientes que sufren epilepsia mioclónica juvenil (JME) que se transmite de modo autosómico dominante y afecta aproximadamente al 7% del total de adolescentes y*

pacientes adultos con epilepsia generalizada (Cóssette et al., 2002; Wallace, 2002; Avanzini y Franceschetti, 2003).

Otro aspecto de los receptores de GABA, que apenas se ha estudiado es la posible relación de los receptores metabotrópicos GABA_B con

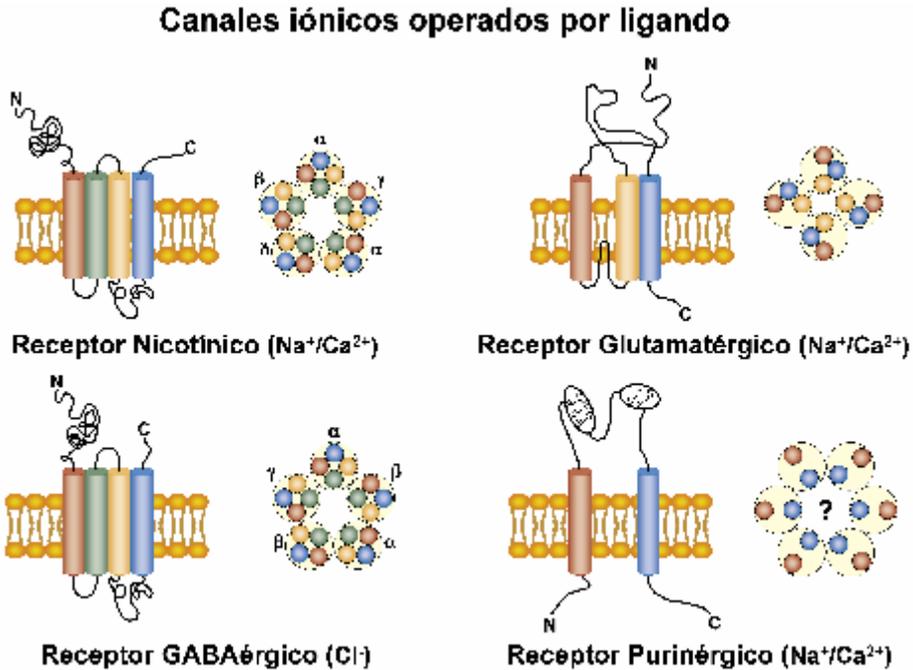


Figura 5.—Canales iónicos operados por ligando: Principales familias.

Las anomalías en los canales iónicos operados por ligando, también conocidos como **receptores ionotrópicos**, pueden producir epilepsias de origen familiar. Entre los receptores mejor conocidos están los receptores ionotrópicos de acetilcolina, conocidos como **receptores nicotínicos**. Estos receptores son generalmente heteropentaméricos, y dejan pasar Na⁺ y Ca²⁺ con diferente selectividad según las subunidades que los compongan. Las mutaciones correspondientes al receptor nicotínico fueron las primeras descubiertas en la epilepsia de origen familiar.

Los receptores **ionotrópicos de GABA** son muy similares estructuralmente a los nicotínicos, aunque su permeabilidad es exclusiva para el ión cloruro, que son los receptores controlados por el neurotransmisor GABA. Se conocen epilepsias familiares donde están mutadas las subunidades del receptor ionotrópico de GABA (GABA_A).

A pesar de la importancia de los **receptores ionotrópicos de glutamato** (AMPA, Kainato y NMDA), no se conocen anomalías genéticas relacionadas con la epilepsia familiar, aunque sí con el incremento de su funcionalidad en reorganizaciones neuronales post-traumáticas.

Los receptores **ionotrópicos de ATP, purinérgicos P2X**, son los recién llegados al mundo de los neurotransmisores, por el momento no se conocen anomalías relacionadas con la epilepsia en esta amplia familia.

la epilepsia. Estos receptores son de siete hélices transmembranares acoplados a proteínas G, su localización es ampliamente presináptica, en donde modulan los canales de potasio, incrementando su conductancia, de este modo la entrada de calcio a las terminales se reduce. La disminución en la entrada del ión calcio reduce a su vez la liberación excitotónica de los neurotransmisores. Se puede pensar que una alteración en estos receptores GABA_B podría eliminar el efecto modulador negativo y ser una causa potencial de epileptogénesis. Por el momento no se han encontrado mutaciones específicas, pero son imaginables en el esquema general del control sináptico. Recientemente se ha descubierto que los receptores GABA_B son poderosos moduladores de la respuesta de receptores ionotrópicos presinápticos de ATP (P2X) y de dinucleótidos (receptores de Ap5A), lo cual es un nuevo factor a tener en cuenta en futuros estudios de sensibilidad sináptica y facilitación del estímulo (Gómez-Villafuertes et al., 2003, 2004).

Finalmente la acción sobre receptores de GABA requiere la liberación de este neurotransmisor de sus neuronas específicas. Las neuronas GABAérgicas tipo 2 son muy abundantes en el cortex, y controlan negativamente la actividad de las neuronas piramidales, de hecho antagonistas del receptor GABA_A, como la bicuculina, picrotoxina y penicilina, son agentes epileptogénicos que se usan en experimentación animal. En el cortex de pacientes con epilepsias refractarias a los fármacos se ha encontrado en algunos casos un número reducido de neuronas GABAérgicas, también es posible que en otros tipos de epilepsias sean los circuitos GABAérgicos del cerebro medio y ganglios basales los que tengan una hipofunción. *Este nuevo elemento de una reducción en los niveles de GABA es un concepto importante, pues se empiezan a asociar las epilepsias no solamente con fallos a nivel de la membrana y sus componentes excitables, sino con niveles cuantitativos del propio transmisor debido a un menor número de neuronas por fallos en el desarrollo de las propias neuronas, por factores tróficos y/o morfogenéticos. De este modo, un sector de las las epilepsias entrarían en el amplio grupo de enfermedades asociadas con fallos en el desarrollo neural.*

E) Receptores ionotrópicos de acetilcolina. Receptores nicotínicos

Los receptores ionotrópicos de acetilcolina fueron los primeros purificados de los canales operados por ligando. Son estructuras pentaméricas con una amplia variedad de subunidades. Los receptores nicotínicos cerebrales contienen fundamentalmente las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 4$ combinadas con la $\beta 2$, también muy abundante en cerebro son los receptores pentaméricos constituidos por cinco subunidades $\alpha 7$, son por tanto homoméricos. Los receptores nicotínicos neurales son permeables fundamentalmente al ión calcio y en menor medida al sodio y potasio, al contrario de los receptores nicotínicos de la unión neuromuscular. *Mutaciones en las subunidades del receptor nicotínico $\alpha 4$ y $\beta 2$, codificadas en los genes CHRNA4 y CHRNB2, han sido encontradas en la epilepsia transmitida de modo autosómico dominante conocida como epilepsia nocturna del lóbulo frontal. La mutación del gen CHRNA4, que produce la subunidad $\alpha 4$, tiene el privilegio de haber sido la primera mutación descubierta para la epilepsia humana (Steinlein et al., 1995; Meisler et al., 2001). Estas mutaciones se traducen generalmente en una menor velocidad de inactivación y mayor entrada de calcio.*

Otro aspecto importante es que estos receptores nicotínicos se pueden encontrar localizados en la zona presináptica, junto con receptores ionotrópicos de ATP, y realizar un bucle estimulación/secreción continuo, sin control, en las neuronas colinérgicas (Díaz-Hernández et al., 2002).

F) Receptores ionotrópicos de aminoácidos excitadores

Los aminoácidos glutámico y aspártico, sobre todo el ácido glutámico, son los principales aminoácidos neurotransmisores excitadores de prácticamente todas las áreas cerebrales, incluido el cortex. Existen muchos subtipos de receptores de glutamato, en primer lugar la gran subdivisión entre receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Los receptores metabotrópicos, a pesar de su gran número y amplia distribución, juegan papeles moduladores y no parecen estar implicados en la epilepsia, o en todo caso de un modo muy indirecto. Por el contrario, los

receptores ionotrópicos han recibido especial atención en las epilepsias, ya que entre las toxinas más eficaces para producir convulsiones y generar modelos epilépticos, se encuentran el kainato, domoato, AMPA, NMDA y toda una serie de agonistas de estos receptores ionotrópicos de glutamato, sirviendo incluso como herramientas eficaces para caracterizar y clasificar estos receptores.

Los receptores ionotrópicos de glutamato se clasifican en tres familias AMPA, kainato y NMDA. Cada una de estas familias está constituida por una serie de subunidades específicas, que se asocian para formar el poro del canal iónico. Los genes de la familia AMPA se denominan GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4. Los genes de la familia Kainato son los GluR5, GluR6, GluR7, que presentan una marcada homología con los anteriores y además los genes KA1 y KA2, que para ser funcionales necesitan interactuar con los anteriores. Los genes de la familia NMDA se denominan NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D y el NR3A, es probable que todos los receptores NMDA que funcionan en cerebro sean heteroméricos, por la combinación de estas subunidades (Dingledine y McBain, 1999).

Por el momento en las epilepsias familiares humanas estudiadas, no se ha encontrado ninguna alteración relacionada con estos genes de receptores ionotrópicos de glutamato. No obstante en modelo de ratón se ha demostrado que una alteración en el procesamiento del RNA-mensajero de los receptores de AMPA y Kainato (GluR2 y GluR6), que lleva a codificar en el transcrito una arginina por una glutamina (Q/R), produce cambios significativos en las propiedades de permeación del poro y epilepsia severa en el ratón (Meisler et al., 2001).

La distribución de los receptores ionotrópicos de glutamato es desigual en el sistema nervioso, y dentro de la propia neurona. La composición de subunidades de los receptores ionotrópicos determina la permeabilidad de los iones, su selectividad y su cinética. Los receptores de AMPA y Kainato son permeables fundamentalmente a sodio y son los primeros en ser activados por el agonista. Los receptores de NMDA son permeables a sodio y calcio, pero están generalmente bloqueados por iones de magnesio en el interior, de modo voltaje dependiente, y sola-

mente abren su poro iónico si la neurona ha sido previamente excitada y despolarizada, lo que favorece la salida del magnesio del lugar de bloqueo.

Los receptores de NMDA tienen un especial interés en la epilepsia inducida de modo suave. La razón estriba en que no es la alteración de uno de sus genes lo que produce la epilepsia, sino la estimulación suave y repetida de ciertas zonas. El modelo mejor conocido es el de la estimulación de la zona media del cortex temporal, en donde las fibras que forman las conexiones entre diferentes zonas forman un lazo, o anillo de reverberación. Las zonas implicadas son, por secuencia de conexión, el cortex entorhinal, y dentro del hipocampo el giro dentado y las regiones CA3 y CA1, conectando con el subiculum, que conecta de nuevo con el cortex entorhinal. Se cierra de este modo el lazo de reverberación. Este circuito del hipocampo tiene gran plasticidad y la posible implicación de esta importante cualidad en la epilepsia fue puesta de manifiesto por Goddard, en fecha tan temprana como 1966. Este investigador demostró que estimulaciones suaves de una zona próxima y conectada con el hipocampo, que es la amígdala, las cuales por sí solas no inducían epilepsia, conducían gradualmente a una gran susceptibilidad de sufrir epilepsia y eventualmente a crisis espontáneas. Este tipo de condicionamiento y modelo se conoce como «*kindling effect*» y ha sido ampliamente estudiado (Goddard, 1969). El descubrimiento de este efecto de condicionamiento epiléptico (de modo suave) fue el punto de partida para los estudios experimentales para definir las bases biológicas de la plasticidad epileptogénica. Un poco más tarde, Sutula y sus colaboradores demostraron que el condicionamiento epileptogénico estaba asociado con el «rebrote» de axones que forman el camino de las fibras musgosas, lo que produce una reorganización en las conexiones sinápticas del giro dentado del hipocampo (Sutula et al., 1988). Estudios posteriores demostraron que en estas nuevas conexiones había una gran abundancia de receptores de glutamato del tipo NMDA, que incrementaban la eficiencia excitadora del circuito nervioso. La analogía con la epilepsia del lóbulo temporal medial en humanos es evidente y el rebrote y crecimiento de los axones de las células granulares del hipocampo se ha demostrado en estos pacientes. Un incremento de la neurotransmisión mediada por glutamato a través del receptor de NMDA de un 10% con respecto al valor normal pue-

de llevar a la aparición de un foco epiléptico y crisis convulsivas de diferente severidad (Mathern et al., 1999). *Es importante señalar que algunos tipos de epilepsias en humanos se deben a descompensación de los circuitos neurales, estando incrementados los excitadores, y que su origen está en la propia plasticidad neural, tratando de regenerar o adaptarse a situaciones de mayor exigencia en la operatividad de los propios circuitos.*

Aunque posteriormente analizaremos la farmacología para el tratamiento epiléptico, señalaremos aquí que las epilepsias parciales con un foco localizado y que responden mal al tratamiento farmacológico han sido tratadas quirúrgicamente en algunos casos (Spencer, 2002). Uno de los casos más habituales es la epilepsia del lóbulo temporal medio. Los estudios de neuroimagen por resonancia magnética nuclear son esenciales para un correcto diagnóstico y se observa en todos los casos una reducción de la formación del hipocampo correspondiente al hemisferio lesionado. En la mayoría de los casos se observa a edades muy tempranas, y suelen ser posteriores a procesos febriles intensos, con probable infección vírica, en otros casos es debida a tumores benignos en el área, otra posibilidad reside en una alteración del desarrollo con migración anómala de las células o de sus prolongaciones axónicas. *En la epilepsia del lóbulo temporal medial existe una masiva pérdida de neuronas en el hipocampo, generalmente solo en uno de los hemisferios, y la posterior esclerosis de la zona. En esta situación el propio tejido nervioso trata de reorganizarse y se incrementa la formación de glia y el rebrote axonal de las neuronas que han sobrevivido, reorganizando circuitos con notable incremento de la neurotransmisión vía glutamato y receptores de NMDA.*

EPILEPTOGÉNESIS RELACIONADA CON LA NEURONA GABAÉRGICA

Hemos destacado en el apartado anterior la importancia de los receptores de GABA_A. Estos receptores, al permitir la entrada del ión cloruro, evitan una despolarización de la membrana si el estímulo no sobrepasa un cierto umbral y se encuentran entre las dianas más eficaces en el tratamiento de la epilepsia. No obstante la transmisión GABAérgica debe de ser considerada en su totalidad, lo que incluye la funcio-

nalidad de la neurona, desde los niveles del neurotransmisor GABA, sus enzimas de síntesis, transportadores de membrana e incluso si existe un déficit en el número de neuronas utilizando este neurotransmisor. *Todos los genes implicados en el correcto funcionamiento de la neurona GABAérgica son potenciales genes epileptogénicos cuando se produce su disfunción y se ha demostrado mediante animales modificados genéticamente, además de conocerse algunas de estas mutaciones en humanos (Noebels, 2003).*

Los niveles de GABA en sus neuronas dependen en primer lugar de su síntesis mediante la acción de la ácido glutámico descarboxilasa, GAD. Este enzima existe en varias isoformas y es la isoforma neural, conocida como GAD-65, la que se encuentra en las neuronas GABAérgicas. La disponibilidad de glutamato, sustrato del enzima, es esencial y por ello en las neuronas GABAérgicas es muy abundante un transportador de glutamato en la membrana plasmática conocido como EAAT1 (transportador de aminoácidos excitadores tipo 1). La disminución del número de neuronas GABAérgicas también ha sido descrito como posible causa de epilepsia.

EPILEPTOGÉNESIS RELACIONADA CON LA MAQUINARIA EXOCITÓTICA

La precisión con que se transportan las vesículas a las zonas sinápticas y el engranaje que permite la liberación de neurotransmisores y su control, sugiere que alteraciones mínimas de sus cualidades puede resultar en una defectuosa liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica y alterar la dinámica y eficiencia de los circuitos neurales, generando estados epilépticos.

Existen múltiples familias de proteínas que participan en el transporte de vesículas y median su interacción con el citoesqueleto, limitando su movilidad. Entre todas ellas citaremos una de las más antiguas y mejor conocidas, las sinapsinas, que anclan las vesículas al citoesqueleto de actina, una fosforilación de estas proteínas por el enzima calcio-calmodulina quinasa presináptica permite la movilidad de las vesículas y su aproximación a las zonas de anclaje exocitótico en la membrana

presináptica. En modelos de ratón en los que se ha suprimido el gen de la Sinapsina-1 se ha observado la aparición de un fenotipo epiléptico, siendo ésta la primera vez que se demostraba la implicación de la maquinaria exocitótica en este comportamiento. Otras muchas proteínas constituyentes de las vesículas sinápticas, o de sus zonas de reconocimiento y anclaje como las SNARE, Sv2A, sinaptotagmina, sinaptobrevina, etc..., pueden inducir situaciones epilépticas cuando existen mutaciones o delección de sus genes. En humanos se está a la búsqueda de epilepsias hereditarias en donde las mutaciones residan en este grupo de genes (Noebels, 2003).

EPILEPTOGÉNESIS RELACIONADA CON PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN NEURAL

Las anomalías en los patrones de desarrollo cortical cursan con frecuencia con la aparición de estados epilépticos y proceden generalmente de mutaciones en genes ligados al desarrollo en cualquiera de sus facetas: migración, proliferación, diferenciación, segmentación, etc., aunque no todas las anomalías ligadas con el desarrollo neural cursan finalmente con sintomatología epiléptica.

Son muchos los modelos de ratón en donde se ha demostrado la importancia de un desarrollo anómalo en la generación de estados epilépticos. Este es el caso de ratones carentes del factor de transcripción, NeuroD/Beta2, que bloquea selectivamente la formación de células granulares en el hipocampo.

Especial relevancia merece la hipertrofia neuronal encontrada en el cortex de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. En estos pacientes se han encontrado mutaciones en los genes que controlan el crecimiento celular (Bothwell et al., 2001). Las mutaciones pueden estar presentes en genes diversos y entre ellos destacan la mutación en el gen *pten*, que codifica por una lípido-fosfatasa, que regula de modo negativo la supervivencia a través de la fosfatidil-inositol quinasa 3 (PI3K), y de la proteína quinasa B (PKB/AKT).

La migración neuronal incorrecta puede ser el origen causal de epilepsias con componente hereditario. Un ejemplo es el de la migración anómala de las interneuronas GABAérgicas inhibitoras del cortex, descrita en humanos. Estas neuronas salen de la prominencia ganglionar lateral y migran como neuroblastos hasta el cortex. La ausencia de interneuronas inhibitoras puede ser reproducida en modelos de ratón en los cuales se ha suprimido la expresión de una proteasa extracelular (UPAR) que hidroliza proteínas de membrana que actúan como señales de repulsión para evitar la migración celular (Powell et al., 2003).

Mutaciones en el gen de la proteína *reelina* (RELN) están asociadas en humanos a una migración neural que produce un cortex cerebral liso sin circunvoluciones, o muy reducidas, y con convulsiones epilépticas. El gen RELN codifica una proteína de secreción que se une a múltiples receptores, incluyendo el receptor de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR), los receptores de la apolipoproteína E (ApoER2), receptores de integrinas, etc...

Epileptogénesis relacionada con la proliferación y migración neuronal

- 1) Carencia de algún factor de transcripción: NeuroD/b2 (no hay células granulares en el hipocampo).**
- 2) Mutaciones en el gen *pten* que regula vías de proteínas-quinasas (PI3K y PKB).**
- 3) Migración incorrecta gen *UPAR* (proteasa) y gen *RELN* (reelina).**
- 4) Genes de homeoboxes que controlan la segmentación.**

Finalmente anomalías en genes de los homeoboxes, que están relacionados con la regionalización y diferenciación terminal del neocortex producen fenotipos epilépticos. En humanos se ha observado con el gen ARX (aris-

tales, localizado en el cromosoma X) que se asocia con síndrome de convulsiones mioclónicas, espasmos en la infancia y retraso mental (Stromme et al., 2002).

ANOMALÍAS EPIGENÉTICAS EN LA EPILEPSIA

En los apartados anteriores hemos visto que *las epilepsias pueden ser causadas por mutaciones en un gran número de genes con funciones muy diversas, pero existe la posibilidad de controlar la activación de un gen mediante factores de transcripción y activar o reprimir la presencia de una proteína, cuyo gen es perfectamente válido*. Este es el caso del síndrome de Rett, asociado al cromosoma X, el cual incluye retraso mental y crisis epilépticas. El gen alterado es el MECP2, que codifica una proteína neuronal ácida con múltiples sitios activos que se une a secuencias en el DNA de tipo CpG, cuando están metiladas y generalmente en las regiones promotoras, controlando la expresión entre otras de la histona deacetilasa, que es capaz de remodelar la estructura de la cromatina y la accesibilidad de enzimas para la síntesis del RNAm. En el cerebro humano se aprecia un cortex muy delgado y escasa arborización y formación de sinapsis, lo que sugiere que algunos genes han sido silenciados durante el periodo de remodelación neuronal (Noebels, 2003).

FARMACOLOGÍA ANTIEPILEPTICA

La mayoría de los fármacos antiepilépticos han sido descubiertos por casualidad, como ejemplo baste recordar la primera vez que se utilizó el fenobarbital por Hauptmann, médico que tenía a su cargo una sala dedicada a pacientes epilépticos que sufrían crisis frecuentes. Para dormir a sus pacientes, Hauptmann utilizó el fenobarbital, que como derivado del ácido barbitúrico, se había utilizado hasta entonces como sedante e hipnótico. Los pacientes durmieron muy bien y además pasados los efectos hipnóticos observó que las crisis convulsivas se habían reducido notablemente tanto en incidencia como en su intensidad, perdurando los efectos por un periodo de tiempo más largo. Esto ocurría en el año 1911, los mecanismos de acción del fenobarbital eran ab-

solutamente desconocidos, hoy día el fármaco se sigue usando y su acción potenciadora sobre el receptor de GABA_A, canal de cloruro, son conocidos.

Un importante modo de acción de los antiepilepticos es la de reducir la señalización repetitiva a través de los canales de sodio, o bien aumentar la eficacia de los canales de cloruro abiertos por GABA. Curiosamente incluso los fármacos dirigidos a la misma diana farmacológica tienen acciones muy diversas, lo que nos indica que conocemos muy poco de los canales iónicos, de sus posibilidades terapéuticas y de su situación funcional en una neurona dada. Por ello es necesario conocer la relación entre genotipo y fenotipo en los enfermos epilépticos y poder predecir cómo actúan los fármacos sobre los canales normales y los canales mutados.

El conocimiento de las causas genéticas de la epilepsia y su gran variedad obligan a la búsqueda de una farmacología lo más adaptada posible, necesitando de una tipificación mediante ensayos de genómica y la adecuación del tratamiento mediante farmacogenómica. El descubrimiento de qué tipos muy similares de epilepsias, según sus síntomas, corresponden de hecho a una gran variedad de mutaciones en genes no relacionados, da valor a la farmacología en la que el tratamiento sintomático puede servir para permitir una vida normal, en lo posible, del paciente epiléptico.

La comprensión de los mecanismos de la epileptogénesis ha puesto de manifiesto que el conocimiento en profundidad del funcionamiento de los canales iónicos operados por voltaje o por ligando es esencial para una farmacología con menos efectos secundarios. De todos modos no se puede olvidar que la potenciación de los mecanismos inhibitorios, a través de la sinapsis GABAérgica, sigue siendo una parte fundamental de la farmacología antiepileptica. La existencia de epilepsias refractarias a todo tratamiento y su relación con posibles alteraciones del desarrollo del cortex cerebral, así como con anomalías en los transportadores de la familia ABC, presentes en la barrera hemato-encefálica, indican también los límites actuales de la farmacología de las crisis convulsivas y las directrices futuras para hacer frente a los nuevos retos (Löscher, 2002).

La descripción de los fármacos más empleados en las epilepsias se realizará teniendo en cuenta su mecanismo de acción y no su desarrollo histórico. Solamente cuando sea relevante se indicará el tipo de epilepsia, según sus síntomas, para la que son empleados.

Es importante destacar que la existencia de nuevos fármacos, algunos de ellos introducidos recientemente y que no suponen un avance terapéutico, sino incrementar el coste del tratamiento al estar sometidos todavía a una patente de la industria, así como la situación social y laboral de los enfermos, ha hecho que la Comisión Europea y los miembros de la Liga Internacional contra la Epilepsia, organizaran la EUCARE (European Concerted Action and Research in Epilepsy) que tiene entre sus objetivos: mejorar la comprensión de la epilepsia, aliviar las consecuencias sociales de la enfermedad, promover el intercambio de conocimiento entre todas las disciplinas que dan información sobre el cuidado de los pacientes epilépticos, financiar la investigación para desarrollo de fármacos y control de las crisis.

Principales grupos de fármacos antiepilépticos

- **Fármacos dirigidos a canales dependientes de voltaje.**
- **Fármacos dirigidos al receptor de GABA, tipo GABA_A (canal de Cl⁻).**
- **Fármacos dirigidos a potenciar los niveles de GABA y la funcionalidad de la neurona GABAérgica.**
- **Otros**

FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS QUE ACTÚAN SOBRE LOS CANALES DE SODIO

Los fármacos que actúan sobre los canales de sodio voltaje dependientes tienen acciones muy diversas y son bien conocidos como anestésicos locales, antiarrítmicos y anticonvulsivos, que es la razón de su estudio en este capítulo. Estudios recientes muestran que estos compuestos pueden servir como poderosos citoprotectores en modelos de isquemia cerebral, hipoxia, o trauma cerebral, por lo que su interés en farmacología ha ido en aumento.

Como hemos señalado en el apartado dedicado a la epileptogénesis debida a fallos en los canales de sodio voltaje dependientes, es de destacar que existen múltiples genes de las subunidades de estos canales y que solamente algunos se expresan en el sistema nervioso central. Entre las subunidades α que forman el poro son las SCN1A, SCN2A, SCN3A las más abundantes y en mucha menor medida la SCN8A, entre las subunidades moduladoras la $\beta 1$, codificada en el gen SCN1B, es también abundante en la zona postsináptica donde modula las subunidades α . El fallo de las subunidades citadas produce episodios epilépticos familiares, con convulsiones generalizadas e inducibles por fiebre, las conocidas como GEF+. En todos estos casos existe un incremento en la entrada de sodio, mediante diversos mecanismos que llevan o bien a una inactivación más lenta, o un periodo refractario más corto, lo que puede favorecer la aparición de un tren de potenciales de acción, con descarga rápida y sincronizada.

El conocimiento de la base genética que sustenta la anomalía funcional hace surgir una pregunta esencial: ¿Si los canales de sodio afectados en cada epilepsia son diferentes, se podría confeccionar una farmacología específica para cada canal? La respuesta es sí, pero no existe por el momento, y los fármacos que actúan sobre los canales de sodio hacen muy pocas o nulas diferencias entre ellos. No se puede ocultar que la tarea es difícil e incluso las toxinas del reino animal que hacen unas diferencias exquisitas y se emplean para caracterizar los distintos canales de calcio, no han diversificado sus cualidades de modo tan eficiente con los canales de sodio. Para ilustrar lo anteriormente dicho, baste citar que todos los canales de

sodio son inhibidos por tetrodotoxina y todos los presentes en cerebro lo son además por la saxitoxina.

No obstante, no todo podía ser negativo y ya hay algún motivo de esperanza, como es el desarrollo de un inhibidor más específico para el canal de sodio SCN5A, fundamentalmente cardiaco. Este canal está mutado en el *síndrome de Brugada*, y tiene una recuperación muy lenta, lo que permite una prolongada entrada de sodio en los cardiomiocitos, que es su lugar específico de expresión. Los canales de sodio son todos inhibidos por el anestésico local lidocaína, que se une a la hélice 6 del IV dominio de todos los subtipos, pero curiosamente en la mutación de Brugada donde se cambia D1790G, la lidocaína es poco eficaz. Después de mucho trabajo se ha caracterizado otro inhibidor, la flecainida, que ha resultado mucho más eficaz y específico, permitiendo un tratamiento del síndrome con menos riesgos (Abriel et al., 2000). Es posible que en un futuro cada una de las respectivas mutaciones disponga de fármacos más específicos, aunque para cada tipo de mutación tendrá que desarrollarse una farmacología diferente.

Una vez analizadas las dificultades para desarrollar una farmacología individualizada, se comprende más fácilmente que los tratamientos existentes no hagan por el momento diferencias entre los canales de sodio y que durante el tratamiento con fármacos dirigidos al canal de sodio se puedan producir efectos secundarios múltiples no deseados.

Derivados de hidantoínas. Uno de los más empleados es la **fenilhidantoína (fenitoína)**, de hecho es un derivado difenilhidantoína y se le conoce con los nombres comerciales de *dilantin* y *diphenylan*. Este fármaco es eficaz en todo tipo de convulsiones parciales y tonicoclónicas, aunque es poco eficaz en las epilepsias generalizadas con crisis de ausencia.

La fenilhidantoína fue sintetizada en 1908, pero hasta 1938 no se empleó como antiepiléptico, y su empleo fue el resultado de una búsqueda sistemática para paliar las convulsiones inducidas mediante electroshock.

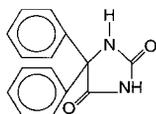
La acción anticonvulsivante de la fenilhidantoína se debe a que limita la frecuencia de potenciales de acción al retrasar la velocidad de recuperación de los canales de sodio voltaje dependientes que permanecen inactivos por un periodo de tiempo más prolongado. El compuesto tiene una vida media de 6-24 horas a concentraciones plasmáticas bajas, pero su eliminación no es lineal y dosis elevadas provocan un acúmulo indeseado por saturación de los enzimas del metabolismo, sobre todo del CYP3A4. Este dato hace necesario un control extremo de la dosificación para mantener el fármaco en los niveles a cuya concentra-

Fármacos antiepilépticos dirigidos a canales dependientes de voltaje

Inhibidores de canales de sodio

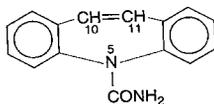
Inhibidores de canales de calcio

Hidantoínas

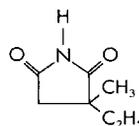


FENILHIDANTOÍNA

Iminoestilbenos

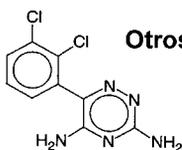


CARBAMAZEPINA

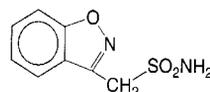


ETOSUXIMIDA

Otros



LAMOTRIGINA



ZONISAMIDA

Figura 6.—Fármacos antiepilépticos dirigidos a canales dependientes de voltaje.

Los canales de sodio disponen de una amplia farmacología de la que se han seleccionado tres de los más representativos, aunque existen múltiples variantes en las respectivas series de compuestos. Es de destacar que, por el momento, no existen fármacos selectivos para los diferentes subtipos de los canales de sodio.

La farmacología antiepiléptica dirigida a los canales de calcio está en pleno desarrollo y ejercen su acción fundamentalmente sobre el **canal de calcio tipo T**.

Se han seleccionado solamente dos de ellos.

Es de destacar que la farmacología antiepiléptica ha servido de base para el desarrollo de fármacos empleados actualmente en la neuroprotección y en el tratamiento de diversas neuralgias (p.ej., la del trigémino).

ción actúa de modo selectivo sobre los canales de sodio y no de forma inespecífica sobre todo tipo de canales y receptores de membrana.

La escasa solubilidad de la fenilhidantoína y sus problemas para administrarlo por vía intravenosa llevaron a una modificación sintetizando un profármaco, conocido como **fosfenilhidantoína**, que como su nombre indica contiene un grupo fosfato que le hace más soluble, a este compuesto se le conoce con el nombre comercial de *cerebryx*. Una vez administrado por vía parenteral, las fosfatasas inespecíficas de hígado y eritrocitos lo transforman en fenilhidantoína, en un lapso de tiempo de unos 10 minutos. Existen otras hidantoínas con acción anticonvulsivante, aunque menos relevantes farmacológicamente.

Derivados de iminoestilbenos. El más importante de todos ellos es la **carbamazepina**, conocida como *tegretol* y *carbatrol*. Su uso se aprueba en 1974 como anticonvulsivo, y desde 1960 para tratar la neuralgia del trigémino. Estructuralmente se reacciona con los antidepresivos tricíclicos. Se emplea para el tratamiento de las crisis convulsivas tonicoclónicas generalizadas y también de las crisis parciales. Actúa sobre los canales de sodio disminuyendo la velocidad de recuperación, con lo cual limita la eficacia de nuevos potenciales de acción y su propagación en la membrana neural. Es metabolizada en el hígado por formación de un compuesto derivado epóxido y excretada conjugada con ácido glucurónico. El citocromo P450, que efectúa la etapa oxidativa, es fundamentalmente el CYP3A4 y es a este nivel que se producen las interacciones con otros fármacos. Los efectos secundarios por sobredosis implican todas las posibles manifestaciones del sistema nervioso, desde el vértigo, ataxia, somnolencia, etc..., y se requiere cuidar al máximo la dosificación.

Un análogo de la carbamazepina es la **oxcarbazepina**, conocido comercialmente como *trileptal*, se comporta como un profármaco y requiere su transformación en hígado.

Otros moduladores del canal de sodio. En este apartado se incluye la **Lamotrigina**, conocido comercialmente como *lamictal*, es una fenil-triazina que ha sido aceptada como fármaco antiepiléptico en 1994. Es

buen inhibidor de las convulsiones motoras y eficaz para bloquear la estimulación repetida y sostenida de las neuronas motoras. Su espectro de actividad en los diferentes tipos de epilepsias es más amplio que los de la fenilhidantoína y carbamazepina.

FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS QUE ACTÚAN SOBRE LOS CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio tienen una estructura similar a los de sodio, con una gran subunidad central que forma el poro y varias subunidades auxiliares. De todas las subunidades existen varios genes, lo que origina una gran multiplicidad de formas con propiedades y localización tisular específicas, como hemos visto en el apartado dedicado a la epileptogénesis en relación con los canales de calcio. En cerebro son los canales tipo P/Q, N y T los que realizan las tareas más importantes para controlar la comunicación sináptica. En las epilepsias familiares se han detectado mutaciones hasta el momento en los canales P/Q, codificados ambos por la subunidad $\alpha 1$ como productos alternativos del gen CACNA1A, pero no en los otros tipos de canales. Esta mutación es la causa más frecuente de las epilepsias en niños conocidas como crisis de ausencia.

La posibilidad de inhibir específicamente cada uno de los subtipos de canales de calcio es algo corriente en farmacología, en primer lugar por las toxinas de los caracoles marinos y otros animales, pero igualmente por la existencia de un poderoso armamento desarrollado por la química orgánica, como son todas las dihidropiridinas, etc... A pesar de la relevancia de los canales tipo P/Q, en los tratamientos actuales de la epilepsia no se emplean fármacos específicos para este canal. Idéntica situación ocurre con los canales codificados por el gen CACNA1B, que son los denominados tipo N (neural), por su papel como disparadores de la secreción de neurotransmisores en la terminal sináptica.

Lo que resulta curioso, cuando se analiza, es que la farmacología antiepiléptica utilizada sobre los canales de calcio lo sea sobre los canales tipo T, codificados por el gen CACNA1E. Estos canales median las corrientes de

calcio de bajo umbral y son los menos conocidos y peor caracterizados, por ser de difícil estudio electrofisiológico. Entre los fármacos empleados están el valproato, etoxusimida y zonisamida.

El **valproato** (ácido valproico, n-dipropilacético) comercializado con diversos nombres, entre ellos *depakene*, ha sido aprobado en 1978 para su uso en humanos. Se desarrolló inicialmente como inhibidor del enzima degradativo, la semialdehido succínico deshidrogenasa, que incorpora el GABA, una vez desaminado, al ciclo cítrico, con lo que se pretendía incrementar sus niveles en la terminal sináptica. No obstante sus efectos a este nivel, sin ser nulos parecen ser escasos. Otros ácidos carboxílicos de cadena ramificada parecen tener efectos similares.

Las acciones farmacológicas del valproato sobre las crisis de ausencia y las convulsiones parecen ser mediadas a través de la reducción de las corrientes de calcio a través de los canales de bajo umbral, el canal T. El compuesto se absorbe con rapidez y se metaboliza fundamentalmente en hígado a través de los citocromos CYP2C9 y CYP2C19, la vida media es relativamente larga, de casi 15 horas.

Succinimidas. Destaca entre ellas la **etosuximida**, conocida comercialmente como *zarontín*, es un compuesto muy utilizado para tratar las crisis de ausencia. Otras moléculas análogas son la **metosuximida** (*celontín*) y la **fensuximida** (*milontín*), que han dejado de usarse. La etosuximida reduce las corrientes de calcio de bajo umbral que son mediadas por los canales de tipo T y la función la realiza fundamentalmente en las neuronas talámicas, donde se generan la mayoría de los ritmos de espigas que pueden alcanzar el cortex en las epilepsias generalizadas con crisis de ausencia, aunque no es especialmente eficaz para evitar las convulsiones tonicoclónicas. Aunque puede ser hidroxilado en los microsomas hepáticos, una parte significativa del fármaco se excreta por orina sin modificar.

Zonisamida es un derivado de sulfonamida que ha sido aceptado para tratamiento en humanos en el año 2000, se comercializa con el nombre de *zonegrán* y se emplea para el tratamiento de las crisis convulsivas parciales. La zonisamida inhibe las corrientes de calcio media-

das por los canales tipo T. Es un fármaco que se absorbe muy bien por vía oral, tiene una vida media muy larga, lo que facilita la dosificación oral, además es un fármaco robusto, ya que en un 80% se elimina por orina sin metabolizar. El compuesto metabolizado lo es fundamentalmente en hígado por el citocromo CYP3A4.

FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS QUE ACTÚAN SOBRE EL SISTEMA GABAÉRGICO

La farmacología desarrollada para potenciar el sistema GABAérgico, que es la neurotransmisión inhibitoria por excelencia en el sistema nervioso central, ha cosechado notables éxitos en el tratamiento de la epilepsia. *Con los fármacos que actúan potenciando el sistema GABAérgico se pueden hacer dos grandes grupos según su mecanismo de acción: 1) Fármacos que incrementan los niveles de GABA funcional, tanto dentro de la neurona, como en el espacio extracelular, y 2) fármacos que potencian la respuesta de los receptores ionotrópicos de GABA, conocidos como receptores GABA_A.*

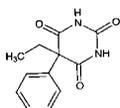
A) Fármacos antiepilépticos que incrementan los niveles de GABA funcional

Para comprender el mecanismo de acción de los antiepilépticos que incrementan el GABA funcional, la biología celular de la neurona GABAérgica debe de ser contemplada en su totalidad. Existen epilepsias familiares en donde se han detectado mutaciones en los genes relacionados con la síntesis y almacenamiento de GABA, o incluso que resultan en un número reducido de neuronas GABAérgicas. Sea cual sea la situación genética de partida y esté o no relacionada con los niveles de GABA, este tipo de fármacos tratará de optimizar el GABA disponible generado por el propio cerebro del paciente epiléptico. Para esta optimización se puede ralentizar la degradación a nivel de la GABA-transaminasa, o bien bloquear el transporte específico de GABA a nivel de las terminales presinápticas, inhibiendo el transportador de la membrana plasmática.

Fármacos antiepilépticos dirigidos a receptores y niveles de GABA

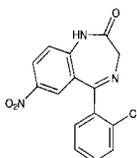
Efectores del receptor GABA_A

Barbitúricos



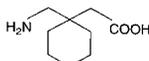
FENOBARBITAL

Benzodiazepinas



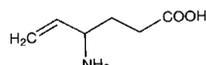
CLONAZEPAN

?

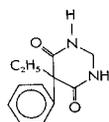


GABAPENTINA

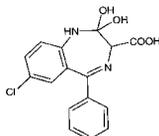
Inhib. GABA-transaminasa



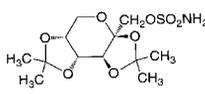
VIGABATRINA



PRIMIDONA

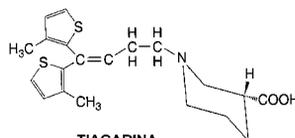


CLORAZEPATO



TOPIRAMATO

Inhib. transportador GABA



TIAGABINA

Figura 7.—Fármacos antiepilépticos dirigidos al sistema GABAérgico.

La farmacología antiepiléptica dirigida a potenciar la neurotransmisión inhibitoria mediada por el sistema GABAérgico, es la más desarrollada y de la que se conocen mejor las claves de acción. Los fármacos son muy diversos, pero pueden agruparse según el lugar y el mecanismo de acción. En primer lugar, el gran grupo de los que actúan como **activadores alostéricos** del canal de cloruro, el receptor GABA_A, entre los que destacan los **barbitúricos** y las **benzodiazepinas**. Otro gran grupo lo constituyen los inhibidores del enzima de degradación del GABA, la **GABA transaminasa**, destacando entre ellos la **vigabatrina**, que fue uno de los primeros fármacos con diseño racional. Otro modo de aumentar los niveles de GABA en la sinapsis es inhibir su transportador de la membrana plasmática, destacando entre ellos la **tiagabina**. Otros fármacos tienen acciones menos precisas y pueden actuar sobre receptores y enzimas, es el caso de la **gabapentina** y en otro contexto del **topiramato** que al parecer actúa sobre los receptores de GABA y también sobre canales dependientes de voltaje.

Inhibidores de GABA-transaminasa

La GABA-transaminasa pertenece a la familia de las ω -transaminasas. Su reacción es esencial para finalizar el efecto neurotransmisor del GABA, al que transforma en semialdehído succínico, para que una vez oxidado entre en el ciclo cítrico.

Los inhibidores de la GABA-transaminasa son en su mayoría análogos del sustrato a los que se ha añadido un grupo reactivo, generalmente

alquílico con dobles o triples enlaces, o derivados halogenados. Al reorganizar la posición del doble enlace durante la etapa enzimática, el sustrato se queda unido covalentemente al centro activo del enzima y más concretamente al grupo funcional que es el fosfato de piridoxal, PLP.

El **γ -vinil-GABA** conocido comercialmente como *vigabatrina*, o *sabril*, se encuentra entre los inhibidores de la GABA-transaminasa de diseño que tuvieron un amplio uso y también entre los más antiguos de la farmacología. Actualmente su empleo está decayendo por existir una más amplia oferta de fármacos, pero sigue siendo válido y de bajo coste.

El **ácido valproico** (N-dipropil-acético), ya citado en los canales de sodio, fue inicialmente sintetizado como inhibidor de la semialdehido succínico deshidrogenasa.

Tiagabina, fármaco conocido con el nombre comercial de *gabitril*, es un derivado del ácido nipecótico. Su uso como fármaco en el tratamiento de las crisis convulsivas parciales fue aceptado en 1998. Su mecanismo de acción está basado en sus propiedades como inhibidor del transportador de GABA neural, conocido como GAT-1, que se encuentra distribuido en neuronas y glia. El resultado es un incremento de los niveles de GABA a nivel sináptico y extracelular en general, permitiendo a este neurotransmisor un mayor tiempo de acción sobre sus receptores. Se puede administrar por vía oral y en hígado es el CYP3A4, su principal enzima degradativo.

Gabapentina, conocida comercialmente como *neurontin*, procede de los análogos del GABA, en este caso un derivado cíclico. Modificación que es corrientemente utilizada en farmacología para dar estabilidad y resistencia a la estructura de la molécula y mejores posibilidades de permeación. Aunque se sintetizó como un análogo de GABA y se esperaban propiedades múltiples y redundantes, tales como: acción sobre receptores tanto GABA_A como GABA_B, acción sobre transportadores, y acción sobre enzimas de degradación. El resultado ha sido un compuesto con pocas acciones bien definidas y se cree que incluso podría favorecer la salida del GABA vesicular, actuando sobre el transportador vesicular que lo almacena. Curiosamente en estos últimos años se ha

producido un incremento espectacular de su uso, no solamente en epilepsia parcial o generalizada, sino también en el tratamiento de la migraña, dolor crónico y trastorno bipolar no siempre absolutamente justificado. Es un fármaco robusto, que se absorbe bien por vía oral y se excreta prácticamente sin metabolizar, es además bien tolerado, debido en parte a la ausencia de metabolismo, por lo que no crea interferencias.

No obstante es importante destacar que la **gabapentina** está desde hace un par de años en el ojo del huracán, y que la compañía farmacéutica Pfizer, que compró el medicamento como parte de los activos de Parke Davis, ha conseguido ventas de 1,8 billones de dolares US en el año 2000. El éxito de ventas ha suscitado una amplia y agria polémica, con denuncias de uso y prescripción del medicamento, incluidas denuncias a nivel de la FDA (Food and Drug Administration) y de los tribunales que para aquellos interesados en profundizar en la condición humana puede resultar muy ilustrativo (Editorial Lancet Neurology, 2003).

B) Fármacos antiepilépticos que actúan sobre receptores GABA_A

El receptor GABA_A es un receptor ionotrópico que una vez activado permite el paso del ión cloruro, resultando una hiperpolarización de la neurona. La farmacología antiepiléptica sobre este receptor no pretende inhibirlo, sino activarlo, o inducir una configuración más eficaz para facilitar la entrada del ión cloruro. Este receptor contiene los sitios de unión para las benzodiazepinas y los barbitúricos, que actúan como efectores alostéricos positivos incrementando la capacidad de entrada de cloruro en respuesta al agonista.

En el apartado dedicado a epileptogénesis se ha hecho hincapié en las mutaciones de genes relacionados con alguna de las subunidades del canal de cloruro, que tiene una estructura pentamérica, entrando en la composición tres familias de subunidades distintas, las α , β , y γ , existiendo varios miembros de cada una de ellas. Desde el punto de vista farmacológico es relevante que las diferentes combinaciones de subunidades tienen propiedades diferentes y que no todas son capaces de ligar los mismos tipos de benzodiazepinas. Además la expresión de las diferentes

subunidades en cerebro no es idéntica, lo que permitiría un amplio abanico de posibilidades susceptibles de ser explorados farmacológicamente.

El sitio de unión de los barbitúricos se encuentra en la zona interna del canal de cloruro y todos los receptores pueden unir este tipo de compuestos. Éste no es el caso con las benzodiazepinas, que se unen a la intersección de las subunidades α/γ , y dependiendo del tipo de combinación. Entre las que unen benzodiazepinas están los receptores que contienen $\alpha 1/\gamma 2$, sitio de unión denominado BZ-tipo I, que son los más abundantes en todas las áreas cerebrales, en hipocampo, interneuronas corticales, cerebelo, etc. Las combinaciones $\alpha 2/\gamma 2$, $\alpha 3/\gamma 2-3$, $\alpha 5/\gamma 2-3$, tienen un sitio de unión denominado BZ-tipo II. Generalmente los receptores en los cuales entra en la composición la subunidad $\alpha 6$, o la $\alpha 4$ son insensibles a todo tipo de benzodiazepinas. La razón estriba en que en las subunidades que reconocen benzodiazepinas existe una histidina en posición 101 de las subunidades α , mientras que las que no las reconocen como la alfa $\alpha 6$, o la $\alpha 4$ se encuentra una arginina en esa posición (Wisden y Stephens, 1999).

Benzodiazepinas. Las utilizadas en el tratamiento de la epilepsia deben de reconocer el sitio de unión BZ-tipo I. Casi todas las benzodiazepinas tienen propiedades anticonvulsivas, pero actualmente las más utilizadas son el **clonazepan** (*klonopin*) y el **clorazepato** (*tranxene*). De modo general todas las benzodiazepinas se absorben bien por vía oral, se asocian a proteínas plasmáticas y son rápidamente redistribuidas en los tejidos que contienen alto nivel de lípidos, que se convierten en reservorios del fármaco y alargan la vida media.

Topiramato (*topamax*), es un fármaco antiepiléptico de difícil ubicación, pues sus dianas farmacológicas se superponen. Se han descrito acciones sobre los receptores $GABA_A$, aumentando sus corrientes, pero acciones de reducción de la corriente de sodio también están descritas. Tiene un amplio espectro de actividad en los diferentes tipos de epilepsias.

Barbitúricos anticonvulsivos. Los barbitúricos se unen a todos los receptores $GABA_A$ sin excepción. La historia de los barbitúricos como anticonvulsivos se remonta a 1911 cuando Hauptmann ensaya el efecto

del **fenobarbital** (*luminal*). Este barbitúrico, de coste reducido, se sigue usando y es válido para el tratamiento de la mayoría de las convulsiones, siendo muy poco selectivo. Su acción antiepiléptica es realizada a concentraciones mucho más bajas de las requeridas para producir hipnosis, lo que lo diferencia de la mayoría de los barbitúricos, como es el pentobarbital. Se metaboliza fundamentalmente en hígado por los citocromos CYP2C9 y CYP2C19, siendo además capaz de inducir sus citocromos de degradación junto el CYP3A4 y los enzimas de glucuronización.

El **desoxibarbitúrico** conocido como **Primidona** (*mysoline*) es muy similar en sus acciones al fenobarbital, además en su catabolismo se genera como metabolito activo el propio fenobarbital.

FÁRMACOS NEUROPROTECTORES

En el breve desarrollo expuesto aquí de la farmacología antiepiléptica, hemos destacado que se pretende disminuir la capacidad de respuesta de una neurona haciendo uso de fármacos que reduzcan la entrada de sodio o calcio, o bien favoreciendo la entrada del ión cloruro. El resultado es siempre una disminución en la frecuencia o la intensidad de las respuestas.

Esta estrategia de «ralentizar las neuronas», no tiene por qué ser exclusiva de la epilepsia y en situaciones de estrés, inducidas por escaso aporte de oxígeno, o glucosa, al cerebro, o trauma cerebral. Cuando la supervivencia neural está comprometida, el empleo de fármacos neuroprotectores puede ser una buena opción.

Los fármacos neuroprotectores de que disponemos en la actualidad siguen la filosofía de los antiepilépticos, y los que más se han desarrollado son los que actúan reduciendo las corrientes de entrada de sodio y en algunos casos las de calcio. Los fármacos que bloquean la entrada de sodio a través de los canales de sodio voltaje dependientes son bien conocidos por sus acciones como anestésicos locales, antiarrítmicos y anticonvulsivos. Todos ellos, a la dosis adecuada, pueden

servir como neuroprotectores y otros muchos se han desarrollado debido al interés del tema (Taylor y Meldrum, 1995). Citaremos la lido-caína, fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, zonisamida, riluzol, lifa-rizina y flunarizina.

También los activadores de los canales de cloruro, generalmente moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA-A, han sido profusamente empleados, incluyendo la inducción del denominado coma barbitúrico.

Otro grupo de receptores que se han incorporado a la farmacología de neuroprotectores son los antagonistas del receptor metabotrópico de glutamato, conocido como mGlu1. Estos compuestos son capaces de proteger las células piramidales del cortex y del hipocampo de la deprivación de oxígeno y glucosa. Estos receptores metabotrópicos de glutamato forman homodímeros y a través de proteínas Gq son capaces de movilizar calcio después de la hidrólisis de fosfatidilinositol y formación del inositol trifosfato (Pellegrini-Giampietro, 2003).

El campo de la neuroprotección fue en su nacimiento complementario al de las epilepsias por el tipo de farmacología a emplear, pero ha encontrado sus propios derroteros y dianas farmacológicas específicas.

INTERACCIONES DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS

En la descripción de los fármacos antiepilépticos, anteriormente citados, se ha señalado el o los citocromos implicados en su degradación y alguna que otra particularidad metabólica. Las interacciones de los fármacos antiepilépticos pueden suceder entre ellos si la terapia es combinada, o con otras medicaciones, algunas administradas de modo sistemático y otras de forma puntual.

Aunque las interacciones más notables de los antiepilépticos lo son a nivel de la farmacocinética (absorción, transporte, metabolismo y excreción), las interacciones farmacodinámicas, a nivel de las propias dianas farmacológicas no son descartables.

La mayoría de los pacientes epilépticos, aproximadamente un 70%, responden a la terapia exclusivamente con uno de los fármacos disponibles. En otros casos es necesario dar una terapia combinada para optimizar el control de las crisis convulsivas y existen además epilepsias refractarias al tratamiento, algunas de las cuales son tratadas mediante cirugía.

INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS

Absorción. El primer aspecto reseñable es que algunos antiepilépticos son capaces de inducir a nivel del DNA la expresión de proteínas de la membrana plasmática conocidas como transportadores ABC (por las siglas de ATP Binding Cassette). Se han identificado hasta el momento unos 30 miembros, que según sus elementos estructurales y homología se clasifican en ocho familias. Su función es la de exportar metabolitos de señalización celular o detoxificación, o los propios fármacos que han entrado en la célula. En la farmacología antiepiléptica los más relevantes son el MDR1 y el MRP1, que no deben confundirse entre sí (Borst y Elferink, 2002; Lee et al., 2001).

El MDR1 (multidrug transporter 1) conocido también con el nombre de glicoproteína P, pertenece a la subfamilia de transportadores ABC denominada MDR/TAP, es una de las mejor conocidas y más amplias. El MDR1 es muy importante en la absorción gastrointestinal de fármacos, y hay estudios que demuestran que la MDR1 podría mediar el eflujo o salida de algunos antiepilépticos del sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica, entre éstos se encuentran la carbamazepina, la fenitoína, fenobarbital, lamotrigina, etc.

Polimorfismos del MDR1. El gen del MDR1 se denomina ABCB1 y recientemente ha sido relacionado con las epilepsias resistentes al tratamiento farmacológico. Como esta resistencia a fármacos no era específica para un fármaco, sino para toda una amplia variedad, actuando sobre diferentes dianas y además siendo metabolizados por diferentes CYP, se dedujo que el fallo podría estar en algún sistema común a todos ellos, y se pensó que podría ser al nivel de absorción. Los estudios genéticos com-

parando los individuos normales y los pacientes epilépticos que responden o no al tratamiento farmacológico, mostró que existe un polimorfismo en este gen ABCB1, que controla el transporte de diversos compuestos xenobióticos. El cambio más común en los pacientes refractarios al tratamiento antiepiléptico es el de una citosina por timina en posición 3435 del gen. Curiosamente este polimorfismo no se traduce en pérdida de función, sino en una mayor expresión de la proteína y mayor capacidad de bombeo de los fármacos xenobióticos hacia el exterior (Siddiqui et al., 2003). Aproximadamente el 30% de los pacientes refractarios al tratamiento antiepiléptico los son debido a este polimorfismo.

Funciones del transportador MRP1. El transportador conocido como MRP1 pertenece a la subfamilia MRP/CFTR. Es la más amplia y hasta el momento se han identificado nueve miembros. Este transportador parece ser el responsable de la salida de la célula de múltiples compuestos anticancerosos hidrofóbicos o aniónicos, los cuales han sido previamente conjugados (glutathion, sulfato, glucurónico, etc.). El transportador MRP1 tiene entre sus sustratos endógenos los leucotrienos, lo que indica su importancia en la señalización mediada por los derivados del ácido araquidónico. El MRP1 es también uno de los más abundantes en la barrera hematoencefálica y está presente en las células de los endotelios vasculares de los capilares y pericitos. Permiten el paso de hormonas esteroídicas, e incluso de sus derivados conjugados con glucurónico y sulfato. Este transportador es la puerta de entrada y expulsión del cerebro de múltiples fármacos y la eficacia de algunos tratamientos antitumorales se ve seriamente comprometida por los altos niveles de este transportador que excretan el fármaco una vez que entra en el sistema nervioso. Hay constancia de que los barbitúricos y benzodiazepinas son sus sustratos y también otros muchos compuestos antiepilépticos, aunque por el momento no se han encontrado mutaciones en pacientes refractarios al tratamiento antiepiléptico, tal vez porque todavía estamos al inicio de este tipo de estudios.

Por esta razón la búsqueda de inhibidores que impidan la salida de algunos fármacos del interior de la célula es uno de los objetivos de la farmacología en sus aspectos farmacocinéticos. Actualmente se dispone de algunos inhibidores de los transportadores MDR1 y

MRP1, entre estos se encuentran algunos compuestos que actúan sobre otras dianas farmacológicas, pero que podrían utilizarse para este fin, son los siguientes: algunos bloqueantes de canales de calcio, como el verapamil y similares; también algunos antagonistas de la calmodulina, como la trifluoperazina. Las sustancias reseñadas aquí son más eficaces sobre el transportador MDR1. Los inhibidores del transportador MRP1, que son muy interesantes por su importancia en la barrera hemato-encefálica, son escasamente conocidos (Fernández Braña et al., 2003).

Metabolismo. Es sin duda a este nivel donde se producen las interacciones más relevantes entre todos los fármacos. *Algunos antiepilépticos* como la carbamazepina, fenitoína y los barbitúricos (fenitoína y primidona) *son capaces de inducir la expresión de los CYP*, sobre todo de los CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4. Algunos de los cuales serán utilizados en su propio metabolismo, pero otros servirán para metabolizar diversos compuestos. Por ejemplo, el antiepiléptico carbamazepina es capaz de inducir el CYP3A4, con lo que acelerará el metabolismo de

Interacciones farmacocinéticas de fármacos antiepilépticos a nivel de los citocromos P450 (CYP)

- 1) **Antiepilépticos que inducen la expresión de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4:** Carbamazepina, fenitoína y barbitúricos.
- 2) **Antiepilépticos que compiten por el mismo citocromo para su metabolismo:**
 - **CYP2C9:** metaboliza antiepilépticos (fenitoína, fenobarbital, valproato,...) y otros: antiinflamatorios no esteroideos, warfarina, antidepresivos, antivirales, etc. Existen múltiples polimorfismos.
 - **CYP2C19:** metaboliza antiepilépticos (benzodiazepinas, fenobarbital, fenitoína,...) y otros: psicotropos, omeprazol, propranolol, warfarina, etc. Existen polimorfismos e incluso ausencia total de actividad.
 - **CYP3A4:** metaboliza antiepilépticos (carbamazepina, etoxusimida, tiagabina, benzodiazepinas,...) y otros: psicotropos, cardiovasculares, antivirales de todo tipo, citostáticos diversos. Existen múltiples polimorfismos.

otros sustratos del citocromo, como los antiepilépticos etosuximida y tiagabina, pero igualmente otros compuestos como los esteroides contraceptivos orales o los antagonistas de los canales de calcio como las dihidropiridinas.

La caracterización de los isoenzimas que metabolizan los antiepilépticos, sobre todo a nivel de los CYP, permite predecir las interacciones metabólicas. Los CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4, son los que metabolizan el 95% de los fármacos, sean antiepilépticos o no y entre ellos el 50-70% de los fármacos pueden ser sustratos del CYP3A4. Es de destacar que algunos antiepilépticos pueden ser sustratos de más de un CYP.

Haciendo un breve repaso de los CYP más relevantes, nos encontramos con el **CYP2C9**, capaz de metabolizar los antiepilépticos fenobarbital, fenitoína, valproato, que pueden competir entre sí y con otros sustratos como los antiinflamatorios no esteroideos como el celecoxib, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, piroxicam, y otros varios como la fluvastatina, el losartán, tolbutamida, warfarina o la zidovudina.

A nivel del **CYP2C19** se metabolizan el diazepam y benzodiazepinas antiepilépticas, el fenobarbital y la fenitoína, así como fármacos psicótropos y otros muy diversos, entre ellos el omeprazol, propranolol, warfarina, etc...

A nivel del **CYP3A4** se metabolizan los antiepilépticos carbamazepina, etosuximida, tiagabina, y algunas benzodiazepinas, el mismo citocromo metaboliza una gran serie de fármacos psicótropos, fármacos cardiovasculares y todo tipo de antivirales y citostáticos.

No podemos olvidar que algunos antiepilépticos son inhibidores de los enzimas degradativos, y uno de los ejemplos más importantes es el del ácido valproico, capaz de inhibir los CYP2C9 y CYP2C19, resultando en una vida media incrementada para los otros sustratos de estos citocromos (Patsalos y Perucca, 2003).

Es importante destacar que los modelos moleculares de los citocromos y su interacción con las reductasas del retículo endoplasmático se

basaban en los datos obtenidos de citocromos bacterianos. Recientemente se ha cristalizado por vez primera un citocromo de mamífero, el CYP2C9 humano, que es también uno de los más relevantes en la degradación de antiepilépticos (William et al., 2003).

IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE CYP450 EN LA FARMACOLOGÍA ANTIEPILÉPTICA

Los polimorfismos de CYP450 más relevantes en la farmacología entiepiléptica son los CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4, ya que son los que metabolizan la práctica totalidad de los fármacos antiepilépticos.

El **CYP2C9** se encuentra localizado en el cromosoma 10, extendiéndose a lo largo de 50.732 pares de bases (50kb), tiene 9 exones y unos intrones de gran tamaño, lo que justifica su gran longitud, codificando una proteína de 490 residuos de aminoácidos. Es el único CYP humano que ha sido cristalizado hasta la fecha (Williams et al., 2003). Entre sus numerosos sustratos destacan, como ya hemos mencionado, el antiepiléptico fenitoína y el valproato. El CYP2C9 muestra polimorfismo genético tanto en la región promotora como en la región codificante, con al menos 5 SNP validados, tienen especial relevancia el CYP2C9*2 y CYP2C9*3, ambos asociados con una marcada disminución en la capacidad metabólica de sus sustratos, comparados con el gen normal CYP2C9*1. Otra variante ha sido solamente identificada en los afro-americanos CYP2C9*5. El conocimiento de la capacidad metabólica del paciente epiléptico puede resultar decisiva a la hora de prescribir un medicamento adecuado, lo que no tiene por qué resultar problemático dada la amplia disponibilidad actual de los antiepilépticos disponibles. Este es un dato más donde se pone de manifiesto la importancia del análisis de polimorfismos en la farmacogenómica.

El **CYP2C19** comparte un 92% de homología de secuencia con el CYP2C9, difiriendo solamente en 43 de los 490 residuos, se encuentran además localizados muy próximos en el cromosoma 10. Sin embargo los dos enzimas tienen una especificidad de sustrato completamente diferente. El CYP2C19 muestra polimorfismo genético, siendo los más des-

tacados CYP2C19*2, CYP2C19*3 y CYP2C19*4, el enzima está ausente en un 3% de los caucasianos y un 20% de los japoneses. El hecho de que los sustratos antiepilépticos de este citocromo, como la fenitoína, el fenobarbital y algunas benzodiazepinas, no sean sustratos exclusivos y puedan ser metabolizados por el CYP2C9 y el CYP3A4, explica que la ausencia de este citocromo no resulte demasiado significativa en tratamientos con los compuestos citados.

El CYP3A4 presenta múltiples polimorfismos de un único nucleótido, habiéndose descrito unos 25 SNP, de los cuales hay 14 con amplia distribución. El gen ocupa unas 260 kb y los cambios se producen tanto en las secuencias de sus 17 exones codificantes, como en los intrones y en la zona promotora. Además puede ser procesado de modo alternativo y originar 12 transcritos diferentes, que codifican 12 isoformas del enzima. Se conocen 6 promotores alternativos y 5 exones que pueden ocupar el último lugar sin solapamiento. Es pues un gen extraordinariamente complejo, que puede dar lugar a una gran variedad de proteínas con funciones variadas, que pueden o no solapar entre sí.

El CYP3A4 es el que más fármacos antiepilépticos metaboliza, destacan entre sus sustratos la carbamazepina, etosuximida, tiagabina, y algunas benzodiazepinas, como hemos anteriormente señalado. Es por tanto importante conocer cómo se encuentra el sistema de degradación en el paciente epiléptico, teniendo en cuenta que no solamente se da el caso de pérdida de actividad, sino que también se pueden dar casos de un aumento de la actividad funcional.

El CYP3A4 considerado normal es el CYP3A4*1 (tipo silvestre), de este alelo se conocen 6 variantes de un único nucleótido (SNP) con modificaciones en la secuencia no codificante, las cuales reciben una letra después del número 1: CYP3A4*1A, B, C, D, E, F. Todas estas modificaciones no repercuten en la actividad de la proteína una vez expresada. No obstante el alelo CYP3A4*17 tiene un cambio de una fenilalanina por serina que origina una disminución de la actividad. Por el contrario, el CYP3A4*18 tiene una sustitución de leucina por prolina en el aminoácido de la posición 293, lo que produce un notorio incremento de la actividad para la mayoría de los sustratos, cuando se

efectúan los estudios *in vitro*. Frente a estas situaciones tan diversas es necesario tener en cuenta el antiepiléptico seleccionado para el tratamiento y la dosis a la que se debe de administrar.

BIBLIOGRAFÍA

- Abriel, H.; Wehrens, X.H.; Benhorin, J.; Kerem, B. and Kassr, S., «Molecular pharmacology of the sodium channel mutation D1790G linked to the long-QT syndrome». *Circulation*, **2000**, *102*: 921-925.
- Avanzini, G. and Franceschetti, S., «Cellular biology of epileptogenesis». *Lancet Neurology*, **2003**, *2*, 33-42.
- Beam, K., «Calcium Channel splicing: mind your Ps and Qs». *Nature Neuroscience*, **1999**, *2*, 393-394.
- Biervert, C.; Schroeder, B.C., Kubish, C., et al., «A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy». *Science*, **1998**, *279*, 403-406.
- Borst, P. and Elferink, R.O., «Mammalian ABC transporters in health and disease». *Annu. Rev. Biochem.*, **2002**, *71*, 537-592.
- Bothwell, S.; Meredith, G.E.; Phillips, J.; Staunton, H.; Doherty, C. et al., «Neuronal hypertrophy in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy». *J. Neurosci.*, **2001**, *21*: 4789-800.
- Cossette, P.; Liu, L.; Brisebois, K. et al., «Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy». *Nat. Genet.*, **2002**, *31*, 184-89.
- Díaz-Hernández, M.; Pintor, J.; Castro, E. and Miras-Portugal, M.T., «Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic terminals». *Neuropharmacology*, **2002**, *42*, 20-33.
- Dingledine, R. and McBain, C.J., «Glutamate and aspartate», 315-333, en *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*, **1999**, 6.^a ed. Editores G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher and M.D. Uhler. Editorial Lippincott-Raven, New York.
- Editorial, «The truth is out there». *The Lancet Neurology*, **2003**, *2*, 261.
- Escayg, A.; MacDonald, B.T.; Meisler, M.H. et al., «Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS-2». *Nat. Genet.*, **2000**, *24*, 343-54.

- Fernández-Braña, M.; García, M.L., De Miguel, P. and Morán, (2003) «Multirresistencia a fármacos antitumorales. Cáncer». *Monografías del Instituto de España*, **2003**, Editores P. García-Barreno, D. Espinós-Pérez and M. Cascales-Angosto, pp. 311-339.
- Goddard, G. V., «The development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity». *Nature.*, **1969**, *214*, 1020-1021.
- Gómez-Villafuertes, R.; J. Pintor; J. Gualix and M.T. Miras-Portugal, «GABA_B receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes». *Neuropharmacology*, **2003**, *44*, 311-323.
- Gómez-Villafuertes R.; Pintor, J.; Gualix, J. and Miras-Portugal, M.T., «GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2004**, in press.
- Jiang, Y.; Ruta, V.; Chen, J.; Lee, A. and MacKinnon, R., «The principle of Gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel». *Nature*, **2003**, *423*, 42-56.
- Lee, G.; Dallas, S.; Hong, M. and Bendayan R., «Drug transporters in the central nervous system: Brain Barriers and Brain Parenchyma considerations». *Pharmacol Rev.*, **2001**, *53*, 569-596.
- Lehmann-Horn, F. and Jurkat-Rott, K., «Voltage-gated ion channels and hereditary disease». *Physiol. Rev.*, **1999**, *79*: 1317-1372.
- Löschner, W., «Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy». *TIPS*, **2002**, *23*, 113-118.
- Mathern, G.W.; Pretorius, J.K., Mendoza, D., et al., «Hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients». *Ann Neurol.*, **1999**, *46*, 343-358.
- Meisler, M.H.; Kearney, J.; Ottman, R. and Escayg, A., «Identification of epilepsy genes in human and mouse». *Annu. Rev. Genet.*, **2001**, *35*, 567-588.
- Morais-Cabral, J.; Zhou, Y. and MacKinnon, R., «Energetic optimisation of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter». *Nature*, **2001**, *414*, 37-48.
- Noebels, J.L., «The biology of epilepsy genes». *Annu. Rev. Neurosci.*, **2003**, *26*, 599-625.
- Patsalos, P.N. and Perucca, E., «Clinically important drug interactions in epilepsy: general features and interactions between antiepileptic drugs». *Lancet Neurology*, **2003**, *2*, 347-356.

- Pellegrini-Giampietro, D.E., «The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death». *TIPS*, 2003, 24, 461-470.
- Powell, E.M.; Campbell, D.B.; Stanwood, G.D.; Davis, C.D.; Noebels, J.L. and Levitt, P., «Genetic disruption of cortical interneuron development causes region- and GABA cell type-specific deficits, epilepsy, and behavioural dysfunction». *J. Neurosci.*, 2003, 23: 622-631.
- Sandoval-Romero, A. y Félix-Grijalva, R., «Ataxia y epilepsia: genes, canales, neuronas y ratones». *Rev. Neurol.*, 2003, 37, 447-453.
- Scheffer, I.E. and Berkovic, S.F., «The genetics of human epilepsy». *TIPS*, 2003, 28, 428-433.
- Siddiqui, A., others and Sisodiya, M., «Association of Multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1». *New. Engl. J. Med.*, 2003, 348, 1442-1448.
- Spencer, S.S., «When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically?», *Lancet Neurology*, 2002, 1, 375-382.
- Steinlein, O.K.; Mulley, J.C.; Propping, P.; Wallace, R.H., Phillips, H.A. et al., «A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy». *Nat. Genet.*, 1995, 11, 201-203.
- Stromme, P.; Mangelsdorf, M.E.; Shaw, M.A.; Lower, K.M. and Lewis, S.M. et al., «Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy». *Nat. Genet.*, 2002, 30, 441-445.
- Sutula, T.; He, X.X.; Cavazos, J. and Scott, G., «Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity». *Science*, 1988, 239, 1147-1150.
- Tamargo, J.L., «Patología de los canales iónicos (canalopatías)». Discurso de entrada en la Real Academia de Ciencias Veterinarias, 2003.
- Taylor, C.P. and Meldrum, B.S., «Na⁺ channels as targets for neuroprotective drugs». *TIPS*, 1995, 16, 309-315.
- Wallace, R., «Mutations in GABA-receptor genes cause human epilepsy». *The Lancet Neurology*, 2002, 1, 212.

Epilepsias

- Wallace, R.H.; Wang, D.W., Singh, R. et al., «Febrile seizures and generalized epilepsy associated with mutation in the Na⁺-channel α_1 subunit gene SCN1B». *Nat. Genet.*, **1998**: 19, 366-70.
- William, P.A.; Cosme, J.; Ward, A.; Angove, H.; Vinkovic, D.M. and Jhoti, H., «Crystal structure of human P450 2C9 with bound warfarin». *Nature*, **2003**, 424, 464-468.
- Wisden, W. and Stephens, D.N., «Towards better benzodiazepines». *Nature*, **1999**, 401, 751-752.
- Yellen, G., «The voltage-gated potassium channels and their relatives». *Nature*, **2002**, 419, 35-42.

Enfermedades neurodegenerativas

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas suelen presentar manifestaciones clínicas diversas, lo que sirve de base para su denominación, no obstante presentan una serie de aspectos comunes. En primer lugar, todas ellas suelen comenzar su sintomatología hacia la década de los cincuenta o posterior; pueden presentar un componente familiar dominante o predisposición, o ser esporádicas; siendo igualmente común la presencia de depósitos proteicos, con estructura repetitiva o polimérica, tanto dentro como fuera de las neuronas. En nuestra población anciana las de mayor incidencia son la demencia asociada a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de las neuronas motoras, conocida como esclerosis lateral amiotrófica, también aunque con menor incidencia están la enfermedad de Huntington, varios tipos de demencia frontotemporal (enfermedad de Pick, etc.) y las enfermedades neurodegenerativas por priones (Creutzfeldt-Jacob, etc.).

Los avances en biología molecular de la última década han permitido identificar una serie de genes relacionados con la patogénesis y desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, facilitando su diagnóstico y análisis epidemiológico. Estos estudios incluyen los factores de riesgo y genes que confieren susceptibilidad a padecer la enfermedad. Los efectos devastadores de estas enfermedades, sobre el propio paciente y su entorno familiar y social, hacen que sean de las más costosas a la

sociedad. Este aspecto junto con el incremento de su incidencia, debido a la prolongación de las expectativas de vida, hace que los ciudadanos sean especialmente sensibles a todo lo referente a la aparición, evolución y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas y que se haya convertido en un tema objeto de investigación prioritaria en todas sus facetas.

CAPÍTULO 2

Enfermedad de Alzheimer

ASPECTOS GENERALES

Existen múltiples tipos de demencia, siendo la de Alzheimer y la asociada con enfermedades cerebro vasculares las más frecuentes, pudiendo ser coincidentes en algunas personas. Otros tipos de demencia incluyen la demencia asociada a Parkinson, la demencia frontotemporal, el alcoholismo en sus últimas etapas, la intoxicación por drogas, la debida a infecciones como sífilis y virus del SIDA, tumores cerebrales, déficits vitamínicos, etc. El diagnóstico correcto de la enfermedad de Alzheimer es difícil, aunque actualmente se dispone de marcadores genéticos que suelen ser muy útiles en el diagnóstico de los casos familiares con aparición precoz. En ausencia de estos marcadores el diagnóstico clínico se basa en la observación de ciertos síntomas como la pérdida de memoria de acontecimientos recientes y de la capacidad de razonar y de manipular objetos cotidianos. La progresión de la enfermedad, que difiere enormemente de unos individuos a otros, lleva a una pérdida completa de la capacidad cognitiva, con total apatía emotiva y desconexión del entorno, siendo la pérdida de las capacidades motoras una de las últimas en manifestarse, en algunos casos el diagnóstico exacto sólo se establece después del fallecimiento. La prevalencia de la enfermedad, es decir, el tiempo de vida del paciente una vez diagnosticado varía considerablemente, entre dos y veinte años. La incidencia

de la enfermedad de Alzheimer varía con la edad incrementándose un 1% por cada año de vida desde los sesenta y cinco a los setenta, y aproximadamente 6% por cada año más de vida desde los ochenta. Para los pacientes con edad superior a sesenta y cinco años la enfermedad de Alzheimer representa la octava causa de muerte y afecta entre un 10 y 30% de la población mayor de ochenta y cinco años. Esta disparidad en el porcentaje de afectados depende de si se incluyen o no las formas menos severas de la enfermedad. Estos porcentajes de incidencia y prevalencia dependen de las fuentes consultadas y cada una da diferentes valores, lo que indica también los límites borrosos que existen para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (Martínez-Lage y Moya-Molina, 2002; Mayeux, 2003). La Asociación Española de Alzheimer indica que existe un 4,3% de la población mayor de sesenta y cinco años que padece la enfermedad en nuestro país.

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Desde el punto de vista de la fisiopatología, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por atrofia notable de la corteza cerebral, con aparición de las placas seniles, que son acúmulos de la proteína β -amiloide junto con otras menos significativas, en el exterior de las neuronas. En el interior de las neuronas aparecen otros acúmulos conocidos con el nombre de ovillos o marañas neurofibrilares. La abundante presencia de las placas de amiloide en el cerebro de los enfermos fue primero descrito por Alois Alzheimer en 1907, en el cerebro de una paciente que sufría demencia precoz. La presencia de estas placas no es exclusiva de los enfermos de Alzheimer y estudios postmortem en personas ancianas control, que al fallecer mantenían intactas sus capacidades mentales, también presentan en mayor o menor medida estas placas de acúmulo de amiloide.

Las técnicas de tomografía axial computerizada (TC), que empezaron a usarse en los años 70 del siglo xx, han permitido acercarse al estado funcional del cerebro intacto. Los primeros estudios realizados en enfermos de Alzheimer aportaron escasa información, pues solamente en situaciones muy avanzadas se podía apreciar la reducción de vo-

lumen cerebral. La situación actual ha cambiado drásticamente, en primer lugar por la mejor resolución de los equipos de TC, en segundo lugar por el seguimiento prolongado de pacientes diagnosticados y la posterior confirmación por estudios anatomopatológicos y en tercer lugar por la aparición de una nueva técnica mucho más precisa, la imagen por resonancia magnética (MRI).

La zona donde se inicia preferentemente el depósito de placas de amiloide y de ovillos neurofibrilares es el cortex temporal, conocida como lóbulo temporal mediano. Esta zona está internamente conectada con el hipocampo, estructura esencial en la formación de la memoria, cada hipocampo suele contener 9 millones de neuronas y en la etapa final de la enfermedad de Alzheimer el número de neuronas suele reducirse en un 84%. La atrofia del hipocampo derecho se correlaciona con la pérdida de la memoria no verbal, y la del hipocampo izquierdo con la de la memoria verbal (Smith, 2002). Estos estudios longitudinales han permitido correlacionar la densidad de los ovillos y las placas seniles con el progreso de la enfermedad, pero sobre todo con la pérdida de neuronas, que no se efectúa al azar, sino en las zonas más ricas en depósitos. También sugieren que la progresión de la enfermedad sigue caminos específicos, propagándose a lo largo de fibras, que conectan áreas concretas en el cerebro. La zona más vulnerable es siempre la del lóbulo temporal mediano y los primeros depósitos de amiloide y ovillos neurofibrilares, en esta área se efectúan al menos 20 años antes de que aparezcan síntomas de la enfermedad.

La inervación del hipocampo por fibras colinérgicas procedentes de los núcleos basales permite establecer una conexión con la destrucción masiva de las neuronas colinérgicas. Aunque existen interneuronas colinérgicas en el estriado y cortex cerebral, las vías que nos interesan son las de axones largos. Las vías cerebrales colinérgicas con axones largos tienen una localización más difusa que las aminérgicas, y no siempre sus cuerpos celulares se corresponden con núcleos definidos. Destacaremos en primer lugar la vía colinérgica que sale de la base del cerebro anterior, cuyos cuerpos celulares se extienden por el septum, la banda diagonal de Broca, el pallidum ventral y sobre todo el núcleo basal de Meynert. Estas neuronas extienden sus axones hasta el bulbo

olfativo, el cortex, la amígdala y el hipocampo, quedando toda la vía del sistema de recompensa cerebral bajo su influencia. Una disminución de la funcionalidad de esta vía parece estar implicada en las disfunciones cerebrales en el Alzheimer, y es probable que sus axones sirvan de guías de propagación. Es de destacar que el núcleo basal de Meynert, que consta de unas 200.000 neuronas, a cada lado del cerebro del individuo sano, suele perder hasta un 90% de sus neuronas en enfermos de Alzheimer. Existen otras dos vías colinérgicas, la que saliendo del meséncéfalo inerva el tálamo y el hipotálamo y la que inerva el cerebelo. Estas dos últimas vías no parecen estar afectadas significativamente en la enfermedad de Alzheimer (Díaz-Hernández et al., 2000).

Circuitos neurales más vulnerables en la enfermedad de Alzheimer

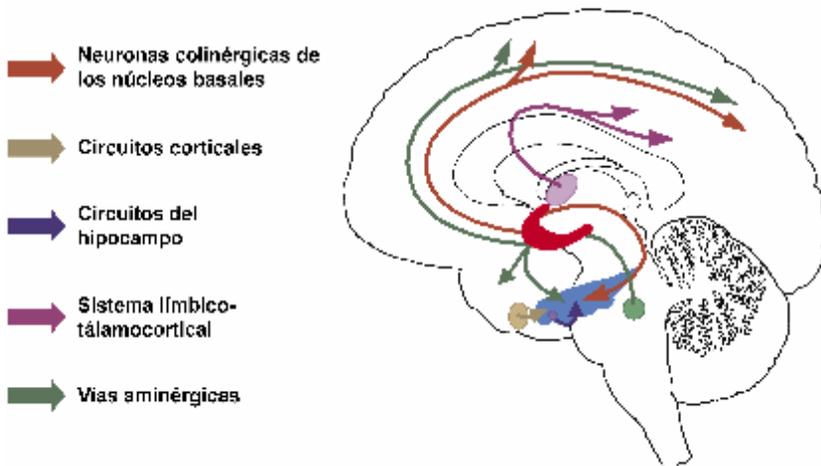


Figura 8.—Esquema de los circuitos neurales afectados en la enfermedad de Alzheimer. La secuencia exacta de lo que ocurre desde el inicio hasta llegar a las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alzheimer es una incógnita y posiblemente se pueda recorrer el camino por muy diversas vías hasta que la enfermedad presenta sus síntomas con claridad. La disminución de las neuronas colinérgicas de axones largos fue considerada durante mucho tiempo como la hipótesis más plausible en la aparición de la enfermedad. Hoy día sabemos que es uno de los aspectos, entre muchos otros, y que de modo general todas las vías y neurotransmisores pueden verse afectados en mayor o menor medida. De modo singular destacar que estudios a largo plazo de tomografía axial computerizada (TC) e imagen por resonancia magnética (MRI) señalan que aproximadamente unos veinte años antes de la presencia de síntomas es el lóbulo temporal mediano del cerebro humano donde se pueden observar los primeros acúmulos de amiloide.

La constatación de que la neurotransmisión colinérgica estaba comprometida en la enfermedad de Alzheimer, dio pie a toda una gama de aproximaciones farmacológicas y nutritivas tratando de paliar el déficit (Perry et al., 1999). En primer lugar los alimentos ricos en lecitinas y otros lípidos conteniendo colina, fueron recomendados, incluido el huevo. Los fármacos dirigidos al sistema colinérgico fueron los primeros empleados y todavía siguen vigentes.

La acetilcolinesterasa cataliza la reacción de hidrólisis de acetilcolina produciendo colina y acetato. En humanos existe sólo un gen y se conocen múltiples variantes alélicas, a las que se está buscando relación con mayor o menor sensibilidad a padecer la enfermedad. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa, como la tacrina, el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina, se han utilizado en la farmacología de tratamiento de Alzheimer para impedir la hidrólisis de la acetilcolina. Se pretende de este modo, que el neurotransmisor permanezca más tiempo en la sinapsis colinérgica en contacto con sus receptores. Los resultados son inciertos, sin mejoría apreciable en las funciones cognitivas después de seis meses de tratamiento y con graves efectos secundarios en el hígado. Algunas de estas sustancias se siguen empleando, pero la bondad de sus acciones es muy discutida (Perry et al., 1999; Scarpini et al., 2003).

La farmacología dirigida a la acetilcolinesterasa tropieza con el obstáculo de que sólo existe un gen. El transcrito primario del gen puede sufrir procesamientos alternativos que conducen a variaciones en la secuencia proteica localizados en la zona del carboxilo terminal y contienen la información para unirse a diferentes proteínas, como los tallos de colágeno, glicolípidos, etc., anclándose como ecto-enzima en las membranas plasmáticas, u originar las formas solubles. Estas distintas formas de procesamiento, al presentar un centro catalítico idéntico para todas, no permiten realizar una farmacología diferencial, y los inhibidores afectan por igual a todos los enzimas independientemente del tejido en que se encuentren.

ASPECTOS GENÉTICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La mayor parte de los casos de Alzheimer son esporádicos, sin embargo los estudios epidemiológicos indican que aproximadamente un 30% de los pacientes tiene algún caso en la historia familiar y aproximadamente un 10% presentan una transmisión autosómica dominante. Los genes implicados en la enfermedad de Alzheimer son cada vez más numerosos, pero podemos hacer una clasificación en dos grandes grupos:

1) *Genes cuya alteración produce la enfermedad, que suele ocurrir en una edad temprana alrededor de los cincuenta años (genes de la proteína precursora de amiloide, preselinina-1 y preselinina-2).*

2) *Genes cuya anomalía, expresión de un alelo concreto o polimorfismo, se detecta en los casos de aparición tardía de la enfermedad y que se consideran como factores de riesgo.*

Las mutaciones en el gen que codifica la *Proteína Precursora de Amiloide (APP)*, cursan con la aparición de la enfermedad en edad temprana. Los animales genéticamente modificados que sobre-expresan la proteína normal, o las proteínas mutadas de APP, desarrollan placas de amiloide en su cerebro de modo muy prematuro, y son un modelo para el estudio de la enfermedad. Es de destacar que el gen de APP está localizado en el cromosoma 21, lo que ofrece una explicación al temprano envejecimiento y formación de placas seniles en los portadores de trisomía 21, conocida como mongolismo o síndrome de Down. Curiosamente los animales en los que se elimina la expresión del gen de APP, no sufren grandes alteraciones y son viables, aunque es difícil en esos modelos interpretar las posibles disfunciones de comportamiento, si no son muy acusadas.

Las mutaciones en el gen de la *Preselinina 1* están asociadas con más de un tercio de los casos de Alzheimer familiar. Este gen se encuentra en el cromosoma 14 y es esencial para el procesamiento de múltiples de proteínas de membrana, incluido el APP.

Las mutaciones del gen de la *Preselinina-2* son menos abundantes, se encuentra localizado en el cromosoma 1 y también producen Alzheimer

de modo autosómico dominante en edad temprana. Existe un 67% de homología en la secuencia de aminoácidos entre la preselinina-1 y la 2.

Los genes que confieren susceptibilidad genética son muy numerosos y la lista dista mucho de estar completa (Corder et al., 1993; Migliore y Copedè, 2002). Entre ellos destaca el gen de la *Apoproteína-E*, del que existen tres alelos, el más común es el APOE3. El gen APOE4 es el menos frecuente en la población general, con un escaso 14%, pero está presente en un 50% de los enfermos de Alzheimer tardío. Es interesante destacar que la APOE forma parte de las lipoproteínas tipo HDL, que recogen el colesterol sobrante de las membranas y lo transfieren a otras células. Una recogida menos eficaz podría interferir en la fluidez de membranas y su plasticidad, otro aspecto es que la presencia del alelo APOE-2 parece conferir cierta resistencia a sufrir la enfermedad. De todos modos, la gran mayoría de portadores del alelo APOE-4, aunque tengan dos copias de este gen, no sufre la enfermedad de Alzheimer. El grupo del Profesor Valdivieso en nuestro país ha hecho contribuciones excelentes en este campo y ha demostrado que el polimorfismo existente en la zona promotora del gen, que se localiza en el brazo largo del cromosoma 19, podría incidir sobre sus niveles de expresión (Bullido y Valdivieso, 2000; Laws et al., 2003).

El gen que codifica la $\alpha 2$ -macroglobulina presenta polimorfismo genético y alguna de sus variantes aparece asociada al Alzheimer tardío. Otros genes, alguna de cuyas variantes alélicas o polimórficas han sido relacionados son los siguientes: Interleukina-1, óxido nítrico sintasa 3 (NOS3), El citocromo CYP2D6, que participa en procesos de detoxificación de componentes de la alimentación o de fármacos, etc...

Es notorio destacar la poca importancia que parecen tener el gen *Tau* que codifica una proteína que estabiliza el citoesqueleto de tubulina, los microtúbulos. Existen seis isoformas de Tau, todas ellas procedentes de procesamientos alternativos de un único gen. El acúmulo de Tau hiperfosforilada origina los ovillos neurofibrilares presentes en el interior de las neuronas en la enfermedad de Alzheimer. Curiosamente portadores de mutaciones en el gen Tau no suelen padecer Alzheimer y sí otro tipo de demencias, cómo la frontotemporal, asociada algunas

veces con Parkinson. El acúmulo de ovillos neurofibrilares es prominente en los portadores de la mutación, pero normalmente no se desarrollan placas de amiloide.

De los aspectos genéticos de la enfermedad es importante señalar como resumen que:

Además de las mutaciones que inducen la aparición de la enfermedad de Alzheimer precoz, que son transmitidas de forma autosómica dominante, el descubrimiento de nuevos genes implicados en las formas tardías y su asociación nos permitirá conocer la naturaleza poligénica y multifactorial de la enfermedad, así como evitarla en lo posible.

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE LAS PROTEÍNAS RELEVANTES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. GENERACIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE

En la actualidad conocemos con cierto detalle la estructura y procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP), la localización subcelular de los enzimas implicados y las causas que inciden en un procesamiento anómalo y posterior acúmulo extracelular de su producto de degradación, el péptido β -amiloide. Existe, no obstante, mucha incertidumbre sobre el papel fisiológico desarrollado por la APP y sus péptidos derivados, así como sobre su eliminación en situaciones normales en las que no se forman placas extracelulares de amiloide.

La proteína precursora de amiloide, APP

Esta proteína se expresa en muchos tejidos, donde da lugar a diferentes isoformas por procesamiento alternativo del RNA, mensajero inicial y modificaciones post-translacionales. En las neuronas se encuentra en dendritas, cuerpos celulares y axones y la isoforma más abundante es la que contienen 695 aminoácidos (Selkoe, 1999). En esta isoforma se han eliminado el péptido inicial y un péptido localizado en la zona intermedia, pero se sigue manteniendo la numeración hasta 770

aminoácidos, que es la forma más larga de la proteína (Selkoe, 1999). La APP se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, como corresponde a una proteína que contienen un dominio transmembrana que comprende los aminoácidos del 700 al 723. La parte más prominente de la proteína que comprende desde el amino terminal hasta el 700 está mirando hacia el lumen del retículo y posteriormente del Golgi o de las vesículas secretoras, finalmente al fusionarse con la membrana plasmá-

Estructura y procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP)

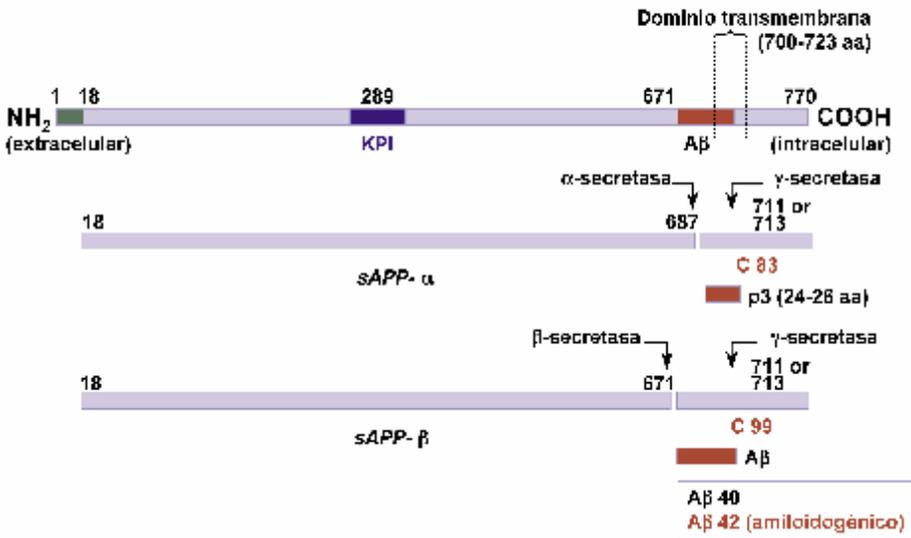


Figura 9.—Esquema general del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP).

La proteína precursora de amiloide es transmembrana, con un gran segmento amino-terminal que se localiza mirando al interior del retículo endoplasmático o el sistema de Golgi, hasta que se inserta en la membrana plasmática y queda hacia el espacio extracelular. Los enzimas de procesamiento son enzimas hidrolíticos localizados en las membranas y se conocen como α , β y γ secretasas. Independientemente de los enzimas que actúen siempre se genera un gran péptido o proteína extracelular, un péptido de pequeño tamaño correspondiente a la zona transmembrana y, finalmente, un péptido o fragmento carboxilo terminal citosólico para el que se postulan diversos efectos en la señalización intracelular.

La α y la β secretasas nunca actúan conjuntamente. Si actúan la α y la γ secretasas, el péptido transmembrana generado tiene un tamaño pequeño y no forma acúmulos. Por el contrario, si actúan la β y γ secretasas, se originan fragmentos de la zona transmembrana de 40 ó 42 aminoácidos y es el péptido A β 42 el de mayor poder amiloidogénico por su facilidad para formar agregados y polímeros con estructura en hoja plegada β .

tica quedará mirando hacia el medio extracelular. La parte citosólica de la proteína es más reducida y comprende solamente los residuos del 723 al 770. Esta zona citosólica tiene gran afinidad por la quinesina, que es un motor molecular que se mueve de modo anterógrado del soma hacia las terminales axónicas, de este modo el APP actuaría como la zona de reconocimiento del anclaje molecular para el transporte de las vesículas (Kamal et al., 2001). Además, de la parte citosólica del APP se derivan una serie de fragmentos, o péptidos, conocidos como fragmentos carboxiterminal (CTF), algunos de los cuales están implicados en señalización.

La proteína APP tiene un gran dominio extracelular y se desconoce si puede servir como receptor, o ligando de otras proteínas situadas en las membranas, efectuando funciones de reconocimiento, señalización o maduración y diferenciación celular, lo mismo que proteínas análogas como Notch que sirven como señales de migración neural y morfogénesis. Se desconoce también si el procesamiento último de APP para liberar la gran porción extracelular requiere de una señalización o interacción previa a su hidrólisis. No se puede descartar que la zona intracelular de la proteína APP pueda servir como andamiaje para que interaccionen otras proteínas del citoesqueleto, o sirva para reorganizar alguna ruta o cascada enzimática. Finalmente los péptidos intracelulares originados en el procesamiento, que se corresponden con el carboxilo terminal podrían tener una función sobre el control de la transcripción, de modo análogo a lo que conocemos de Notch (Annaert y De Strooper, 2002).

El procesamiento de la proteína APP tiene lugar durante el viaje desde el retículo hasta la membrana plasmática, e incluso puede finalizar una vez anclada en la membrana plasmática, tanto a nivel de las dendritas como presináptica. En las vesículas secretoras aisladas a lo largo del axón se han encontrado tanto el APP como los enzimas de procesamiento, almacenándose en el lumen del orgánulo los trozos procedentes de la proteólisis, que serán vertidos al exterior de la célula, en este caso de la neurona.

Los enzimas de procesamiento, α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa

El procesamiento de la APP, requiere tres enzimas y otras proteínas que ayudan a su completo metabolismo (Esler y Wolfe, 2001). Si actúan la α -secretasa y la γ -secretasa, se produce un péptido más pequeño que no forma agregados moleculares. Si por el contrario actúan la β -secretasa y la γ -secretasa, es cuando se puede formar el péptido β -amiloide de 42 aminoácidos que forma agregados moleculares y posterior formación de placas de amiloide. Es importante reseñar que estos enzimas no son exclusivos del procesamiento de la proteína precursora de amiloide, y tienen otros muchos sustratos, cuyas funciones en el sistema nervioso son mejor conocidas que las del APP. La localización de estos enzimas a nivel subcelular no siempre es coincidente y por ello existe una cierta intriga respecto a otras posibles funciones, sobre todo en el caso de algunos componentes del complejo de la γ -secretasa.

La α -secretasa

La α -secretasa es una Zn^{2+} dependiente metaloproteasa, realmente es una familia de enzimas proteolíticas ancladas a la membrana plasmática mediante un único segmento transmembranar en alfa-hélice, entre ellas se encuentran las conocidas como ADAM10 y ADAM17, también denominada TACE. El centro catalítico es similar al del enzima convertidor de angiotensina (ACE). Cortan el APP en el aminoácido 687 de la secuencia, produciendo un péptido carboxiterminal de 83 residuos. Estos enzimas son necesarios para el procesamiento de otras proteínas con función señalizadora en la membrana, como la Nocht, implicada en desarrollo y diferenciación, la proteína precursora de priones, el $TNF\alpha$, $TGF\alpha$, TNF -Receptor, ErbB4, etc. Aunque en todas las células que expresan APP existe una actividad basal de α -secretasa, ésta puede ser aumentada por fosforilación a través de proteína quinasas, sobre todo la proteína quinasa C (PKC). La actividad neuronal suele activar este enzima a través de las señales de calcio, y también la acetilcolina a través de sus receptores muscarínicos, siendo ésta una de las razones esgrimidas para utilizar agonistas colinérgicos muscarínicos en el trata-

miento de Alzheimer. La búsqueda de sustancias o vías capaces de activar la α -secretasa es una de las líneas de investigación para canalizar el procesamiento de APP por la vía no amiloidogénica.

Función de la α -secretasa en el procesamiento de APP

Procesamiento no amiloidogénico: APP-porción extracelular + p3

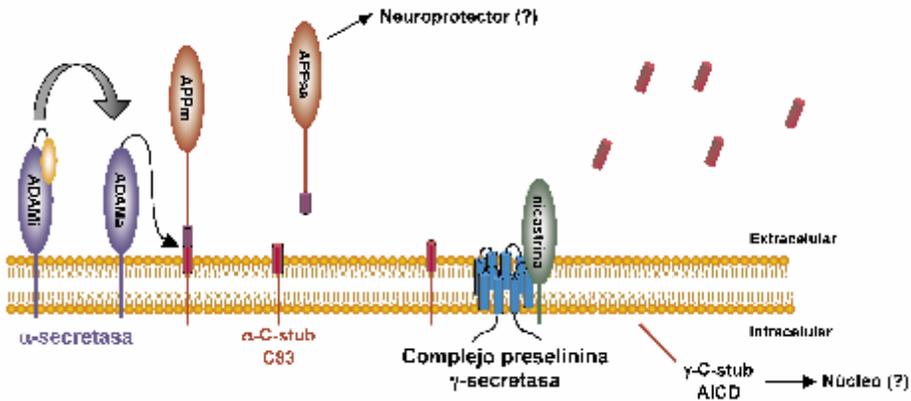


Figura 10.—Acción de la α -secretasa.

La familia de enzimas de la α -secretasa contienen Zn^{2+} en el centro activo y están ancladas en la membrana plasmática, actúan originando un péptido extracelular de gran tamaño, al que se le supone una función señalizadora, relacionado con factores de mantenimiento y crecimiento celular, aunque por el momento sus receptores diana son desconocidos. El péptido remanente de 83 aminoácidos, todavía anclado en la membrana, contiene el carboxilo terminal y es uno de los sustratos de la γ secretasa, que puede originar factores que señalizan al núcleo celular.

La β -secretasa (BACE)

La β -secretasa (BACE) es el primer enzima en el procesamiento alternativo de APP, que conduce a la vía amiloidogénica. Son una familia de enzimas de las que se conocen al menos dos miembros, la BACE1 y la BACE2. Son aspartil proteasas, se anclan en la membrana a través de una única hélice, que presenta un centro activo muy similar al de la pepsina y a la proteasa del virus del sida, con dos residuos de ácido aspártico actuando de modo coordinado, además el centro activo es muy accesible. Se localizan en la membrana en la proximidad del

APP, rompiendo el enlace peptídico por el residuo 671, produciendo un péptido carboxi terminal de 99 aminoácidos. Por analogía con los inhibidores de la pepsina se han sintetizado derivados de la pepstatina, y otros péptido miméticos, capaces de ser absorbidos por el intestino y transportados por las diferentes membranas celulares, incluida la barrera hemato-encefálica. Aunque parece ser una buena diana farmacológica, la expresión generalizada de este enzima en tejidos ampliamente vascularizados, la analogía de su centro activo con múltiples aspartil proteasas y su posible implicación en el procesamiento de otras proteínas de membrana, hacen que se deba de ser muy riguroso en el control de los posibles efectos secundarios (Esler y Wolfe, 2001; Wolfe, 2002). La BACE1 es el enzima expresado mayoritariamente en neuronas y un aspecto interesante es que los animales en los que se ha bloqueado la expresión de este gen no muestran anomalías y son perfectamente via-

Función de la β -secretasa en el procesamiento de APP

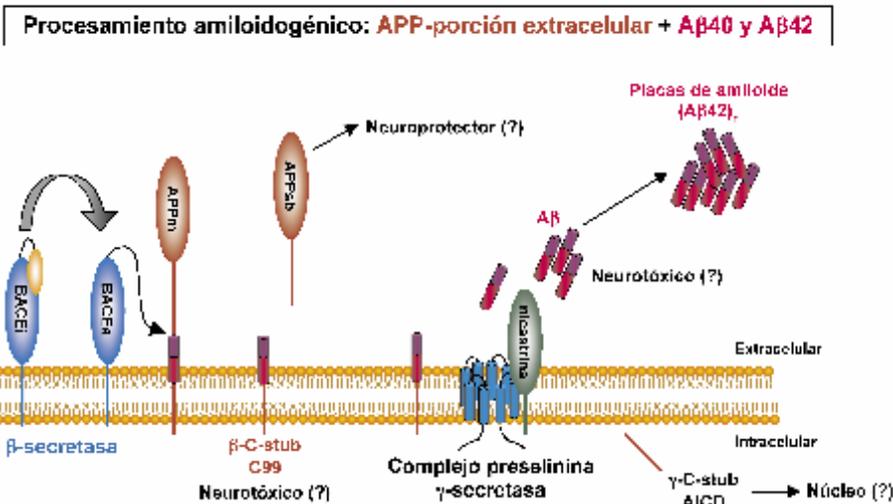


Figura 11.—Acción de la β -secretasa.

La familia de enzimas de la β -secretasa son aspartil proteasas y cortan la APP produciendo un gran fragmento amino-terminal con posibles acciones extracelulares, todavía no conocidas, y un péptido carboxilo terminal de 99 aminoácidos anclado en la membrana que va a ser uno de los sustratos de la γ secretasa y en donde se inicia la vía de formación del péptido amiloidogénico A β 42. La porción carboxilo terminal podría tener acciones en el citosol o el núcleo todavía no bien definidas.

bles, pero con una acusada reducción de los niveles de producción del péptido β -amiloide.

La γ -secretasa (Preselininas)

La γ -secretasa (Preselininas) es de hecho un complejo enzimático que requiere al menos cuatro proteínas adicionales para procesar el péptido carboxiterminal originado por la acción previa de la α -secretasa o la β -secretasa. *El centro activo del complejo está contenido en la proteína conocida como preselinina, que se comporta como una aspartil proteasa, pero cuyo centro activo está dentro de la membrana y es poco accesible, Este aspecto es importante, pues rompe el enlace peptídico en pleno dominio transmembrana de los derivados del APP. Corta la proteína fundamentalmente en dos lugares, la valina 711, o la alanina 713, el porcentaje de cada corte es variable, pero es extremadamente importante para definir la toxicidad del producto. Si el péptido procesado procede de la acción de la α -secretasa, se forma un péptido, muy pequeño el p3 de 24 ó 26 aminoácidos, que no forma agregados. Si por el contrario el péptido procede de la acción de la β -secretasa, el enzima puede originar un péptido de 40 aminoácidos al cortar por la valina 711, que es soluble, el A β 40, o un péptido de 42 aminoácidos que polimeriza en forma de hoja plegada β , y es conocido como A β 42. La presencia en el carboxilo terminal de una serie de aminoácidos hidrofóbicos (valina-isoleucina-alanina) en el A β 42, favorece la interacción inicial de los péptidos y su posterior plegamiento. La interacción con otras proteínas extracelulares es lo que originará a la larga los depósitos de amiloide. En estas zonas de procesamiento es donde se han encontrado las mutaciones más peligrosas capaces de inducir Alzheimer familiar, tanto en las proximidades de la actuación de la beta, como de la gamma secretasa. Estas mutaciones suelen incrementar la actividad de estos enzimas, produciéndose más A β 42, o incluso péptidos de mayor tamaño.*

La naturaleza de la γ -secretasa ha sido difícil de elucidar. Por estudios de coinmunoprecipitación, efectos de los RNA de interferencia y animales genéticamente modificados, sabemos actualmente que es un complejo con varias proteínas, una de ellas la preselinina, cuyas

mutaciones, tanto de la preselinina-1, como de su homóloga, la preselinina-2, son la mayor causa del Alzheimer familiar. Estas proteínas

Regulación de la γ -secretasa: complejo preselinina y conexión con Tau-Li⁺-GSK-3

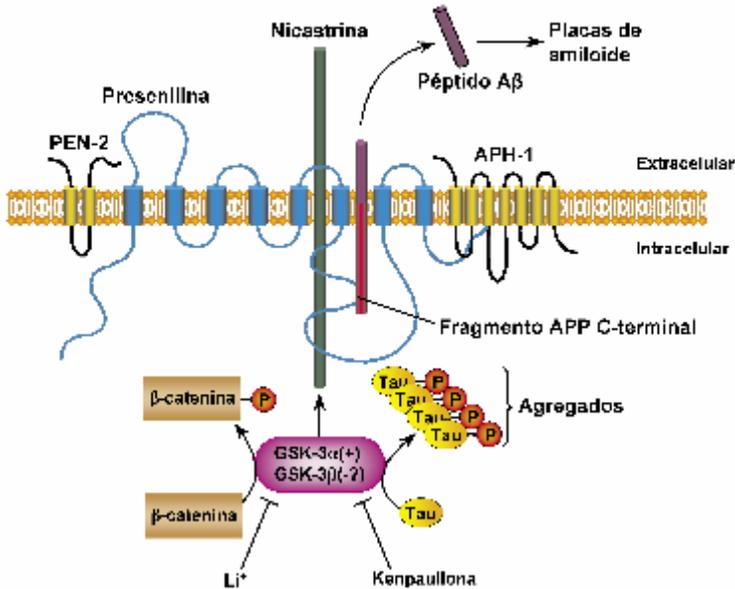


Figura 12.—Complejo de la γ secretasa. Componentes y regulación.

La actividad de la γ secretasa se corresponde con un complejo enzimático en donde son necesarias varias proteínas. El centro activo del complejo reside en la preselinina, que se comporta como una aspartil proteasa con el centro activo dentro de la bicapa lipídica y poco accesible. Corta en aminoácidos hidrofóbicos de la proteína APP, la valina 711, o la alanina 713, que están dentro de la zona transmembrana, de los péptidos generados previamente por las α y β secretasas. También puede procesar otros péptidos transmembranarios procedentes de proteínas necesarias en diferenciación, desarrollo y todo tipo de señalizaciones. La función de la nicastrina, aunque confusa, parece ser la de fijar el péptido transmembranario para su hidrólisis, restringiendo su movilidad.

Otras dos proteínas, conocidas como PEN-2 y APh1 tienen la función de activar e inhibir respectivamente el complejo y están localizadas en la membrana plasmática. Los niveles altos de colesterol en la membrana plasmática favorecen la actividad de la preselinina, formándose de forma preferente el péptido amilodogénico A β 42.

La actividad del complejo de la γ secretasa sobre la APP parece estar también regulada por la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), enzima que al activarse puede fosforilar múltiples sustratos, desde los enzimas de síntesis del glucógeno hasta la proteína Tau, cuya forma fosforilada es el principal componente de los ovillos neurofibrilares. En el caso de la APP, ésta se fosforila en la zona carboxilo terminal, convirtiéndose en un mejor sustrato de la γ secretasa. La GSK-3 es inhibida por litio y por una familia de compuestos conocidos como kenpaullonas.

tienen ocho dominios transmembrana, al ser procesadas se forman dos cadenas, quedando configurado el centro activo con dos residuos de aspártico funcionales. Es seguro que el centro catalítico de la γ -secretasa reside en la preselinina, y los inhibidores se unen selectivamente a esta proteína, pero cada vez es más evidente que se requieren otros componentes para que el complejo enzimático sea funcional y estable. Los componentes conocidos hasta el momento son: 1) La preselina que contienen el centro catalítico. 2) La proteína nicastrina, denominada así por ser descubierta en una familia con Alzheimer hereditario del pueblo de Nicastro en Italia, la proteína coimmunoprecipitaba con la APP. 3) La proteína A β 1 inhibe la actividad del complejo y se descubrió como factor de diferenciación. 4) Finalmente, la proteína PEN-2 activa el complejo y la formación del péptido A β (Chan y Jan, 1999; Ebinu y Yankner, 2002; Wolfe, 2002; Mattson, 2003).

Puesto que el procesamiento de APP requiere la acción conjunta de dos de las secretasas es importante plantearse su localización a nivel subcelular. Las α -secretasa y β -secretasa parecen estar localizadas en los mismos lugares, principalmente en el sistema de Golgi, y vesículas que van hacia la periferia. Sus centros catalíticos están mirando al lumen vesicular y en la última etapa quedan expuestos al espacio extracelular. Una situación diferente es la localización de la preselinina-1, que es la proteína catalítica del complejo de la γ -secretasa, pues parece tener una localización preferente en el retículo endoplasmático y más difusa en otras estructuras subcelulares. Este dato ha servido para proponer una función chaperona de la preselinina, ayudando al plegamiento de proteínas en el retículo. Es posible que las mutaciones de esta proteína, que conducen a un Alzheimer familiar temprano, puedan ser causa del conocido como *estrés del retículo endoplásmico* y establece un nexo de unión y paralelismo con otras situaciones de estrés celular, como la síntesis de proteínas extrañas, las víricas entre otras, o proteínas propias con plegamiento anómalo (Sisodia et al., 2001).

La γ -secretasa, ha demostrado ser una diana farmacológica sorprendente, pues se dispone de buenos inhibidores, pero este complejo enzimático también procesa otras proteínas de membrana tan importantes

como las proteínas Nocht, los sensores de esteroides que irán al núcleo (SREBP), los factores TNF- α , el Erb-4, entre otras. Sería por lo tanto extraordinariamente peligroso inhibir este enzima sin arriesgarse a graves efectos secundarios. Pero lo sorprendente es que de los dos posibles cortes que realiza la γ -secretasa sobre el péptido derivado de APP, solamente el corte más próximo al carboxilo terminal produce el péptido A β 42, que es el único amiloidogénico.

Acción de los antiinflamatorios no esteroideos sobre la γ -secretasa

La pregunta es: ¿Se podría actuar sobre la γ -secretasa para que cortara preferentemente en la zona más alejada del carboxilo terminal y produjera el péptido de 40 aminoácidos, A β 40, en vez del A β 42 que es el peligroso? La respuesta ha sido proporcionada al conocerse que un subgrupo de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), como el ibuprofeno, la indometacina y el sulindac, favorecen la producción del péptido de 40 aminoácidos no amiloidogénico. Estas acciones son independientes de sus efectos inhibitorios sobre las ciclooxigenasas (COX-1, COX-2) y requieren concentraciones mucho menores (Wolfe, 2002; Weggen et al., 2001). Recientemente se ha descrito que los NSAIDs son capaces de inducir la expresión de la APOE en células gliales (Aleong et al., 2003). De confirmarse estos efectos, la farmacología podría abrir una nueva vía de aproximación al problema con aparentemente menos efectos secundarios.

Acción del colesterol sobre las β -secretasa y la γ -secretasa

Altos niveles de colesterol en la membrana incrementan la actividad de las β -secretasa y γ -secretasa, por el contrario una reducción disminuye la actividad de ambos enzimas. Esta observación establece un nexo de unión entre los niveles de colesterol y la eficiencia de su retirada de las membranas con los depósitos de amiloide y la importancia de la presencia del alelo apoE-4, menos eficaz en la formación de las lipoproteínas y el transporte del colesterol (Tanzi y Bertram, 2001; Hartman, 2002). Este alelo, apoE-4, está presente en un 30-50% de los

pacientes que sufren Alzheimer tardío. Estos resultados corroboran observaciones realizadas por los clínicos en pacientes tratados con estatinas, inhibidoras del enzima clave de síntesis del colesterol, en los que se retrasaba la aparición de los síntomas de Alzheimer y la existencia de una cierta correlación entre los niveles de colesterol y el mayor riesgo de padecer Alzheimer, además de enfermedades cardiovasculares.

COMPLEJO DE LA γ -SECRETASA: OTRAS FUNCIONES, NEUROGÉNESIS Y MEMORIA

Conforme se amplía el número de proteínas de membrana que se conoce, son procesadas por el complejo de la γ -secretasa, se comienza a intuir que la proteína precursora de amiloide, APP, es solamente una entre otras muchas y quizá no la más importante, ya que alteraciones de su procesamiento permiten el desarrollo del individuo hasta edades tardías, una vez pasada la etapa reproductiva.

Entre los sustratos del complejo de la γ -secretasa se encuentran muchas de las proteínas conocidas como proteínas de membrana tipo I. Estas proteínas están ancladas en la membrana por una única α -hélice y suelen tener el amino terminal hacia la parte externa de la membrana y el carboxilo terminal hacia dentro de la membrana. Señalar que el complejo enzimático también se encuentra en el retículo endoplasmático, en donde la parte extracelular se corresponde con el lumen de las vesículas o estructuras endoplasmáticas. El tamaño de la parte citósolica y extracelular de estas proteínas es ampliamente diverso y depende de las posibles funciones. Entre las proteínas sustrato del complejo, además de APP, están la proteína Nocht, los sensores de esteroides que irán al núcleo (SREBP), factores de crecimiento como el TNF- α , o receptores de factores de crecimiento los receptores Erb-4, que reconocen factores de la familia del EGF, como la neuregulina. Muchos de los sustratos procesados tienen una doble función: 1) Pueden reconocer otras proteínas de membrana por su parte extracelular, organizar el tejido y una vez hidrolizados servir como factores de señalización difusibles hacia lugares más lejanos, como el caso del TNF- α , y 2) el fragmento citosólico puede servir de señalización con múltiples posibilidades, por ejemplo,

uniéndose a factores nucleares presentes en el citosol e impidiendo que viajen al núcleo, o bien siendo ellos mismos factores con efecto nuclear.

Uno de los sustratos de la γ -secretasa que mejor representa todo el potencial de señalización que se puede generar es el de la proteína Notch. A nivel extracelular reconoce los receptores conocidos como DSL (delta, serrate, lag, etc.) que van a mediar en la migración celular, neurodiferenciación y división celular asimétrica. Una vez establecido el contacto se produce el procesamiento y el fragmento citosólico conocido como NICD (Notch Intracellular Carboxy Domain) viaja al núcleo donde se une a un factor nuclear denominado CSL, que es un represor y lo transforma en un poderoso activador de la transcripción de genes implicados en la neurogénesis, en donde resulta esencial en la formación de dendritas y arborización neural (Ebinu y Yankner, 2002; Selkoe y Kopan, 2003). Así pues vemos que el complejo media en las primeras fases de neurogénesis y también en la posible neurodegeneración a través de APP.

Citaremos también otro de los sustratos de la γ -secretasa, la proteína N-cadherina, que es esencial para estabilizar las zonas de reconocimiento inter-neuronales, incluyendo entornos sinápticos, este efecto lo realiza mediante la zona extracelular. Al actuar la γ -secretasa el fragmento citosólico denominado N-cad/CTF2 (fragmento citosólico de la N-cadherina), se une en el citosol a un factor nuclear, el CBP, al que impide viajar al núcleo y lo dirige hacia la destrucción. Si por el contrario la N-cadherina no es procesada, al no existir el fragmento N-cad/CTF2, el CBP va al núcleo e incrementa la respuesta de los genes CREB, que son esenciales en la estabilización sináptica y la memoria. La cuestión es qué sucede cuando tenemos una preselina mutada en el complejo de la γ -secretasa. Se cree que estas enzimas hidrolizan de preferencia la proteína APP, con mayor afinidad, y que pierden al menos parcialmente la capacidad de hidrolizar la N-cadherina. De este modo se puede intuir que el acúmulo de los péptidos de amiloide vaya pareja a las disfunciones en la memoria reciente y también que sean las mutaciones en preselinina, las que llevan a las formas más tempranas y más agresivas de Alzheimer familiar conocido (Fortini, 2003; Marambaud et al., 2003).

Sería por lo tanto extraordinariamente peligroso inhibir este enzima sin arriesgarse a graves efectos secundarios. Antes de finalizar la acción del complejo de la γ -secretasa, es necesario recordar que este complejo es necesario tanto para la neurogénesis procesando Notch, como las acciones derivadas de los productos de APP, por ello es posible entrever que sea una estructura organizada que media las fases iniciales en el cerebro en desarrollo y también las fases tardías en la neurodegeneración. Lo que sabemos o entrevemos en este complejo de la γ -secretasa es realmente la punta del iceberg (Takasugi et al., 2003; Mattson, 2003).

GSK-3 LA CONEXIÓN ENTRE LAS PLACAS DE AMILOIDE Y LOS OVILLOS INTRACELULARES. NUEVAS APORTACIONES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El litio, empleado en el tratamiento de desórdenes psiquiátricos, se ha demostrado que reduce la producción del péptido A β 42 en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer. La deducción es que el litio actúa sobre una de las proteínas que participa en la generación del péptido. Los estudios en pacientes con la enfermedad de Alzheimer han demostrado notables cambios en el cerebro, incluyendo la formación de depósitos de proteínas conocidos como placas de amiloide fuera de la célula y de ovillos neurofibrilares dentro de las células. La pregunta es si los tratamientos deben de ser dirigidos a evitar la formación de uno u otro acúmulo. Trabajos recientes han establecido que existe una conexión entre ambos depósitos a través del enzima glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) (De Strooper y Woodgett, J., 2003; Phiel et al., 2003).

La GSK-3 es un enzima altamente conservado durante la evolución, es una serina/treonina quinasa que se activa en respuesta a múltiples estímulos y se incluye en cascadas de señalización relacionadas con el mantenimiento, crecimiento y diferenciación celular. A su vez fosforila una gran cantidad de proteínas y uno de sus sustratos más relevantes en relación con la enfermedad es la proteína Tau, que en su forma hiperfosforilada es el componente mayoritario de los ovillos neurofibrila-

res. A raíz de estos datos, la GSK-3 se convirtió en una diana para evitar la formación de acúmulos intracelulares y se desarrollaron una serie de inhibidores, encontrándose que el litio y la kenpaullona eran capaces de inhibir el enzima. Lo sorprendente es que tanto uno como el otro inhibidor eran también capaces de reducir la síntesis de los péptidos amiloides $A\beta$ en cultivos neurales. Estos inhibidores demostraron que también eran eficaces *in vivo* ratones transgénicos empleados como modelo de la enfermedad de Alzheimer.

De este modo los inhibidores del enzima GSK-3 pueden ser una diana importantísima tanto para evitar la formación de los ovillos como la de placas extracelulares. No obstante es necesario comprender los mecanismos moleculares mediante los cuales se evita la formación de placas extracelulares, ya que la comprensión de los mecanismos de formación de ovillos parece obvia por su relación directa en la fosforilación de la proteína Tau.

¿Cómo participa la GSK-3 en la producción del péptido $A\beta$? Para interpretar la respuesta es necesario tener presentes los componentes del sistema de procesamiento de la proteína APP. Tanto la α -secretasa, como la β -secretasa, no parecen estar moduladas por la actividad de la GSK-3 y el litio o la kenpaullona no reducen su actividad. No obstante, la actividad del sistema de la γ -secretasa se reduce con la adición del litio o de otros inhibidores de la GSK-3, apareciendo los fragmentos de la zona carboxilo terminal citosólicos del APP, de mayor tamaño, al no ser hidrolizados por este enzima y disminuyendo concomitantemente los péptidos amiloides extracelulares.

La cuestión es: ¿Cómo activa la GSK3 al complejo de la γ -secretasa para hidrolizar el APP? Este complejo contiene al menos cuatro proteínas: Preselinina-1, APH-1, PEN-2 y nicastrina, y cualquiera de ellas podría ser sustrato de fosforilación de la GSK3. Tanto la GSK-3, como la β -catenina, otro de sus sustratos se asocian con facilidad a la preselinina-1. No obstante, los inhibidores de la GSK-3 no interfieren en el procesamiento de otros sustratos de la Preselinina-1, como es el caso de la proteína Nocht, que es un marcador de destino celular en la etapa embrionaria y adulta. Esto sugiere que la GSK-3 podría actuar direc-

tamente sobre la APP, mediante fosforilación en su zona carboxilo terminal, lo que da todavía más relevancia a los inhibidores, pues no interferirían con otras proteínas cuyo procesamiento es esencial para mantener las funciones y el subtipo celular de la diferenciación.

Vista la relevancia que adquiere la GSK-3, es necesario conocer con detalle su naturaleza, en primer lugar existen dos isoformas, cada una con su gen correspondiente, la GSK-3 α y la GSK-3 β , ambos enzimas tienen muy conservados sus centros catalíticos, aunque difieren en las secuencias amino y carboxi terminal. El litio inhibe ambas isoformas, pero los estudios con RNA de interferencia para silenciar la expresión de cada isoforma de modo secuencial han demostrado que la isoforma más importante en la producción del péptido amiloide es la GSK-3 α . Más relevante todavía desde el punto de vista farmacológico es el dato de que el litio parece afectar solamente la producción del péptido amiloide, sin reducir el procesamiento de la proteína Nocht. No obstante los sustratos de las dos isoformas de GSK-3 son muy relevantes en el mantenimiento del citoesqueleto y el metabolismo celular (la β -catenina, la Tau, metabolismo de azúcares, etc...) y podrían originar efectos secundarios no fácilmente previsibles. Referente a los niveles de litio, este ión se emplea frecuentemente en el tratamiento de desórdenes psiquiátricos, como los desórdenes bipolares, con cambios bruscos y extremos entre la depresión y la euforia. En estos pacientes el riesgo reside en que la ventana terapéutica para obtener los efectos está muy próxima a los efectos tóxicos induciendo nefropatía. En ratones los niveles de litio requeridos para reducir la producción de los péptidos amiloides son muy bajos y es probable que en humanos no se alcancen niveles tóxicos.

Esta ventana a la esperanza no puede obviar, sin embargo, el hecho de que los fragmentos citosólicos del APP parecen tener una función señalizadora al núcleo y es posible que se generen o alteren una serie de caminos de señalización que sólo será posible evaluar en animales de experimentación adecuados.

FOSFORILACIÓN/DEFOSFORILACIÓN, LA COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

En el apartado anterior hemos analizado la importancia de la GSK-3 en la fosforilación de proteínas citosólicas, sobre todo Tau, y también el efecto de la fosforilación del dominio citosólico de APP en su procesamiento. Para comprobar que la fosforilación es causa de producción excesiva de péptidos amiloidogénicos y también de los ovillos de Tau, sería interesante disponer de modelos en donde se alterara la etapa en reverso de la defosforilación. Actualmente se dispone de un modelo de ratón en donde se ha reducido considerablemente la defosforilación de las proteínas, que son sustratos de la GSK-3, y se confirma la importancia de la hiperfosforilación en el acúmulo de depósitos intracelulares.

Los marcadores neuropatológicos relevantes de la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías incluyen las placas seniles y/o los ovillos neurofibrilares. Es de destacar que los modelos experimentales de Alzheimer se han generado mediante la sobreexpresión de proteínas específicas, incluyendo la proteína precursora de amiloide, preselininas y Tau, o de sus variantes genéticas. La hipótesis de que una alteración en la fosforilación podría participar en el incremento de los depósitos de amiloide hacía necesario encontrar alguna proteína cuyo bloqueo produjera un incremento de los marcadores. Es un hecho que en la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías se produce un acúmulo de proteínas fosforiladas, siendo la proteína Tau una de las más abundantes en los ovillos. Generalmente las secuencias de fosforilación incrementadas corresponden a serina o treonina en posición previa a una prolina (ser/treo-pro) y las fosfatasa clásicas entre las que se encuentra la proteína fosfatasa 2 A (PP2A), que reconocen la secuencia, necesitan que el aminoácido-prolina esté en la conformación adecuada, para ello se necesita de una isomerasa, la prolil-isomerasa Pin1. En su ausencia se acumulan las formas fosforiladas del epitopo ser/treo-pro, esto es lo que ocurre en los animales genéticamente modificados en los cuales se ha bloqueado (knockout) el gen del enzima prolilisomerasa (Pin1). Estos animales Pin1^{-/-} acumulan Tau hiperfosforilada, presentan formación de ovillos neurofibrilares a edad muy temprana y características típicas de la neurodegeneración por taupatías y en la enfermedad de Alzhei-

mer, demostrando que la expresión de $\text{Pin1}^{-/-}$ se correlaciona inversamente con la vulnerabilidad neuronal en el cerebro normal (Liou et al., 2003). Esto indica la complejidad de la neurodegeneración y también que la homeostasis neuronal para un funcionamiento correcto requiere de señales que producen fosforilación de proteínas, siendo necesaria la etapa posterior y menos selectiva de defosforilación. Es también la primera evidencia de que la hiperfosforilación de proteínas neurales está directamente implicada en la neurodegeneración y el primer knockout de un gen relacionado directamente con el proceso, el modelo de ratón $\text{Pin1}^{-/-}$, así lo confirma.

TOXICIDAD POR FRAGMENTOS DE APP: A β 42 Y PÉPTIDOS CITOSÓLICOS

Por analogía con la señalización mediada por el dominio citosólico de otras proteínas de membrana, que una vez hidrolizadas se transforman en factores nucleares, como el de Nocht, SREBP y ErbB-4. Es probable que el péptido carboxilo terminal que queda libre en el citosol después de actuar la γ -secretasa sobre el APP tenga también otras funciones (Ebinu y Yankner, 2002). Se discute actualmente que el péptido, o fragmento, carboxilo terminal CTF γ 59, podría ser una señal productiva, mientras que el péptido más corto el CTF γ 57, que se produce cuando se genera el amiloide A β 42, sería una señal pro-apoptótica, que induciría la activación de proteasas intracelulares, conocidas como caspasas. Análisis post-mortem de los enfermos de Alzheimer presentan, según algunos autores, un elevado número de neuronas en estado de apoptosis. Pero hay voces muy críticas, pues, aunque el proceso tenga lugar, la enfermedad de Alzheimer es de progresión muy lenta y si la muerte neuronal ocurre a gran velocidad, el curso de la enfermedad sería de algunas semanas y no de décadas. Hoy día la visión es más moderada, y se trata de analizar los datos de modo más racional. En primer lugar, el A β 42 es tóxico para las neuronas de hipocampo en cultivo, pero en el cerebro de los enfermos el péptido no suele estar «bañando» toda la topología neuronal y es la sinapsis la zona más vulnerable. En dispositivos de cultivo de neuronas, haciendo solamente accesible la zona axónico-sináptica al A β 42, se observa una alteración

del citoesqueleto, mitocondrias y otras estructuras presentes en la sinapsis. Esta observación ha generado un nuevo término y por analogía con la apoptosis celular se denomina **sinaptosis**. En el cerebro de los enfermos de Alzheimer algunas terminales nerviosas se verían sometidas a un proceso de destrucción lenta, y la neurona lucharía siempre por mantenerla y recuperarla. Cuando estos mecanismos fracasan, y la destrucción de la sinapsis es completa, la neurona se vería, además, privada del aporte de factores de crecimiento suministrados por la neurona adyacente en la sinapsis y las células gliales de ese entorno, iniciándose la retracción del axón, y posteriormente del cuerpo neural y muerte celular. El proceso sería así extremadamente lento, tratando la neurona de resistir lo máximo posible (Marx, 2001).

TRATAMIENTOS PALIATIVOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y GENÉTICA MOLECULAR

El éxito reciente de la selección de embriones, previa implantación para evitar la transmisión de la Corea de Huntington, enfermedad devastadora, autosómica dominante que se manifiesta hacia los 40 años y en algunos casos después de generar descendencia, ha suscitado que la Asociación de Enfermos de Alzheimer pida posibilidades similares para los afectados de Alzheimer familiar que sean portadores de los genes que originan la forma temprana de la enfermedad, la cual es también autosómica dominante. La selección de embriones se haría solamente en los portadores del gen APP mutado, o las preselininas 1 y 2 mutadas. Los argumentos que señalan son los mismos esgrimidos en la enfermedad de Huntington y sería la única forma de cortar la transmisión de una enfermedad tan devastadora y atroz, de evitar el sufrimiento familiar y reducir costes en una sociedad envejecida que dentro de poco no podrá hacer frente a su situación geriátrica. De todos modos, antes de que esta posibilidad se generalice, habrá que hacer frente a los múltiples casos que existen y que se desarrollarán en un futuro.

En los apartados anteriores sobre los mecanismos moleculares básicos que subyacen en la enfermedad de Alzheimer, hemos analizado la importancia de los fármacos anti-acetilcolinesterasa, que a pesar de sus

nada aconsejables efectos secundarios y escasa efectividad terapéutica son de los más empleados: tacrina, donepezilo, etc...

Farmacología actual de la enfermedad de Alzheimer

Fármacos basados en:

- 1) Hipótesis colinérgica.**
- 2) Hipótesis de excitotoxicidad de glutamato.**
- 3) Hipótesis de la neuroprotección.**
- 4) Inhibidores de β y γ -secretasas.**
- 5) Vacunación contra el péptido A β .**
- 6) Terapéuticas antiagregantes de amiloide.**
- 7) Quelantes de metales cobre y zinc.**
- 8) Antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, indometacina,...).**
- 9) Anticolesterolemia (estatinas, fluvastatina, inhibidores de la síntesis de colesterol,...).**
- 10) La nueva farmacología de la GSK-3: litio y kenpaullonas.**

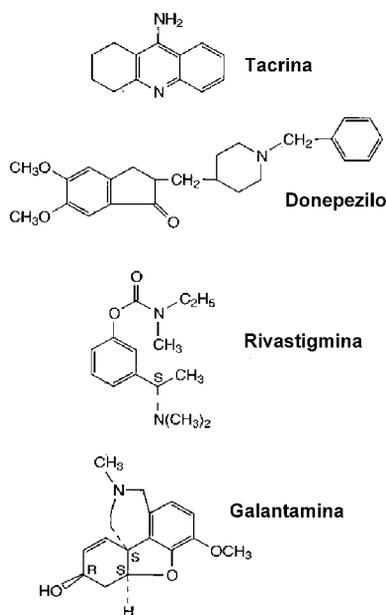
El posible empleo de inhibidores de β -secretasa, aunque se han sintetizado toda una serie de péptidos miméticos, sigue sin desarrollarse, en previsión de los efectos secundarios derivados de bloquear la formación de factores de crecimiento cuyos precursores están en la membrana plasmática.

Se ha sugerido la posibilidad de emplear estatinas para reducir el colesterol reduciendo de este modo el corte de las β y γ -secretasas. De modo análogo se ha sugerido el empleo de los antiinflamatorios no esteroideos, cuyas acciones se relacionan con la mayor expresión de genes implicados en el transporte de colesterol a través de las HDL, en acciones nucleares no relacionadas con la actividad de las ciclooxigenasas. De todos modos parece difícil realizar una medicación preventiva con este tipo de compuestos, que tendrían que ser administrados durante toda la vida y cuyos efectos secundarios, no deseables, son bien conocidos.

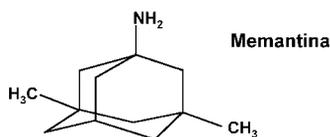
Una nueva esperanza se ha abierto con la acción del litio sobre el enzima GSK-3 y los inhibidores conocidos como Kenpaullonas, cuyo alcance y posibilidades reales terapéuticas habrá que asegurar en el futuro.

Los intentos por remediar los efectos de la enfermedad de Alzheimer han llevado a tratar de vacunar contra los péptidos A β y han aparecido numerosas publicaciones al respecto. Las vías de vacunación han sido desde la nasal a la intracerebral y la compañía Elan Farmacéutica, una de las más implicadas, paró las investigaciones en fase II, en marzo de 2002, después de comprobar la aparición de síntomas consistentes con los de una meningoencefalitis (Scarpini et al., 2003).

Inhibidores de acetilcolinesterasa



Inhibidores del receptor ionotrópico de glutamato tipo NMDA (neuroprotectores)



Inhibidores de GSK-3

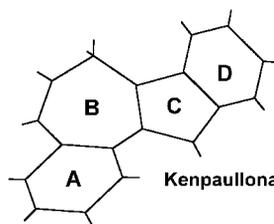


Figura 13.—Principales fármacos comercializados para paliar los efectos de la enfermedad de Alzheimer.

Los inhibidores de acetilcolinesterasa son los empleados desde hace más tiempo en el tratamiento, pero se enfrentan con el grave problema de que en humanos sólo existe un gen de este enzima y sin variaciones en el centro activo, con lo que no existe la posibilidad de explotar los resquicios de la diversidad tan útiles en farmacología. Los anti-acetilcolinesterasa utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer necesitan acceder al sistema nervioso central y contienen una considerable parte hidrofóbica que les permite atravesar la barrera hematoencefálica, lo que aumenta también su toxicidad a nivel hepático.

Otros compuestos disponibles actúan sobre el receptor ionotrópico de glutamato de tipo NMDA, destaca entre ellos la memantina, que también se recomienda en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y otras situaciones de estrés celular, como neuroprotector.

Los inhibidores de GSK3, como litio y kenpaullonas, necesitan de una seria evaluación de sus posibilidades reales.

Otro aspecto relevante concerniente a los efectos tóxicos de los péptidos, ha sido el que en niños que nacen con el síndrome de Down, portadores de una dotación adicional del gen APP y de su producto proteico, se desarrolla toxicidad mitocondrial con exceso de calcio intracelular. Esto ha servido para tratar de relacionar la enfermedad de Alzheimer con la excitotoxicidad y paliar los efectos evitando la despolarización masiva de las neuronas con neuroprotectores. Entre los neuroprotectores más usados está el fármaco de moda, denominado Memantina, que actúa bloqueando el poro del receptor de NMDA, que es el receptor ionotrópico de glutamato, impidiendo así la masiva entrada de sodio, pero sobre todo del ión calcio y la excitotoxicidad. Este fármaco se empleó antes como neuroprotector. Sus efectos en Alzheimer son cuando menos escasísimos y una evaluación rigurosa de su validez es cada vez más necesaria. En Estados Unidos la FDA lo ha aprobado, pero con múltiples reservas, ya que según los miembros del comité, los efectos son muy escasos, o marginales en la mejora cognitiva del enfermo de Alzheimer.

Otros muchos fármacos han sido desarrollados, pero no es todavía evidente que hayamos alcanzado el grado de conocimiento básico suficiente para desarrollar una farmacología precisa y eficaz (Palmer, 2002; Scarpini et al., 2003).

Normalmente, tendemos a pensar que las causas que originan una enfermedad tan devastadora como ésta, deben de radicar en proteínas con funciones importantísimas en el funcionamiento celular, pero el hecho de que los animales en los que se ha suprimido el gen del APP no sufran ninguna anomalía contradice en cierto modo el pensamiento inicial. En el otoño de 2002 falleció René Thom, padre de la *teoría de catástrofes*, y esto me trae a la memoria que tal vez sea el acúmulo de pequeñas catástrofes, ayudado por algún rasgo genético y medio-ambiental, y sobre todo por la función tiempo, lo que define la situación en la enfermedad de Alzheimer. Es necesario conocer cómo se producen las catástrofes para intentar evitarlas y así dilatar el tiempo. De todos modos, en la gran tragedia de la enfermedad de Alzheimer conocemos el escenario y algunos actores, empezamos a descifrar sus monólogos, pero carecemos del hilo conductor de sus diálogos desde el primer acto hasta que cae el telón.

BIBLIOGRAFÍA

- Annaert, W. and De Strooper, B., «A cell biological perspective on Alzheimer's disease». *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **2002**, 18, 25-51.
- Aleong, R.; Aumont, N.; Dea, D. and Poirier, J., «Non-steroidal anti-inflammatory drugs mediate increased in vitro glial expression of apolipoprotein E protein». *Eur. J. Neurosci.*, **2003**, 18, 1428-1436.
- Bullido, M.J. and Valdivieso, F., «Apolipoprotein E Gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease». *Microsc. Res. Tech.*, **2000**, 50, 261-267.
- Chan, Y.-M. and Jan, Y.N., «Preselinins, processing of β -amyloid precursor protein, and Notch signalling». *Neuron*, **1999**, 23, 201-204.
- Corder, E.H. et al., «Gene dose of apolipoprotein E type allele and the risk of Alzheimer disease in late onset families». *Science*, **1993**, 261, 921-923.
- De Strooper, B. and Woodgett, J., «Mental plaque removal». *Nature*, **2003**, 423, 392-393.
- Díaz-Hernández, M.; Gualix, J.; Gómez-Villafuertes, R.; Castro, E.; Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T., «Receptores nicotínicos neurales: interacción con receptores purinérgicos». *Real Academia de Farmacia*, **2000**, 66, 165-183.
- Ebinu, J.O. and Yankner, B.A., «A RIP tide in neuronal signal transduction». *Neuron*, **2002**, 34, 499-502.
- Esler, W.P. and Wolfe, M.S., «A portrait of Alzheimer secretases-new features and familiar faces». *Science*, **2001**, 293, 1449-1454.
- Fortini, M.E., «Double trouble for neurons». *Nature*, **2003**, 425, 565-566.
- Hartman, T., «Cholesterol, A β and Alzheimer's disease». *TINS*, **2001**, 24, 45-48.
- Kamal, A.; Almenar-Queralt, A.; LeBlanc, J.; Roberts, E.A., and Goldstein, L.S.B., «Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing β -secretase and preselinin-1 requires APP». *Nature*, **2001**, 414, 643-648.
- Laws, S.M.; Hone, E.; Gandy, S. and Martins, R., «Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription». *J. Neurochem.* **2003**, 84, 1215-1236.

- Liou, Y-C.; Sun, A.; Ryo, A.; Zhou, X.Z.; Yu, Z-X.; Huang, H-K.; Uchida, T.; Bronson, R.; Bing, G.; Li, X.; Hunter, T. and Lu, K.P., «Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration». *Nature*, **2003**, *424*, 556-561.
- Marambaud, P.; Wen, P.; Dutt, A.; Shioi, J.; Takashima, A.; Sima, R. and Robakis, N.K., «A CBP Binding repressor produced by the PS1/ β -cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations». *Cell*, **2003**, *114*, 635-645.
- Martínez-Lage, J.M. and Moya-Molina, M.A., «Enfermedad de Alzheimer». Capítulo 5 de *Enfermedades neurodegenerativas*. Editado por Farmaindustria, Editores Segovia de Arana, J.M y Mora Teruel, F., **2002**, pp.53-69.
- Marx, J., «New leads on the how of Alzheimer disease». *Science*, **2001** (293), 2192-2194.
- Mattson, M.P., «Ballads of a protein quartet». *Nature*, **2003**, *422*, 385-387.
- Mayeux, R., «Epidemiology of Neurodegeneration». *Annu. Rev. Neurosci.*, **2003**, *26*, 81-104.
- Migliore, L. and Coppedè, F., «Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases». *Mutation Research*, **2002**, 1-19.
- Palmer, A.M., «Pharmacotherapy for Alzheimer disease: progress and prospects». *TIPS*, **2002**, *23*, 426-433.
- Perry, E.; Walker, M.; Grace, J. and Perry, R., «Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?», *TINS*, **1999**, *22-6*, 273-280.
- Phiel, C.J.; Wilson, C.A.; Lee, V.M.-Y. and Klein, P.S., «GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides». *Nature*, **2003**, *423*, 435-439.
- Scarpini, E.; Scheltens, P. and Feldman, H., «Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives». *Lancet Neuro.* **2003**, *2*, 539-547.
- Selkoe, D.J., «Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease». *Nature*, **1999**, *399*, supp-A23-A31.
- Selkoe, D.J. and Kopan, R., «NOTCH and preselinin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration». *Annual Review of Neuroscience*. **2003**, *26*, 565-597.

Enfermedad de Alzheimer

- Sisodia, S.S.; Annaert, W.; Kim, S.-H. and De Strooper, B., « γ -Secretase: never more enigmatic». *TINS*, **2001**, *24*, 2-6.
- Smith, A.D., «Imaging the progression of Alzheimer pathology through the brain». *PNAS*, **2002**, *99*, 4135-4137.
- Takasugi, N.; Tomita, T.; Hayashi, I.; Tsuruoka, M.; Niimura, M.; Takahashi, Y.; Thinakaran, G. and Iwatsubo, T., «The role of preselinin cofactors in the γ -secretase complex». *Nature*, **2003**, *422*, 438-441.
- Tanzi, R.E. and Bertram, L., «New frontiers in Alzheimer's disease genetics». *Neuron*, **2001**, *32*, 181-184.
- Weggen, S. et al., «A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity». *Nature*, **2001**, *414*, 212-216.
- Wolfe, M.S., «Therapeutic strategies for Alzheimer's disease». *Nature reviews. Drug discovery*, **2002**, *1*, 859-866.

CAPÍTULO 3

Enfermedad de Parkinson

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson es la más representativa entre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con anomalías del movimiento, con una prevalencia que se incrementa con la edad y que afecta aproximadamente a un 1% de la población a la edad de sesenta y cinco años (Mayeux, 2003). La enfermedad se caracteriza por una lentitud de movimientos, denominada bradiquinesia, rigidez muscular, temblor con movimientos involuntarios de las manos y trastorno del equilibrio, que dificulta la marcha. Fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson, quien la denominó *parálisis agitante*. En época tan temprana como 1912, Lewy describe que existen en estos pacientes unas inclusiones en el citoplasma de las neuronas, demostrándose más tarde que las neuronas principalmente afectadas eran las de la sustancia nigra. Aunque los cuerpos (inclusiones) de Lewy pueden aparecer en otras neuronas, su presencia en la sustancia nigra, junto con la pérdida de células dopaminérgicas, se consideran aspectos neuropatológicos esenciales para diferenciar el Parkinson idiopático de otros desórdenes motores. Una excelente revisión en castellano es la de Obeso et al. (2002).

ORIGEN DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El origen de la enfermedad de Parkinson puede ser muy diverso, de hecho existe una alta incidencia relacionada con el empleo de pesticidas agrarios y más recientemente el descubrimiento de una toxina, originada como subproducto en la síntesis de análogos sintéticos de la heroína (Cowen, 2002; Migliore y Coppedè, 2002).

Se conocen patologías específicas de las vías dopaminérgicas, siendo la enfermedad de Parkinson la más conocida, con o sin demencia asociada. Los modelos para destruir selectivamente las neuronas dopaminérgicas se basan en el transporte específico de análogos de la dopamina en las terminales sinápticas. La primera toxina en ser utilizada fue la 6-OH-dopamina, que con tres sustituyentes hidróxilos en su anillo aromático se oxida con gran facilidad. Esta sustancia, por su extraordinaria analogía con la dopamina, es internalizada por los transportadores selectivos de las terminales sinápticas, desde donde difunde al soma y destruye las neuronas dopaminérgicas, produciendo especies altamente reactivas que inducen necrosis o apoptosis según la dosis. Fue también la primera en ser empleada para trazar los mapas cerebrales y permitió definir en el año 1971, las vías dopaminérgicas, entre ellas la nigroestriatal y la más difusa tegmental ventral que llega hasta el sistema límbico y el cortex (Ungerstedt, 1971). Es posible que la dopamina actúe de modo similar a la 6-OH-dopamina, aunque de un modo mucho más suave. Es evidente que la sustancia nigra, núcleo donde residen los somas de las neuronas dopaminérgicas, recibe ese nombre por el acúmulo de compuestos negruzcos, similares a la melanina (neuromelanina), originados en la oxidación, ciclización y polimerización de la dopamina.

El modelo de Parkinson en animales mediante el empleo de 6-OH-dopamina es de fácil desarrollo y muy rápido, por lo que se sigue empleando en la actualidad, incluso como modelo para el desarrollo de terapias con células madre. Actualmente se dispone de otro modelo, que mimetiza con mayor precisión y de modo más selectivo las disfunciones del Parkinson en humanos. En este modelo el agente tóxico es el 1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina (MPTP), que es oxidado a 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺) (Kopin, 1992; Herken and Hucho, 1992).

Este metabolito oxidado es captado con gran selectividad por las terminales dopaminérgicas del estriado, en donde produce alteraciones de la función mitocondrial, generándose radicales libres de oxígeno ROS, que participan en la destrucción de las neuronas. La muerte neuronal se produce por degeneración axónica, alcanzando lentamente el soma neural localizado en la parte compacta de la sustancia nigra. El desarrollo de los síntomas de Parkinson es lento y depende de la dosis. Curiosamente la única vía dopaminérgica dañada es la nigro-estriatal, quedando indemne la vía tegmental ventral que inerva el cortex y el sistema límbico.

Generalmente los primeros síntomas de la enfermedad aparecen cuando se han perdido un 60% de las neuronas dopaminérgicas y en las etapas más avanzadas se pueden llegar a perder hasta un 90%, con la correspondiente pérdida del neurotransmisor dopamina. Una vez conocida la vía de síntesis de dopamina, el precursor L-DOPA fue propuesto como agente terapéutico por Arvid Carlsson en 1959. Este investigador recibió el Premio Nobel de Medicina en el año 2000 (Carlsson, 2001). Con las técnicas de tomografía de emisión de positrones (PET), es posible utilizando un análogo de la L-DOPA, la [¹⁸F]fluoroDOPA, sustrato de la descarboxilasa que genera dopamina, visualizar en el cerebro *in vivo* el estado funcional de las neuronas dopaminérgicas. Las imágenes obtenidas permiten comprobar cómo los síntomas de Parkinson se correlacionan con la pérdida de volumen del núcleo de la sustancia nigra.

FUNCIÓN NEUROTRANSMISORA DE LA DOPAMINA

El neurotransmisor dopamina es una catecolamina que se sintetiza a partir del aminoácido tirosina por hidroxilación del anillo aromático, mediante el enzima tirosina hidroxilasa (TH). El producto de la reacción es la L-DOPA, que es posteriormente descarboxilada por la aminoácido aromático descarboxilasa. El producto resultante es la dopamina, una de las catecolaminas más importantes de cerebro. La dopamina está almacenada en vesículas y se libera a la sinapsis por exocitosis regulada.

La dopamina actúa sobre el estriado a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, modulando generalmente los niveles de AMP cíclico y la fosforilación de proteínas, estos receptores son conocidos como D1, D2, D3, D4 y D5. Los tipos D1 y D5 activan el enzima adenilatociclasa, incrementando los niveles de AMPc, mientras que los tipos D2, D3 y D4 los disminuyen. En el *núcleo estriado* hay una gran abundancia de receptores de tipo D1, sobre todo en el soma de las neuronas colinérgicas, que a su vez establecen contacto sináptico con las gabaérgicas del mismo núcleo. Éstas a su vez establecen sinapsis inhibitoras tanto en el *globus pallidus* como formando un bucle de retrocontrol sobre las dopaminérgicas de la *sustancia nigra*.

La comprensión de los mecanismos moleculares de actuación de la dopamina y sus cascadas de señalización intracelular se deben a los esfuerzos del grupo de Paul Greengard, galardonado con el Premio Nobel de Medicina en el año 2000 (Greengard, 2001).

IMPORTANCIA DE LA RECAPTACIÓN DE DOPAMINA Y METABOLISMO ENZIMÁTICO Y NO-ENZIMÁTICO

El neurotransmisor, una vez que ha actuado, es recaptado con gran selectividad por el transportador específico localizado en las terminales sinápticas dopaminérgicas, que se denomina transportador de dopamina (DT). Aproximadamente el 95% de la dopamina es internalizada para su reutilización. A nivel de este transportador de la membrana plasmática es donde actúa la cocaína, que es un excelente inhibidor, obligando de este modo a una permanencia prolongada de la dopamina en el espacio extracelular y provocando la sensación de euforia por sus acciones sobre los receptores situados en el sistema límbico. Este transportador es esencial para la captación de los análogos de dopamina que van a actuar como tóxicos en la neurona dopaminérgica y que le confieren su gran especificidad en los mecanismos tóxicos (Baumgarten y Zimmermann, 1992).

La dopamina, una vez internalizada al citosol de la neurona dopaminérgica, necesita ser recaptada por el transportador vesicular. Este

transportador es menos selectivo y puede internalizar todas las aminas aromáticas, se denomina transportador vesicular de monoaminas, sus siglas son VMAT, y existen dos genes con distinta distribución en las neuronas simpáticas centrales y periféricas, en las neuronas dopaminérgicas se expresa sobre todo el gen del VMAT2. La captación eficaz por parte de la vesícula es absolutamente necesaria, pues de otro modo la dopamina podría difundir hasta la membrana externa de la mitocondria, donde está localizada el enzima monoamina oxidasa (MAO).

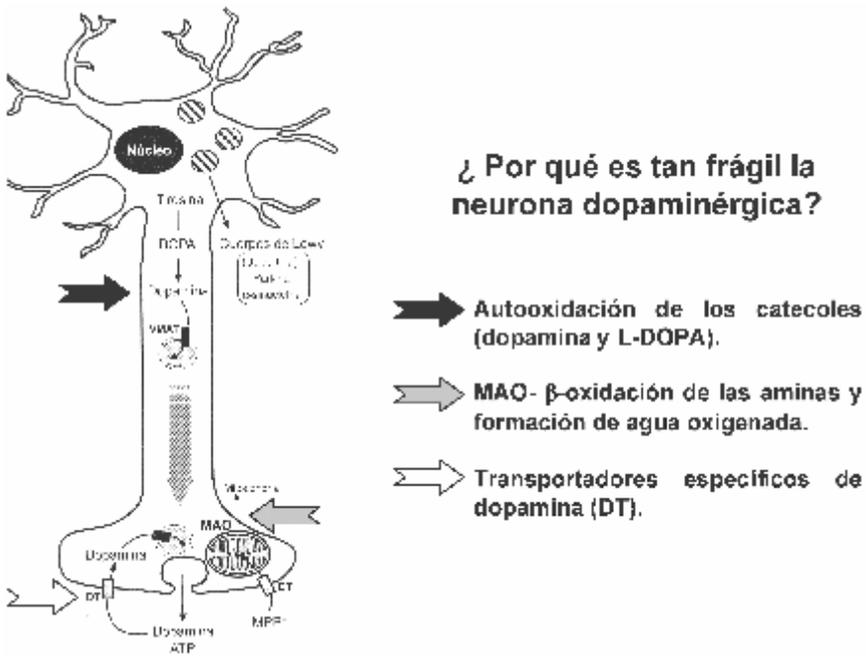
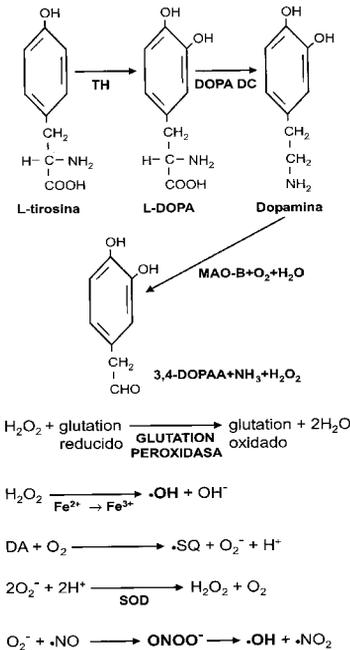


Figura 14.—Aspectos relevantes de la neurona dopaminérgica.

La neurona dopaminérgica posee una serie de enzimas y transportadores que le permiten mantener su identidad neurotransmisora y por lo tanto su función. Curiosamente, es lo que preserva su identidad lo que está en el origen de su vulnerabilidad. En primer lugar, tanto el precursor L-DOPA, como la dopamina, son catecoles que pueden oxidarse espontáneamente y producir sustancias poliméricas negruzcas. En segundo lugar, si la dopamina no es recaptada rápidamente por los transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT), puede ser oxidada por la monoaminoxidasa B (MAO-B), produciéndose peróxido de hidrógeno y radicales libres. Por último, el transportador específico de dopamina, situado en la membrana plasmática (DT), es el lugar de entrada de modo específico a esta neurona de toda una serie de sustancias tóxicas, como la 6-OH-dopamina o el MPP⁺.

La oxidación de la dopamina por la MAO produce un aldehído altamente reactivo y agua oxigenada, que necesita una detoxificación posterior. Pero son las reacciones no enzimáticas las que escapan al control celular y se convierten en altamente peligrosas, produciendo radicales libres que dañan directamente el ADN mitocondrial y nuclear, así como otras proteínas funcionalmente relevantes (Floyd y Hensley, 2002). El hecho de que sea la propia dopamina la que genera la aparición de radicales libres, explicaría la tendencia a morir por oxidación de las neuronas dopaminérgicas, y también que el tratamiento prolongado con L-DOPA pueda resultar tóxico a largo plazo sobre las neuronas dopaminérgicas, no sólo de la sustancia nigra, sino también de otras neuronas dopaminérgicas de las vías que van al sistema límbico y afectan el comportamiento. En el apartado dedicado a los aspectos funcio-



- La excesiva formación de radicales libres puede constituir uno de los mayores procesos patogénicos en la enfermedad de Alzheimer.

- La MAO-B genera H₂O₂.

- El exceso de hierro puede incrementar los procesos oxidativos y el riesgo de Parkinson.

- El O₂ oxida de modo no enzimático la dopamina y otros catecoles generando ión superóxido.

- El enzima superóxido dismutasa elimina el ión superóxido.

- El ión superóxido y el óxido nítrico, originan los poderosos radicales libres peroxi-nitrito y el radical hidroxilo.

Figura 15.—Vía de síntesis de la dopamina y degradación enzimática y no enzimática. Generación de radicales tóxicos.

TH, tirosina hidroxilasa. DOPA DC, DOPA descarboxilasa, también conocida como aminoácido aromático descarboxilasa (AADC). MAO-B, monoamina oxidasa de tipo B. SOD, superóxido dismutasa. La dopamina al oxidarse de modo no enzimático, lo que se incrementa en presencia de un exceso de hierro, produce ión superóxido y la semiquinona de la dopamina, que puede asociarse con grupos reactivos de las proteínas, como ocurre en el caso de la α -sinucleína.

nales de las proteínas, cuyas mutaciones son relevantes en el Parkinson familiar, veremos la importancia de la semiquinona de dopamina, que es un producto de oxidación no enzimático.

FACTORES GENÉTICOS

En personas con incidencia de Parkinson familiar, las probabilidades de sufrir la enfermedad se incrementan notablemente y este hecho ha llevado a la búsqueda de los genes implicados. Curiosamente no se ha encontrado relación alguna con polimorfismos o isoformas de los receptores de dopamina, o sus transportadores, que sí son relevantes en la drogadicción. La identificación de los genes que confieren susceptibilidad o son causa directa de la enfermedad de Parkinson constituyeron en su momento una auténtica sorpresa. Hoy en día a estos genes se les agrupa como genes PARK y se conocen desde el PARK1 al PARK10, numerados por orden de descubrimiento y codificando cada uno de ellos una proteína diferente.

El PARK1 es el gen que codifica la proteína denominada α -sinucleína, se encuentra localizado en el cromosoma 4, se transmite de modo

Parkinson familiar

- Se conocen 10 locus genéticos: zonas de los cromosomas en donde se producen mutaciones relacionadas con el Parkinson.
- Se nombran como genes PARK (PARK1- PARK10).
- Solamente de 4 de estos genes se conoce la proteína que codifican:
 - PARK-1- Locus cromosoma 4q21- α -sinucleína.
 - PARK-2- Locus cromosoma 6q25- Parkina.
 - PARK-5- Locus cromosoma 4p14- UCH-L1.
 - PARK-7- Locus cromosoma 1p35- Factor nuclear NURR.
- Mutaciones en estos genes son la causa de Parkinson familiar, que representa un porcentaje muy pequeño con respecto al total.
- Recientemente se ha descubierto en algunos pacientes parkinsonianos la presencia de varias copias del gen de la α -sinucleína.

autosómico dominante, con aparición temprana de los síntomas y desarrollo rápido de la enfermedad. Estudios *post-mortem* muestran la presencia de la proteína en los cuerpos de Lewy, preferentemente en su zona interna.

El PARK2 es el gen que codifica la proteína *parkina*, está localizado en el cromosoma 6, se transmite de modo autosómico recesivo, con aparición temprana de los síntomas y desarrollo lento de la enfermedad. En estudios *post-mortem* se ha comprobado que en los núcleos basales del cerebro no se desarrollan cuerpos de Lewy.

De los otros genes, citar el PARK5, que codifica la proteína UCH-L1, localizado en el cromosoma 4, se transmite de modo autosómico dominante, con comienzo temprano y progresión rápida, también se desarrollan cuerpos de Lewy.

El grupo de genes cuyas mutaciones inducen Parkinson familiar también comprende el NR4A2, cuya proteína pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, la NURR. Este gen es el que recientemente se ha identificado con el gen del locus PARK-7, conocido también como DJ-1. Este receptor nuclear es esencial para la adquisición y mantenimiento del carácter dopaminérgico de la neurona. En su ausencia o con un funcionamiento anómalo, las neuronas dopaminérgicas son muy escasas en número. Además este factor es capaz de modular la expresión del enzima inicial de la vía de síntesis, que es la tirosina hidroxilasa, modificando también las respuestas del sistema noradrenérgico. Ésta es una de las razones por las que se plantea si en algunas ocasiones la enfermedad de Parkinson es de hecho una enfermedad del desarrollo y diferenciación neural, las mutaciones encontradas en el gen NR4A2 del cromosoma 2q22-23 se corresponden con la zona no-codificante (Bonifati et al., 2003; Butcher, 2003).

En el apartado anterior hemos definido una serie de genes cuya anomalía produce Parkinson familiar, y otros que pueden conferir una cierta predisposición. Existen actualmente modelos genéticos en roedores y en la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, entre otros, en los que se bloquea alguno de los genes anteriormente citados, reproduciendo

do los síntomas observados en humanos (Dawson, 2000; Masliah y Hashimoto, 2002). Estos modelos se han convertido en un utensilio valiosísimo para conocer en profundidad los mecanismos que llevan a la muerte neuronal selectiva de las neuronas dopaminérgicas. Pero es necesario señalar que estos tipos de Parkinson con componente familiar son muy escasos.

Otros genes que confieren susceptibilidad están relacionados con enzimas del metabolismo y destoxicación de fármacos, pesticidas y en general xenobióticos, así como factores que afectan el nivel redox de la célula y el funcionamiento mitocondrial. Entre ellos destacan los relacionados con el enzima Glutation transferasa (GST) de las que existen por lo menos siete familias, el enzima es capaz de bloquear grupos sulfidrilos susceptibles de ser oxidados y es una protección contra problemas oxidativos. Entre los miembros de la familia destaca la GST tipo T1 (GSTT1), que presenta polimorfismos y una de sus variantes confiere mayor susceptibilidad a Parkinson tardío. Es importante señalar que el glutacion GSH, sustrato de esta enzima es esencial para mantener el nivel redox de la célula y alteraciones de sus niveles pueden sensibilizar a las neuronas en estados de estrés, sobre todo oxidativos. Otro gen implicado es el del citocromo CYP2D6, cuya isoforma tipo 4 confiere susceptibilidad a Parkinson tardío, sobre todo en personas dedicadas a faenas agrícolas. Finalmente el enzima de destoxicación, conocido como N-acetilasa, que acetila grupos $-NH_2$ formando enlaces amida, puede conferir susceptibilidad a Parkinson cuando está presente la isoforma de acetilación lenta, la NAT2 (Migliore y Copedé, 2002; Di Monte, et al., 2002).

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE LAS PROTEÍNAS RELEVANTES EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. RELACIÓN CON LA VÍA DE UBIQUITINACIÓN Y PROTEOSOMA

El descubrimiento de los genes causantes de la forma precoz de la enfermedad de Parkinson hizo replantearse el escenario celular que lleva finalmente a la muerte de la neurona dopaminérgica, pues los

genes implicados no son exclusivos de estas neuronas. Los modelos animales, suprimiendo o sobre-expresando estas proteínas han proporcionado indicaciones muy valiosas para conocer sus funciones. Es de destacar que todas las proteínas encontradas en los cuerpos de Lewy en los enfermos de Parkinson, están relacionadas entre sí a través de la vía degradativa de proteínas ligada a ubiquitina y conocida como UPP (ubiquitin-proteasomal pathway), que dirige las proteínas alteradas al proteasoma (Giasson y Lee, 2003).

Estudios de hibridación *in situ* demuestran que las tres proteínas más prominentes en el Parkinson familiar, la α -sinucleína, la parkina y el

Vía degradativa de la ubiquitina por el proteasoma

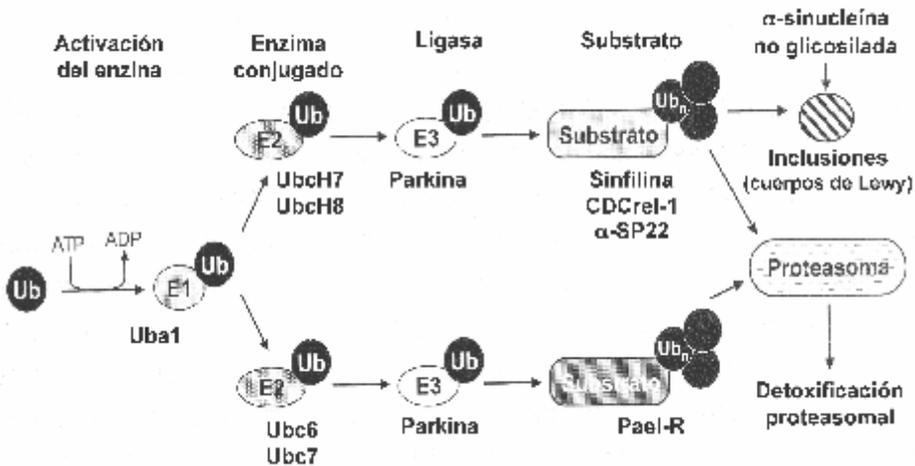


Figura 16.—Proteínas relevantes en la enfermedad de Parkinson, relación con la degradación vía proteosoma.

La mayor parte de las proteínas relacionadas con el parkinson familiar, descubiertas hasta el momento, están relacionadas con las vías de degradación conocida como vía de la ubiquitina proteasoma. La ubiquitina es activada por sucesivos enzimas que la transfieren a las proteínas que tienen que ser degradadas por estar alterada su estructura, o glicosiladas de modo no enzimático, que es una señal de envejecimiento. Las proteínas ubiquitiniladas son reconocidas por el proteasoma. La parkina es de hecho un enzima capaz de transferir la ubiquitina activada sobre los sustratos susceptibles de degradación. En una situación normal la α -sinucleína cuando está glicosilada (α -SP22) es sustrato de la parkina y se degrada en el proteasoma. Otra situación ocurre cuando la α -sinucleína está mutada, o se le ha unido de modo covalente la semiquinona de la dopamina o de la L-DOPA, en este caso no son funcionales y forman agregados no degradables que se acumulan y son el componente mayoritario de los cuerpos de Lewy.

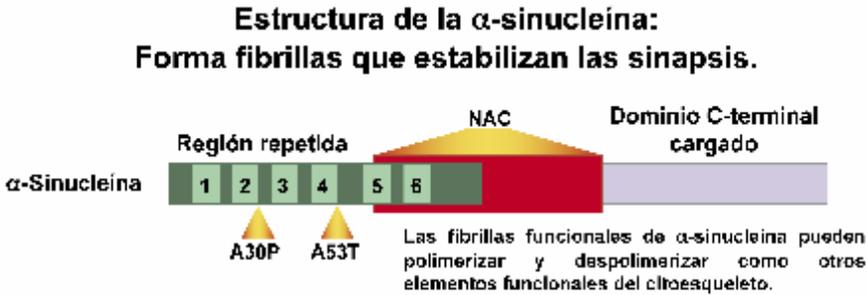
enzima, que es responsable de la eliminación de ubiquitina de las proteínas una vez que llegan al proteasoma, la UchL1, tienen unos patrones de expresión similares y se expresan abundantemente en las neuronas dopaminérgicas (Chung et al., 2001).

La α -sinucleína (proteína procedente del gen PARK1) es una proteína fosforilada que se encuentra en las neuronas, siendo más abundante en la zona presináptica. Consta de una zona aminoterminal con repetición de hasta seis veces de un motivo estructural, que es donde se localizan las variantes familiares de la enfermedad. La zona carboxilo terminal está cargada negativamente y puede existir como forma glicosilada, a la forma glicosilada de la α -sinucleína se le denomina α -Sp22. Esta proteína puede formar fibrillas, o protofibrillas y su sobreexpresión en *Drosophila* produce pérdida de neuronas dopaminérgicas en las moscas de cierta edad, que pierden paralelamente su capacidad de volar (Masliah & Hashimoto, 2002). La α -sinucleína en su forma glicosilada es un buen sustrato para la proteína parkina, que la acopla a la ubiquitina para ser degradada. De modo general las formas glicosiladas de proteínas citosólicas suelen serlo de modo no enzimático y son indicativas de vejez en la estructura proteica. Por el contrario la forma no glicosilada de la α -sinucleína es funcional, y puede formar fibrillas en zonas sinápticas y de las neuritas. En los enfermos de Parkinson la α -sinucleína aparece en los cuerpos de Lewy, preferentemente sin glicosilar. *La cuestión es: ¿qué tienen las neuronas dopaminérgicas para que en este tipo de neuronas la α -sinucleína se acumule en los cuerpos de Lewy y las alteraciones de su gen induzcan Parkinson?* El nexo de unión no parece evidente, pero trabajos recientes indican que la propia dopamina oxidada de modo no enzimático a semiquinona, se une y estabiliza las protofibrillas de la α -sinucleína, impidiendo que se formen las fibrillas y su función (Conway et al., 2001; Muchowski, 2002). Las protofibrillas son las que inician las inclusiones formando los cuerpos de Lewy, al que posteriormente se van añadiendo otros componentes del sistema de degradación.

La parkina, producto del gen PARK2, es una proteína que pertenece a la familia de enzimas capaces de unir la ubiquitina a los sustratos que van a ser degradados en el proteasoma. *La parkina también recibe el nombre de Ubiquitina E3 protein ligasa.* Es por tanto previsible que alte-

raciones de este gen produzcan un acúmulo de proteínas que son sus sustratos, entre los que se encuentran la forma glicosilada de la α -sinucleína, que es la α -Sp22, y también la sinfilina y el CDCrel-1, entre otras (Chung et al., 2001). La parkina también está implicada en la ubiquitinación de proteínas que se forman en el retículo de modo anómalo, tratando de paliar lo que se conoce como estrés de retículo, que puede ser inducido por factores diversos, virus, proteínas alteradas, escasez energética, o excesiva entrada de calcio ligada al descontrol del funcionamiento neural.

El UchL1, es el producto del gen PARK5, es un proteína con función enzimática, capaz de hidrolizar el o los restos de ubiquitina que



¿Si la α -sinucleína se expresa ampliamente en todo el cerebro por qué sólo forma agregados en las neuronas dopaminérgicas?

Las fibrillas de α -sinucleína pueden interaccionar con productos espontáneos de oxidación de dopamina y L-DOPA, formando protofibrillas tóxicas difícilmente degradables. En consecuencia la α -sinucleína sólo forma agregados del tipo de cuerpos de Lewy en las neuronas que contienen dopamina y L-DOPA.

Figura 17.—Estructura y función de la α -sinucleína.

La α -sinucleína forma fibrillas que polimerizan y despolimerizan, como otros tipos de proteínas del citoesqueleto. Para ello tiene una serie de secuencias repetidas por donde realiza la interacción, además tiene otras zonas funcionales que le permiten interaccionar con la membrana sináptica y estructuras vesiculares. Entre las mutaciones conocidas destacan las de una alanina por prolina, que rompe la estructura en hélice de las zonas de interacción y la mutación de una alanina por treonina que altera la interacción de las fibrillas entre sí.

están unidos a las proteínas, una vez que éstas se han asociado al proteasoma para su degradación. Alteraciones en este gen con pérdida de la función hidrolítica explican el acúmulo de ubiquitina en los cuerpos de Lewy.

LA PELIGROSIDAD DE LA NEURONA DOPAMINÉRGICA, EL PROBLEMA ADICIONAL DE LA L-DOPA

Las tres proteínas más prominentes en el Parkinson familiar, la α -sinucleína, la parkina y la UchL1, tienen unos patrones de expresión similares y se expresan abundantemente en muchas neuronas donde sus fallos son casi silenciosos, sin excesivas consecuencias. *¿Cuál es la razón para que en las neuronas dopaminérgicas las anomalías en estas proteínas cursen con la muerte neuronal?* La razón estriba en la propia presencia del neurotransmisor dopamina y de su precursor L-DOPA, ambas sustancias son catecoles, fácilmente oxidables y capaces de formar, por oxidación, agregados y productos similares a las melaninas. La neurona dopaminérgica dispone de sistemas para evitar su oxidación y almacena la dopamina en vesículas acídicas, pero la eficacia de los sistemas biológicos no es del 100%. Esta eficacia se ve comprometida en presencia de un exceso de hierro, o cuando se generan más radicales libres de lo normal, y también cuando existen mutaciones en proteínas dedicadas al mantenimiento celular y sináptico, produciéndose las alteraciones a mayor velocidad de lo que ocurre en un envejecimiento normal.

Al contrario que otros neurotransmisores, en la neurona dopaminérgica el neurotransmisor dopamina es una sustancia fácilmente oxidable de modo no enzimático, produciendo estructuras de naturaleza semiquinónica. Esta reacción es mucho más frecuente en presencia de un exceso de hierro celular. Es el producto oxidado de la dopamina (y también de la L-DOPA), lo que se une a las primeras protofibrillas de la sinucleína, que inician así su lento acúmulo para formar los cuerpos de Lewy. Estas protofibrillas no pueden asociarse para formar las fibrillas funcionales, acumulándose y siendo difícilmente degradables, al no ser reconocidas como sustrato. *Este hecho nos indica lo importante que es una recaptación eficaz por parte de los sistemas de transporte vesiculares para*

evitar a toda costa que la dopamina esté libre en el citosol, y por otra parte, el hecho de que una dosis excesiva de L-DOPA, o incluso ajustada, puede a la larga ser perjudicial.

Para evitar los efectos oxidativos se ha propuesto una alimentación rica en antioxidantes tipo Vitamina E y C, los cuales *in vitro* evitan la oxidación de la dopamina y la estabilización de las protofibrillas, aunque *in vivo*, una vez formados hay poco que hacer. Además la Monoamina-oxidasa MAO puede transformar en aldehído el grupo amino de la dopamina, originando un compuesto que puede reaccionar con los grupos amino y alcohol de múltiples proteínas celulares.

TERAPIAS ANTIPARKINSONIANAS

La gran revolución se inició con la introducción en terapéutica de la L-DOPA por Carlson, Premio Nobel del año 2000, justamente por racionalizar la farmacología antiparkinsoniana (Carlsson, 2001). Esta

Tratamientos actuales del Parkinson

- 1) **Terapia de sustitución con L-DOPA y combinaciones.**
- 2) **Empleo de inhibidores de la aminoácido-aromático descarboxilasa periférica (AADC) y de los enzimas degradativos mono-amino oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT), en combinación con L-DOPA.**
- 3) **Empleo de agonistas de receptores de dopamina.**
- 4) **Antagonistas de receptores de adenosina A_{2A}.**
- 5) **Transplantes celulares.**
- 6) **Factores de crecimiento específicos.**
- 7) **Cirugía.**
- 8) **Estimulación profunda del cerebro.**

sustancia es un precursor de la dopamina que se genera *in situ* por descarboxilación, realizada por la L-aminoácido-aromático descarboxilasa L-AADC. Existen varias isoformas del enzima y es relativamente abundante fuera del sistema nervioso, por lo que para que la L-DOPA pueda alcanzar el sistema nervioso central en cantidad suficiente, se suele administrar con un inhibidor del enzima periférico, que no atraviese la barrera hemato-encefálica.

Actualmente se ha comprobado la importancia del metabolismo de la dopamina asociado con la catecol-metil-transferasa (COMT) y exis-

Sustancias terapéuticas en combinación con L-DOPA

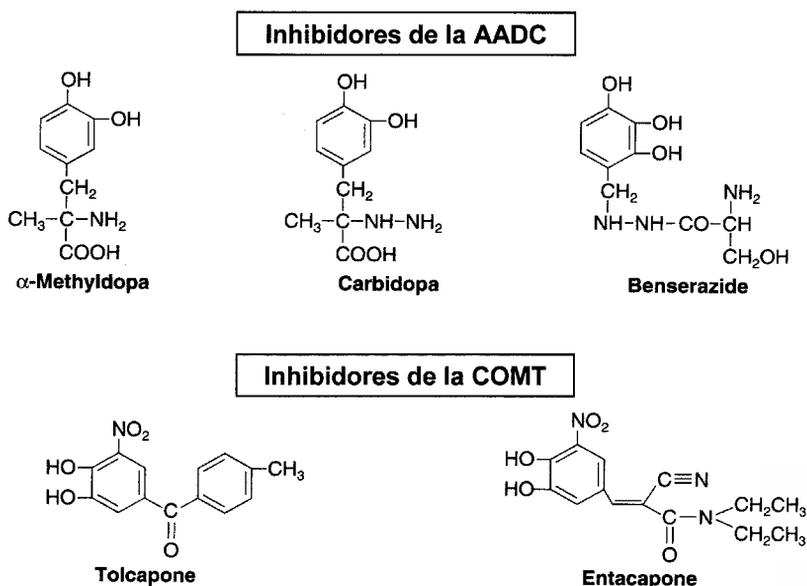


Figura 18.—Fármacos empleados en el tratamiento de Parkinson en combinación con L-DOPA para evitar su degradación periférica.

La L-DOPA, precursor de la dopamina, es la sustancia empleada mayoritariamente en el tratamiento del Parkinson. Para evitar que sea descarboxilada periféricamente y llegue en suficiente cantidad al sistema nervioso, se suele utilizar en combinación con inhibidores periféricos del enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AADC).

Otro enzima importante en la degradación, tanto periférica como a nivel central, es la Catecol-O-metil-transferasa, que transfiere el metilo desde la S-adenosil—metionina a uno de los grupos oxidrilo del catecol, formando el 3-O-metil-derivado de la L-DOPA, o de la dopamina—. Los inhibidores de este enzima se suelen administrar para bloquear la acción periférica, sobre todo a nivel hepático, y no atraviesan la barrera hemato-encefálica.

ten inhibidores para este enzima, los cuales también se han administrado conjuntamente con la L-DOPA. La idea es siempre la de reducir al máximo la dosis de L-DOPA para evitar sus efectos secundarios.

Con la misma finalidad de reducir o evitar la L-DOPA, actualmente se ha propuesto la utilización de los agonistas de tipo D1, los cuales ejercen acciones beneficiosas, pero también los antagonistas de receptores de adenosina de tipo A_{2A}. Curiosamente la enfermedad de Parkinson retrasa su aparición en los grandes consumidores de café, porque la cafeína actúa como un inhibidor generalizado de todos los receptores de adenosina, aunque se busca desesperadamente algún antagonista A_{2A}, sin efectos secundarios para emplear en esta terapia (Lindskog, 2002).

Sustancias terapéuticas en combinación con L-DOPA

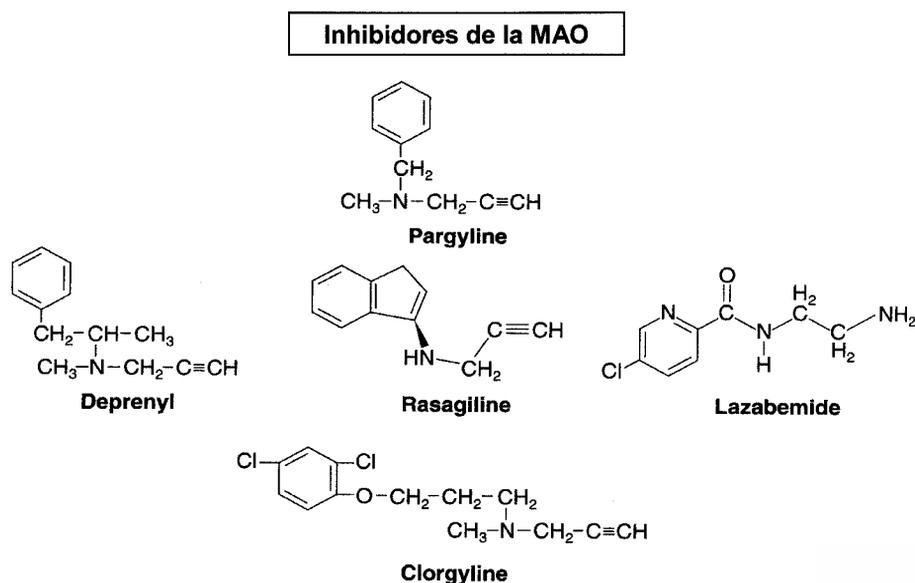


Figura 19.—Fármacos empleados en el tratamiento de Parkinson en combinación con L-DOPA. Inhibidores de MAO.

La gran toxicidad de la L-DOPA sobre las neuronas dopaminérgicas, todavía existentes en los enfermos de Parkinson, hace que la administración de L-DOPA deba de ser perfectamente controlada. Por ello se administra conjuntamente con un inhibidor del catabolismo de catecolaminas a través de la MAO, para optimizar la dopamina formada en las propias neuronas. Antes se buscaban los inhibidores más específicos de MAO-B, que es el enzima más abundante en estriado, pero actualmente se combina la L-DOPA con inhibidores menos específicos.

La expresión conjunta de receptores de adenosina $A2_A$ y de dopamina D2 en las neuronas de estriado, ha planteado la cuestión de si estos receptores pueden formar heterodímeros, siendo así susceptibles de una farmacología conjunta. De hecho estos heterodímeros $A2_A$ -D2 se localizan de modo preferente en las espinas dendríticas de las neuronas GABAérgicas estriado-palidales (Ferré et al., 2003). Estas espinas es donde se localizan las densidades post-sinápticas de las terminales glutamatérgicas. El desarrollo de ligandos bivalentes, que actúan de agonistas de los receptores D2 y como antagonistas de los $A2_A$, es uno

Agonistas de receptores dopaminérgicos

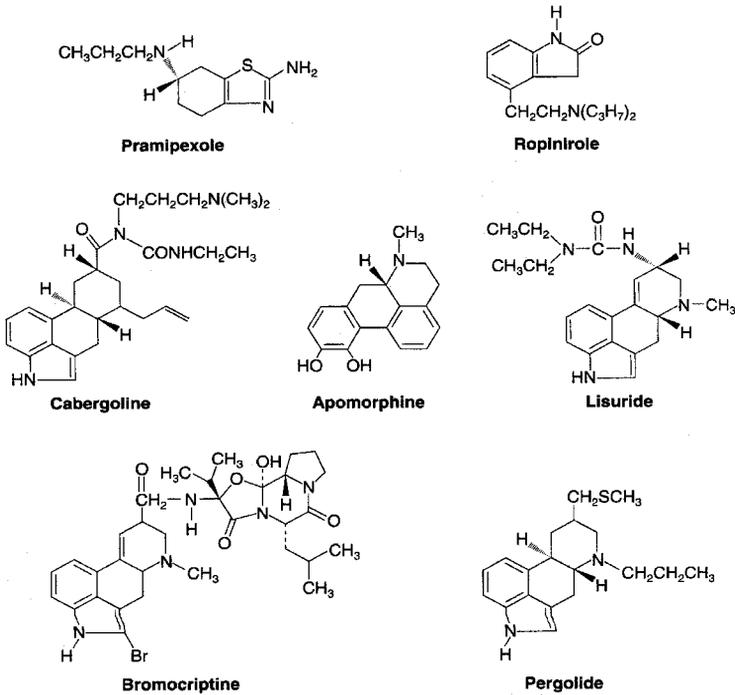


Figura 20.—Agonistas de receptores dopaminérgicos empleados en el tratamiento del Parkinson.

Cuando las neuronas dopaminérgicas están prácticamente destruidas en el Parkinson tardío, los agonistas de los receptores de dopamina podrían suponer muchas ventajas, pues actuarían directamente sobre los receptores del estriado sin necesidad de procesamiento previo, como ocurre con la L-DOPA. En el tratamiento se emplean de preferencia compuestos que tengan una actividad más selectiva sobre receptores de tipo D2, que son más abundantes en el estriado y poca o ninguna sobre receptores de tipo D1, que están fundamentalmente asociados con la conducta social.

de los objetivos actuales de la nueva farmacología anti-Parkinsoniana (George et al., 2002).

TRASPLANTES CELULARES Y FACTORES DE CRECIMIENTO COMO NUEVAS TERAPIAS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La terapia de reemplazamiento celular ha sido realizada con células de naturaleza aminérgica, de muy distinta procedencia, y es uno de los aspectos que más expectativas ha suscitado en la enfermedad de Parkinson (Björklund et al., 2003). El empleo de células fetales ha tropezado, no solamente con las consideraciones éticas, sino también con la escasez y limitaciones de su disponibilidad. Recientemente se ha procedido a cultivar células embrionarias y tratar de multiplicarlas *in vitro* mediante el empleo de factores de crecimiento específicos, lo que en estos momentos es una posibilidad prometedora, pero todavía muy prematura en cuanto a su utilidad. En España el grupo del doctor López Barneo (Espejo et al., 1998) ha desarrollado una original y prometedora vía utilizando para el trasplante las células dopaminérgicas del cuerpo carotídeo del mismo paciente. Estas neuronas no tienen ningún problema de compatibilidad, pues proceden del mismo individuo y tampoco tienen problemas derivados del empleo de tejidos fetales y su componente ético.

Los controvertidos resultados y los múltiples inconvenientes derivados de los trasplantes celulares han fomentado la búsqueda de otras alternativas terapéuticas. Entre las últimas, la utilización de factores de crecimiento, como el Factor Neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF). Este factor, administrado directamente en el putamen de pacientes con enfermedad de Parkinson, ha demostrado ser eficaz y seguro. El factor de crecimiento GDNF es importante para el mantenimiento y desarrollo de las neuronas dopaminérgicas. El principal obstáculo para su administración es su gran tamaño molecular, lo que le impide atravesar la barrera hemato encefálica. La administración ha de hacerse localmente y solamente cuando se inyecta directamente en el putamen mediante un dispositivo de bomba por espacio de tiempo prolongado se

observan acciones beneficiosas en la coordinación motora, superiores a las observadas en todo tipo de trasplantes (Butcher, 2003).

EPÍLOGO

En la enfermedad de Parkinson se conocen mejor los elementos que entran en juego y cuál es su función, que en el caso de la enfermedad de Alzheimer, pero no podemos olvidar que la gran mayoría de los enfermos carecen de componente familiar y que en estos casos es donde la predisposición genética a padecer la enfermedad puede ser evitada con unas precauciones medioambientales y de hábitos alimenticios. Es también importante considerar que las neuronas dopaminérgicas crean dentro de sus propias terminales un ambiente proclive a la oxidación y generación de especies reactivas de oxígeno y por lo tanto a causar daños que serán tanto más notorios cuanto mayor sea su acúmulo, lo que lógicamente es más probable con la edad. En base a los conocimientos actuales, se podría plantear una pregunta, *¿Es la neurona dopaminérgica, como elemento acumulador de episodios oxidativos, un reloj programado de los límites de nuestro tiempo de supervivencia cerebral?*

BIBLIOGRAFÍA

- Baumgarten, H.G. and Zimmermann, B., «Cellular and subcellular targets of neurotoxins: the concept of selective vulnerability», 1992, 1-27. Editors: Herken, H. and Hucho, F., «Selective Neurotoxicity. Handbook of experimental pharmacology». Springer-Verlag.
- Björklund, A. et al., «Neural transplantations for the treatment of Parkinson disease». *The Lancet Neurology*. 2003, 2, 437-445.
- Bonifati, V., et al., «DJ-1 (PARK-7), a novel gene for autosomal recessive, early on Parkinsonism». *Neurol. Sci.*, 2003, 24, 159-160.
- Butcher, J., «GDNF trial: promising results for Parkinson's disease». *Lancet Neurol*. 2003, 2, 265.
- Carlsson, A., «A paradigm shift in brain research». *Science*. 2001, 294, 1021-1024.

- Chung, K.K.K.; Dawson, V.L. and Dawson, T.M., «The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders». *TINS*, **2001**, *24*, 7-14.
- Conway, K.A.; Rochet, J.-C.; Bieganski, R.M. and Lansbury, P.T., «Kinetic stabilization of the α -synuclein adduct». *Science*, **2001**, *294*, 1346-1349.
- Cowen, T., «Selective vulnerability in adult and ageing mammalian neurons». *Autonomic Neuroscience: Basic and clinical*, **2000**, *96*, 20-24.
- Dawson, T.M., «New animal models for Parkinson disease». *Cell*, **2000**, *101*, 115-118.
- Di Monte D.A.; Lavasani, M. and Manning-Bog, «Environmental factors in Parkinson's disease». *Neurotoxicology*, **2002**, *23*, 487-502.
- Espejo, E.F.; Montoro, R.J.; Armengol, J.A. and López-Barneo, J., «Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates». *Neuron*, **1998**, *20*, 197-206.
- Ferré, S., et al., «Glutamate mGlu-5-Adenosine A_{2A}-Dopamine D₂ receptor interactions in the striatum. Implications for drug therapy in the neuro-psychiatric disorders and drug abuse». *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 1-26.
- Floyd, R.A. and Hensley, K., «Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases». *Neurobiology of aging*, **2002**, *23*, 795-807.
- George, S.R.; O'Dowd, B.F. and Lee, S.P., «G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery». *Nature Reviews Drug Discovery*, **2002**, *1*, 808-820.
- Giasson, B.I., and Lee, V., «Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease?», *Cell*, **2003**, *114*, 1-8.
- Greengard, P., «The neurobiology of slow synaptic transmission». *Science*, **2001**, *294*, 1024-1030.
- Kopin, I.J., «Mechanisms of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine. Induced destruction of dopaminergic neurons», **1992**, pp.333-356, in *Selective Neurotoxicity. Handbook of experimental pharmacology*. Editors Herken H. and Hucho F. Editorial, Springer-Verlag.

Enfermedad de Parkinson

- Lindskog, M. et al., «Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine». *Nature*. **2002**, *418*, 774-778.
- Masliah, E. and Hashimoto, M., «Development of new treatment for Parkinson's disease in transgenic animal models: A role for β -Synuclein». *Neurotoxicology*, **2002**, *23*, 461-468.
- Mayeux, R., «Epidemiology of Neurodegeneration». *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, *26*, 81-104.
- Migliore, L. and Coppedè, F., «Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases». *Mutation Research*, **2002**, 1-19.
- Muchowski, P.J., «Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: A critical role for molecular chaperones?», *Neuron*, **2002**, *35*, 9-12.
- Obeso, J.A.; Rodríguez-Oroz, M.C., and Zamarbide, I., «Enfermedad de Parkinson. Perspectivas». Capítulo 6. *Enfermedades neurodegenerativas*. Editado por Farmaindustria, Editores Segovia de Arana, J.M y Mora Teruel, F., 2002, pp.71-83.
- Ungerstedt, U., «Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain». *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **1971**, *367*, 1-48.

CAPÍTULO 4

Esclerosis lateral amiotrófica

INTRODUCCIÓN

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una enfermedad letal que se caracteriza por la muerte preferente de las motoneuronas espinales y en las últimas etapas la muerte de las neuronas piramidales del cortex motor. El soma de las motoneuronas se encuentra localizado en las astas ventrales de la médula espinal, desde donde salen los axones para inervar los músculos. Comparado con el elevado número de neuronas que controlan los movimientos en los núcleos cerebrales, el aproximadamente 1 millón de motoneuronas que controlan todos nuestros músculos no parece demasiado elevado. Estas neuronas, de naturaleza colinérgica, son muy activas y por lo tanto muy sensibles a las situaciones de estrés. El volumen del soma neural de la motoneurona comparado con el contenido en sus axones es, como mínimo, mil veces menor. Es por lo tanto comprensible el gran esfuerzo que tiene que realizar la motoneurona para mantener las estructuras distales, que son las conexiones de la unión neuromuscular en perfecto estado. Las motoneuronas espinales, debido a su naturaleza colinérgica, son sensibles a todas las toxinas que afectan a este tipo de neuronas de modo específico, algunas entran a través del transportador de colina de alta afinidad de la membrana plasmática, otras inhiben el transportador de acetilcolina vesicular, impidiendo el almacenamiento del neurotransmisor, y finalmente

algunas inhiben el enzima de síntesis (Hörtnagl y Hanin, 1992). En estos casos son todas las neuronas colinérgicas las afectadas, y no de modo preferente las motoneuronas.

**Esclerosis lateral amiotrófica (ALS):
enfermedad de las neuronas motoras**

- **Es un trastorno de las neuronas motoras, sobre todo motoneuronas espinales y finalmente neuronas piramidales del cortex motor.**
- **Tenemos cerca de 1 millón de motoneuronas para controlar todos los músculos del cuerpo.**
- **Comienza entre los 45-60 años y afecta más a los varones en proporción 5/1.**
- **Solamente el 10% es de origen familiar con herencia autosómica dominante (FALS).**
- **La mutación familiar más abundante corresponde al enzima Superóxido Dismutasa (SOD).**

ASPECTOS FUNCIONALES DE LA NEURONA MOTORA

El soma de las motoneuronas espinales y sus dendritas contienen una alta densidad de zonas postsinápticas. Las terminales glutamatérgicas son muy abundantes y los receptores ionotrópicos de este neurotransmisor pueden ser de tipo NMDA, AMPA y Kainato. La llegada masiva de glutamato puede inducir la entrada de calcio a gran escala y si la situación energética está comprometida, los gradientes de membrana son difíciles de recuperar, pudiendo en casos extremos llegar a la apoptosis neural (Dingledine y McBain, 1999). Aunque esta situación es posible, no suele ocurrir de modo agudo y generalmente las motoneuronas van acumulando pequeños fallos que a la larga pueden ser fatales. Un dato que fortalece esta hipótesis es la alta incidencia de esclerosis lateral amiotrófica (ALS), en los nativos de la Isla de Guam en el Pacífico, los cuales consumen grandes cantidades de semillas de *Cycas circinalis*. La presencia de un análogo estructural del glutamato, el β -N-metilamino-L-alanina, en estas semillas, produce una estimulación con-

tinua y sostenida de los receptores de tipo AMPA y NMDA. La gran abundancia de estos receptores en el soma de las motoneuronas espinales explica su degeneración, que se produce de modo anterógrado, es decir, del cuerpo neural hacia el axón y sus conexiones sinápticas. Una situación análoga ocurre con los consumidores de harina de almorta, pues el *latirus sativus* contiene otros agonistas de estos receptores ionotrópicos de glutamato que median acciones muy similares (Herken y Hucho, 1992).

Es probable que la ALS sea un conjunto de enfermedades que cursan finalmente con la muerte de las motoneuronas y que responden a diversas causas.

Control del movimiento y neurotransmisores implicados

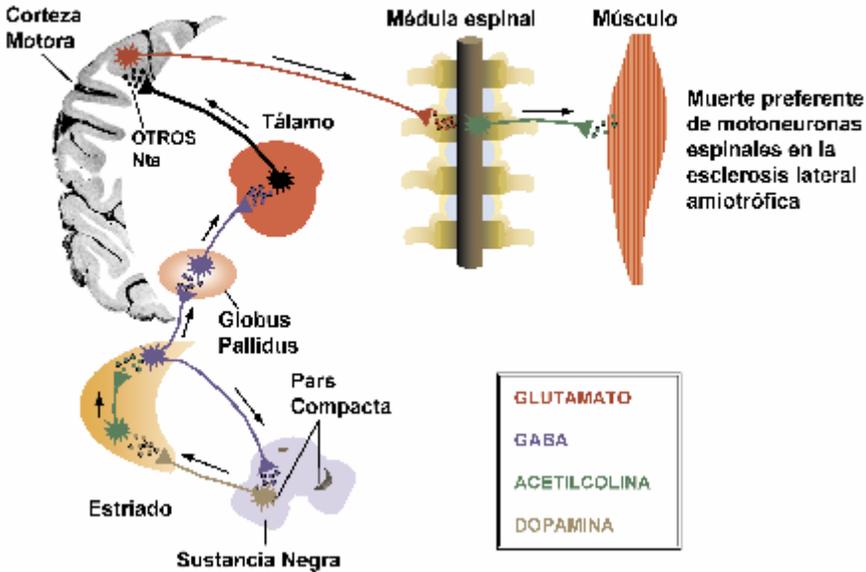


Figura 21.—Neurotransmisores implicados en el control y ejecución del movimiento. Para todas las disfunciones motoras, sean del tipo que sean, es siempre necesario conocer la vía de control y ejecución de los movimientos, pues dependiendo del tipo de anomalía, las vías se verán interrumpidas a diferente nivel. En la esclerosis lateral amiotrófica las vías de ejecución del movimiento se interrumpen a nivel de la neurona motora localizada en la médula espinal. La motoneurona es de naturaleza colinérgica y está densamente inervada por las neuronas glutamatérgicas.

IMPORTANCIA DE LAS SUPERÓXIDO DISMUTASAS

Las superóxido dismutasas SOD son una clase de oxidoreductasas, capaces de catalizar la dismutación del ión superóxido que se produce cuando el oxígeno molecular recibe la transferencia de un único electrón. Este radical se produce como consecuencia del estrés en el citosol o en la mitocondria. Los mamíferos contienen tres SOD que catalizan la misma reacción:

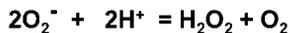


Pero cuyo centro catalítico puede contener diferentes metales: la SOD1 y la SOD3 contienen Cu/Zn y la SOD2 contiene Mn.

Esclerosis lateral amiotrófica de carácter familiar ¿Qué falla en la motoneurona colinérgica?

Las mutaciones carentes de actividad del enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) están presentes en el 98% de los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica de origen familiar.

La reacción catalizada por la superóxido dismutasa es:

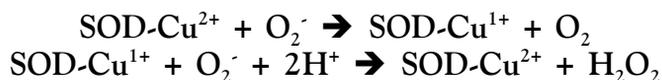


Cuestiones por responder:

- 1) Si el enzima es muy abundante en todos los tejidos ¿por qué son las motoneuronas las más dañadas?**
- 2) ¿Como produce este déficit enzimático la muerte preferente de la motoneuronas?**

La SOD1 se encuentra en el citoplasma, núcleo y espacio intermembranar de la mitocondria. Se encuentra localizada en el cromosoma 21, los mutantes que carecen de este enzima no son letales, pero la sobreexpresión del enzima puede llevar a un incremento en las actividades residuales del enzima, como es el caso de la formación de peróxinitrito y

nitración de tirosinas, lo que explicaría el envejecimiento prematuro y daño mitocondrial en el síndrome de Down. La SOD1 es un dímero, cada uno de los monómeros tiene 151 aminoácidos y su estructura contiene ocho segmentos en hoja plegada con estructura en barril y una cavidad con residuos cargados que canalizan el ión superóxido hacia el centro catalítico. En este enzima la secuencia de reacciones es la siguiente:



En esta reacción el ión cobre está coordinado en el centro activo con cuatro histidinas y una de ellas, la histidina 61, forma un puente con el ión Zn que está anclado en el centro activo mediante otras dos histidinas y un ácido aspártico. El Cu es el único ión que sufre un proceso de oxidación y reducción durante el ciclo catalítico.

La SOD2 contiene Mn en el centro activo, el manganeso del centro activo sufre el mismo ciclo catalítico que el cobre de la SOD1. El enzima se encuentra localizada exclusivamente en la matriz mitocondrial, mapea en el cromosoma 6 y el knock-out de este gen es letal, lo que indica la relevancia que tiene la actividad de este enzima para el funcionamiento mitocondrial. Los animales modificados genéticamente mueren durante el periodo neonatal y se observa neurodegeneración y alteraciones cardíacas.

La SOD3 es un enzima extracelular que se adhiere fuertemente a las proteínas componentes de la matriz extracelular, está glicosilada y es tetramérica. Sus niveles se incrementan en estados inflamatorios, siendo un enzima inducible. La importancia del ión superóxido como sustancia pro-inflatoria ha puesto de manifiesto que la SOD3 puede ser una diana farmacológica excelente para ejercer el control de estas situaciones (Muscoli et al., 2003).

ASPECTOS GENÉTICOS DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Hasta el momento solamente en un pequeño porcentaje de enfermos con ALS se ha detectado un componente genético, que consiste en su gran mayoría en alteraciones en el enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993). El gen que codifica este enzima está en el cromosoma 21, la mutación genera una proteína con poca actividad dismutasa, pero con otras actividades residuales exacerbadas.

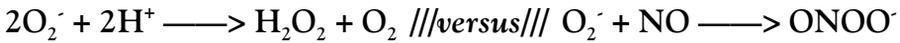
La alteración del gen de la SOD1 produce la ALS transmitida de modo autosómico dominante. El enzima contiene Zn y Cu en su centro activo. En carencias graves de Zn se produce una pérdida de motoneuronas, lo que confirmaría la necesidad de un enzima funcional.

La superóxido dismutasa actúa como enzima dimérico, destruyendo de modo eficiente el ión superóxido, que es uno de los más peligrosos de las especies reactivas de oxígeno en el estrés celular.

La importancia del ión superóxido en el envejecimiento en general se demostró en el modelo del gusano nemátodo, *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*), que es hermafrodita. Este modelo fue desarrollado por el doctor Sidney Brenner, Premio Nobel de medicina del año 2002. En este modelo las poblaciones de gusanos genéticamente idénticos y sometidos a los mismos estímulos y nutrientes, tienen una amplia dispersión de su tiempo de vida, con la clásica distribución en campana de la curva de Gauss. Si los gusanos son manipulados genéticamente para sobreexpresar el enzima superóxido dismutasa que elimina el ión superóxido, O_2^- , uno de los más poderosos radicales libres, la vida media de los gusanos aumenta casi al doble, aunque persista el mismo tipo de distribución (Floyd y Hensley, 2002; Hershorn et al., 2002).

El principal inconveniente para aceptar que la causa de la ALS sea el fallo en la actividad del enzima SOD1, es que ratones en los que se elimina el gen no sufren la enfermedad. Se piensa que el enzima pueda tener otras funciones y que esta proteína, que es una de las más abundantes en las neuronas, pueda formar agregados o asociar-

se con estructuras del citoesqueleto, provocando la disrupción de los neurofilamentos (Beckman et al., 2001). No obstante la aparición de síntomas similares a los de la esclerosis lateral amiotrófica en las carencias de Zn, hacían sospechar que de algún modo las mutaciones en el enzima podrían tener cierta analogía. En efecto, las mutaciones enzimáticas de la SOD1 repercuten en su capacidad de unir el Zn o de que este ión pueda ejercer su actividad catalítica. En esta situación lo mismo que en ausencia de Zn, el cobre del centro activo es incapaz de procesar el ión superóxido y formar agua oxigenada y canaliza el superóxido a su unión con el óxido nítrico, formando peroxinitrito.



Interacciones propuestas para la SOD y los neurofilamentos

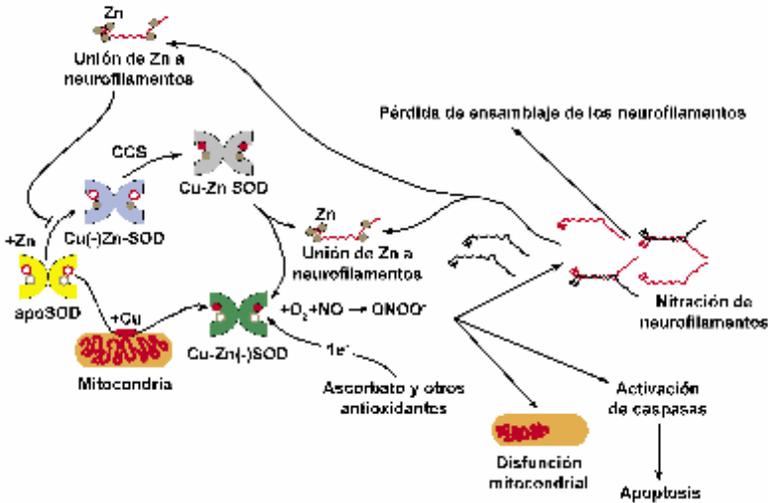


Figura 22.—Esclerosis lateral amiotrófica y mutaciones en la superóxido dismutasa. La mutación más frecuente en la esclerosis lateral amiotrófica de carácter familiar es la carencia de actividad del enzima superóxido dismutasa, que es un enzima dimérico que contiene cobre y zinc en su centro activo. Normalmente el enzima mutado carece de la capacidad de anclar el Zn²⁺ en el centro catalítico. El enzima en estas condiciones, conteniendo solamente cobre en el centro catalítico, en vez de destruir el ión superóxido, lo hace reaccionar con el óxido nítrico formándose grandes cantidades de peroxinitrito que pueden nitrósilar residuos tirosina en múltiples proteínas, incluidas las mitocondriales y las formadoras de neurofilamentos llegando finalmente a la muerte neuronal.

El peroxinitrito es capaz de nitrosilar los residuos de tirosina de múltiples proteínas, entre ellas las de los complejos mitocondriales esenciales en el transporte de electrones, y también en proteínas del citoesqueleto, sobre todo los neurofilamentos monomeros, que de este modo no pueden polimerizar para dar consistencia a los largos axones de la neurona motora (Beckman et al., 2001).

Además de mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa 1, se han buscado otros genes relacionados con la esclerosis lateral amiotrófica, ALS familiar, y existen varios candidatos en diversos cromosomas, como el locus del cromosoma 18 (18q21), con transmisión dominante de la enfermedad, otra de aparición muy temprana asociada con el cro-

Tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

1) Neuroprotectores

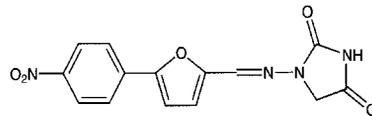


- Riluzol: modulador de los canales de sodio y también actúa sobre los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA).
- Los antiepilépticos de acción sobre canales de sodio y la memantina sobre receptores NMDA.
- Factores de crecimiento de las neuronas colinérgicas.

2) Anti-espasticidad



- Baclofén: agonista de los receptores metabotrópicos de GABA (GABA_B).



- Dantroleno: relajante muscular que impide la salida de calcio del retículo sarcoplásmico.

Figura 23.—Tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

El empleo de neuroprotectores de muy diversa procedencia es una de las posibilidades, y se utilizan desde antiepilépticos que ralentizan la función de los canales de sodio o de calcio voltaje dependientes, como bloqueantes suaves de los receptores ionotrópicos de glutamato de tipo NMDA, como el actualmente recomendado para la enfermedad de Alzheimer, la memantina. Los factores de crecimiento de neuronas colinérgicas son por el momento de difícil utilización. Los dolores debidos a los espasmos musculares y la rigidez se aminoran con la utilización de relajantes musculares.

mosoma 9 (9q34). El gen denominado ALS2, codifica un regulador de la GTPasa y el NEFH codifica una proteína de neurofilamentos, pero ambas mutaciones son mucho menos frecuentes que las debidas a SOD1. La importancia del receptor ionotrópico de glutamato, el NMDA, y de todas las cascadas de señalización en las cuales el calcio es un elemento iniciador, sugieren que posiblemente en algunos casos las kinasas y fosfatasas reguladas por este ión podrían estar implicadas en la generación de la esclerosis lateral amiotrófica, aunque la búsqueda de alteraciones en genes relacionados ha resultado infructuosa hasta el momento (Krieger et al., 2003).

También la búsqueda de factores de riesgo ha sido intensa en la ALS, encontrando que no hay relación con los deportes de riesgo, o con mayor actividad de los músculos, que es solamente un «poquito» más frecuente en los fumadores, y lo mismo en los que consumen dietas con alto contenido en glutamato. Donde sí parece existir una relación es en los que utilizan pesticidas, y recientemente un alto índice de esclerosis lateral amiotrófica ha sido observada en los veteranos de la guerra del golfo expuestos a diversos tóxicos (Migliore y Coppedé, 2002; Mayeux, 2003).

BIBLIOGRAFÍA

- Beckman, J.S.; Estevez, A.G.; Crow, J.P. and Barbeito, L., «Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS». *TINS*, **2001**, 24, 15-20.
- Dingledine, R. and McBain, C.J., «Glutamate and aspartate», **1999**, 315-333, en *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6.^a ed. Editores: G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher and M.D. Uhler. Editorial Lippincott-Raven, New York.
- Floyd, R.A. and Hensley, K., «Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases». *Neurobiology of aging*, **2002**, 23, 795-807.
- Herndon, L.A. et al., «Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*». *Nature*, **2002**, 419, 808-814.
- Herken, H. and Hucho, F., «Selective Neurotoxicity. Handbook of experimental pharmacology». Springer-Verlag, **1992**.

M.^a Teresa Miras Portugal

- Hörtnagl, H. and Hanin, I., «Toxins affecting the cholinergic system», **1992**, 293-332. Editors: Herken, H. and Hucho, F., «Selective Neurotoxicity. Handbook of experimental pharmacology». Springer-Verlag.
- Krieger, C.; Hu, J.H., and Pelech, S., «Aberrant protein kinases and phosphoproteins in amyotrophic lateral sclerosis». *TIPS*, **2003**, 24, 535-541.
- Mayeux R., «Epidemiology of Neurodegeneration». *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, 26, 81-104.
- Migliore, L. and Coppedè, F., «Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases». *Mutation Research*, **2002**, 1-19.
- Muscoli, C.; Cuzzocrea, S.; Riley, D.P.; Zweier, J.L.; Thiemermann, C.; Wang, Z-Q. and Salvemini, D., «On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies». *British Journal of Pharmacology*, **2003**, 140, 445-460.
- Rosen, D.R. et al., «Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis». *Nature*, **1993**, 362, 59-62.

CAPÍTULO 5

Enfermedad de Huntington

INTRODUCCIÓN

La aparición de movimientos incontrolados, denominados corea, con pérdida de las capacidades intelectuales y cambios de conducta, fueron descritos por primera vez por el doctor George Huntington en 1872, cuando describe las anomalías de una serie de pacientes de la zona de Long Island, en Estados Unidos. Su prevalencia es de aproximadamente 10 pacientes por cada 100.000 habitantes, con lo que es relativamente frecuente, además se transmite de modo autosómico dominante, con desarrollo fatal a partir de los 35-40 años.

La enfermedad de Huntington (HD) es una de las más representativas de las enfermedades neurodegenerativas debidas a la expansión de un triplete CAG en el DNA. Este triplete codifica por el aminoácido glutamina y el resultado es que en edades adultas las proteínas codificadas pueden contener hasta 80 residuos de glutamina consecutivos. Estas zonas de poliglutamina (poliQ) interfieren con las funciones propias de la proteína nativa simplemente creando un impedimento estérico. Este tipo de anomalías se agrava en sucesivas generaciones, conforme la expansión del triplete CAG se incrementa.

Enfermedad de Huntington

- **Es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por:**
 - **Discapacidad progresiva en la coordinación del movimiento.**
 - **Pérdida progresiva de las capacidades cognitivas.**
 - **Alteraciones psiquiátricas.**
- **En Europa su incidencia es de 8 de cada 100.000 individuos.**
- **Es una de las enfermedades más representativas debidas a la expansión del triplete CAG en el ADN.**
- **El triplete CAG codifica el aminoácido glutamina y las proteínas afectadas pueden contener hasta 80 residuos glutamina consecutivos.**
- **Estas secuencias de poliglutamina (poliQ) interfieren con las funciones de las proteínas por impedimento estérico.**
- **La huntingtina es una proteína que se expresa abundantemente en las neuronas del cortex que prolongan hacia el estriado.**

ASPECTOS GENÉTICOS Y FUNCIONALES DE LA HUNTINGTINA

En el caso de la enfermedad de Huntington el gen con expansión de poliglutamina es el que codifica la proteína *huntingtina*. El gen denominado IT15 se encuentra cerca del extremo del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). En la enfermedad de Huntington puede haber desde 37 hasta 240 repeticiones del triplete CAG, que codifica por otras tantas glutaminas. En individuos sanos puede haber ente 11 y 35 repeticiones de este triplete sin que aparezca ninguna anomalía. A partir de 42 repeticiones la enfermedad aparece con todos sus síntomas. Esta expansión de poliglutaminas se encuentra próxima al extremo N-terminal de la proteína, alterando su función, su recambio y formándose acúmulos citosólicos y nucleares. Esta proteína se expresa abundantemente en el cortex cerebral y los ganglios basales, que son áreas esenciales para el control del movimiento. La muerte neuronal, fundamentalmente en el cortex y el estriado, produce un decline de la capacidad de razonar y el movimiento incontrolado de los músculos, lo que se deno-

mina corea. Los primeros síntomas aparecen al final de la segunda década de vida y la severidad de los síntomas depende del tamaño del triplete CAG. Actualmente se dispone de modelos animales donde se expresa la proteína mutada con diferentes tamaños del triplete CAG y de modo condicionado, para permitir el desarrollo de los ratones hasta una cierta edad. Los primeros modelos y los empleados fundamentalmente proceden del grupo de J. J. Lucas del Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Autónoma de Madrid.

Curiosamente, si en la enfermedad de Alzheimer las neuronas colinérgicas eran de las primeras en verse afectadas, y en la enfermedad de

Las neuronas más afectadas en el Huntington son las GABAérgicas del estriado (de tamaño mediano) y las glutamatérgicas que establecen los circuitos desde el cortex.

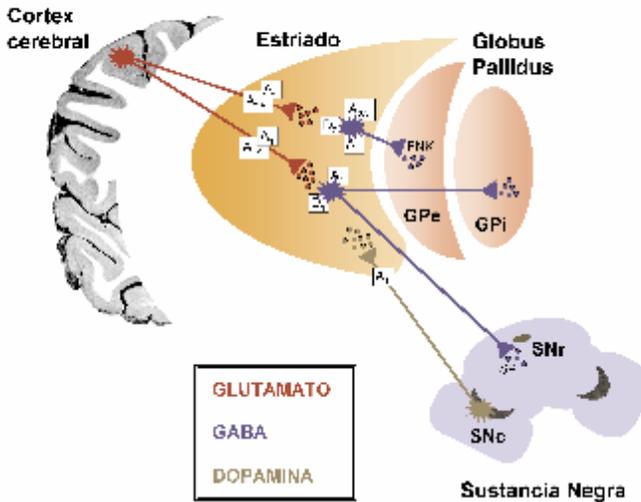


Figura 24.—Vías centrales de control del movimiento afectadas en la enfermedad de Huntington.

Las primeras neuronas que se ven afectadas en la enfermedad de Huntington son las neuronas GABAérgicas del estriado. La muerte preferente de estas neuronas es un área de debate, donde se postulan múltiples hipótesis, recientemente se ha añadido una más a la lista, según la cual, es la carencia del factor de crecimiento específico de las neuronas GABAérgicas, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) el que falta o se produce de modo escaso. Este factor se libera y debería de ser aportado por las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral, las cuales establecen los contactos sinápticos en el estriado. Es de destacar también la abundante presencia de receptores de adenosina tanto a nivel pre- como post-sináptico en estas estructuras.

Parkinson eran las de dopaminérgicas, en el caso de la enfermedad de Huntington parece existir una pérdida significativa de las neuronas GABAérgicas del estriado. Lo que explicaría la pérdida de la modulación inhibitoria mediada por GABA en los ganglios basales. En etapas más avanzadas de la enfermedad también disminuyen las neuronas colinérgicas y las dopaminérgicas. La muerte de las neuronas de estriado en los afectados por la enfermedad de Huntington hizo postular un efecto activador de la proteína mutada sobre las caspasas que participan en la apoptosis. Destacar que recientemente se ha descubierto que las terminales GABAérgicas de estriado tienen una elevada presencia de receptores ionotrópicos de nucleótidos (P2X) y de dinucleótidos. Estos receptores presinápticos, que permiten la entrada masiva del ión calcio, son a su vez modulados por los receptores para el propio GABA, de tipo metabotrópico GABA_B, que se encuentran co-localizados en las mismas terminales. Las consecuencias de esta modulación en la patología de Huntington están todavía por definir (Gómez-Villafuertes et al., 2001, 2003, 2004).

Las funciones de la huntingtina en la célula no están muy claras, en primer lugar se expresa en células neurales y no neurales, y no existe una expresión preferente en estriado, que es donde se producen las primeras lesiones. Para explicar sus efectos se postularon varias hipótesis, una de ellas ponía de manifiesto la interacción de la huntingtina con el enzima esencial en la glucólisis, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Una interacción con la proteína anómala disminuiría la capacidad de respuesta celular en situaciones comprometidas energéticamente.

¿CUÁL ES LA SITUACIÓN ACTUAL RESPECTO A LOS MECANISMOS QUE OCASIONAN LOS SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON?

Estudios en animales y en células en cultivo expresando la huntingtina mutada, indican que la proteína normal tienen una importante misión en las zonas pre- y post-sináptica, participando en la remodelación sináptica, conocida también como *plasticidad sináptica*, que es esen-

cial en los procesos de aprendizaje. En las células donde se expresa la forma normal, la huntingtina se une a la clatrina, a un adaptador conocido como AP2 y a una proteína denominada Hip (Huntington interacting protein) para formar la vesícula de endocitosis. De este modo se pueden reorganizar y limpiar las estructuras sinápticas. Cuando la forma presente de huntingtina contiene el expandido de poliQ, este complejo no puede formarse, pues la interacción con Hip está bloqueada. Esta proteína Hip ha resultado ser un factor capaz de activar la caspasa 8 y disparar toda la maquinaria que lleva a la muerte celular. Este mecanismo ha abierto la posibilidad para entender otras enfermedades neurodegenerativas debidas a la expansión del triplete CAG, como son las múltiples variedades de ataxias (Zeron et al., 2001; Mangiarini et al., 1997; Mattson, 2002). Pero aunque la huntingtina mutada no sea capaz de realizar todas las acciones anteriormente expuestas, llevando a la activación de caspasas y muerte celular, es posible que concurren otros mecanismos que puedan explicar la lesión y muerte preferente de las neuronas GABAérgicas de estriado.

¿CÓMO EXPLICAR LA MUERTE PREFERENTE DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON?

Las funciones de la huntingtina normal distan mucho de ser conocidas en su totalidad y además de las citadas en la regulación de la endocitosis, existe otro aspecto poco destacado y es la acumulación de esta proteína en núcleo cuando existe una mutación. Se pensaba que era simplemente un acúmulo debido justamente a su alteración, sin que eso indicara necesariamente una función nuclear de la proteína normal. Actualmente se ha visto que la huntingtina normal, pero no la mutada, estimula la transcripción del gen que codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en las neuronas corticales que establecen sinapsis con las GABAérgicas estriatales, a las cuales aporta el factor trófico que les permite mantener su fenotipo y funcionalidad (Zuccato et al., 2001). El mecanismo por el cual consigue activar este gen es a través de su acción sobre un elemento denominado elemento silenciador restrictivo de neuronas (NRSE), que está en la zona promo-

tora del gen del BDNF, entre otros. El mecanismo mediante el cual la huntingtina consigue abolir la actividad del silenciador es relativamente compleja y requiere la unión de la proteína al factor citosólico represor de los factores de transcripción (REST/NRSF). Este es un factor necesario para mantener inactivo el NRSE. Cuando la huntingtina es normal, este factor REST/NRSF permanece en el citosol con la huntingtina unida y el NRSE es activo. Cuando la huntingtina es anormal no se une al factor citosólico y el REST/NRSF viaja libremente al núcleo donde se une al NRSE bloqueando definitivamente los genes bajo su control. De este modo, la carencia de factor BDNF, esencial para mantener el fenotipo neural GABAérgico, origina la pérdida y degeneración de este tipo de neuronas. Este elemento regulador está ampliamente distribuido en otros genes neurales y por lo tanto la hun-

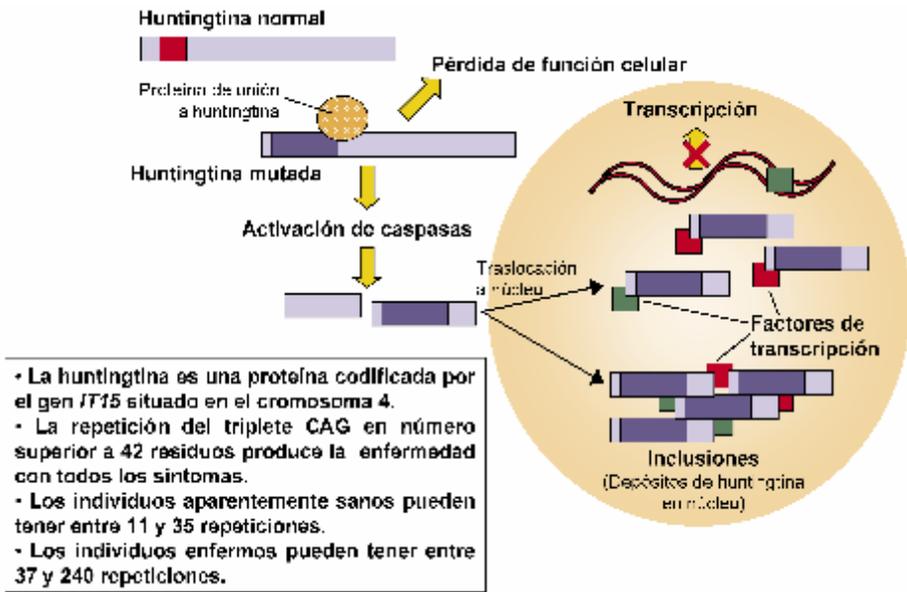


Figura 25.—Aspectos funcionales de la Huntingtina.

Las funciones de la Huntingtina no son bien conocidas, pero se empieza a conocer su capacidad para estimular la expresión de genes nucleares. La proteína normal es capaz de unirse a un factor citosólico, el REST, impidiendo que viaje al núcleo. En ausencia de este factor citosólico represor, el factor nuclear conocido como NRSE es capaz de activar la transcripción de genes, entre ellos el del factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF). La huntingtina mutada no puede impedir que los factores REST viajen al núcleo y repriman la expresión de genes específicos al unirse a NRSE.

Por otra parte, esta huntingtina mutada forma depósitos en el núcleo celular.

tingtina puede tener efectos mucho más amplios sobre la transcripción de otras proteínas, aunque la pérdida de las neuronas gabaérgicas sea una de las más evidentes (Tilstone, 2003; Zuccato et al., 2001, 2003).

Queda mucho por comprender en la enfermedad de Huntington y de otras originadas por la expansión de los tripletes CAG y las correspondientes proteínas con la carga adicional de poliglutamina. ¿Cuáles son los elementos comunes a todas ellas y cuáles son específicos de cada alteración? Sólo un profundo conocimiento básico nos puede ofrecer alguna alternativa para paliar sus efectos y comprender otras situaciones en las que la función neural pueda verse comprometida.

PREVENCIÓN Y ASPECTOS ACTUALES DEL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Los efectos devastadores de la enfermedad de Huntington no tienen un tratamiento eficaz por el momento y puesto que estamos en la era de la genómica sería de desear que en las familias donde se tenga constancia de algún antecedente, se realicen análisis para conocer si se es o no portador de la mutación. Al ser una enfermedad autosómica dominante, si uno de los miembros de la pareja es portador, la transmitirá al 50% de su descendencia. Se hace necesario por tanto poder establecer un control y romper la transmisión del gen. En épocas pasadas el consejo genético recomendaba no tener descendencia, hoy día con la posibilidad de fecundación *in vitro* y análisis de los embriones, permite seleccionar, previa implantación uterina, el embrión carente del gen anómalo, lo que permitirá romper en un futuro la cadena de transmisión de la corea de Huntington.

En los pacientes que sufren la enfermedad de Huntington existen por el momento pocos tratamientos eficaces y se trata de evitar los síntomas de la enfermedad en lo posible, tanto los movimientos como la conducta agresiva o el insomnio. Para mayor información véase la excelente revisión de García de Yébenes et al. (2002).

El conocimiento de las funciones básicas de la huntingtina como factor esencial en la expresión del factor de crecimiento nervioso deri-

vado del cerebro, ha postulado que una administración local mediante cánula del BDNF, en el estriado, podría hasta cierto punto regenerar las neuronas GABAérgicas que son las primeras afectadas. Otra posibilidad es el trasplante de este tipo de neuronas, junto con una fuente productora de los factores de crecimiento y desarrollo.

Otras acciones de la huntingtina

- **Se comporta como un factor de transcripción nuclear.**
- **En el núcleo se une al factor silenciador NRSE, desinhibiendo los genes silenciados.**
- **La huntingtina normal en el núcleo induce la expresión del factor de crecimiento denominado *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF). La carencia de este factor de crecimiento en las personas que tienen la mutación de huntingtina explica también la degeneración primordial de las neuronas GABAérgicas del estriado.**

Tratamiento de la corea de Huntington

- **Evitarla por selección de embriones mediante análisis genético.**
- **En los que ya la sufren, paliar los movimientos coreo-atetósicos y el avance de la enfermedad.**
 - El descubrimiento de la implicación de factores nucleares podría suponer nuevas vías farmacológicas en el futuro.
 - La presencia de receptores de adenosina en las terminales del estriado podría utilizarse para una aplicación farmacológica inmediata.

Recientemente se está tratando de desarrollar una farmacología de más fácil dosificación para tratar de ralentizar la evolución de la enfermedad. Esta nueva aproximación se basa en la amplia distribución de los receptores de adenosina de tipo $A2_A$ en todo el estriado. Estos receptores están presentes tanto pre como postsinápticamente, actúan acoplados a proteínas Gs, activando la adenilato ciclasa. Los altos niveles de AMPc favorecen la exocitosis a nivel presináptico, y al nivel postsináptico la excitabilidad de la neurona. El empleo de antagonistas selectivos de este receptor podría modular la actividad sináptica y evitar la excitotoxicidad mediada por el transmisor glutamato, que es el neurotransmisor de la neurona proveniente de la corteza que contacta con las GABAérgicas del estriado. No conviene olvidar que el antagonista por antonomasia de todos los receptores de adenosina es la cafeína, y su

problema reside en que no diferencia los subtipos, siendo esencial una farmacología diferencial (Blum et al., 2003).

BIBLIOGRAFÍA

- Blum, D.; Hourez, R.; Galas, M.-C.; Popoli, P. and Schiffmann, S.N., «Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics». *Lancet Neurol.* **2003**, 2, 366-374.
- García de Yébenes, J.; Hernández, J. and Cantarero, S., «Progresos en la enfermedad de Huntington». Capítulo 7. *Enfermedades neurodegenerativas*. Editado por Farmaindustria. Editores: Segovia de Arana, J.M y Mora Teruel, F., **2002**, pp.85-101.
- Gómez-Villafuertes, R.; Pintor, J.; Gualix, J. and Miras-Portugal, M.T., «GABA_B receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes». *Neuropharmacology*, **2003**, 44, 311-323.
- Gómez-Villafuertes, R.; Pintor, J.; Gualix, J. and Miras-Portugal, M.T., «GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2004**, in press.
- Gómez-Villafuertes, R.; Gualix, J. and Miras-Portugal, M., «Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors able to induce GABA secretion». *J. Neurochem.* **2001**, 77, 84-93.
- Mangiarini, L. et al., «Instability of highly expanded CAG in mice transgenic for the Huntington's disease mutation». *Nat. Genet.* **1997**, 5, 197-200.
- Mattson, M.P., «Huntington's disease. Accomplices to neuronal death». *Nature*, **2002**, 415, 377-379.
- Tilstone, C., «Huntingtin protein helps cells to REST at ease from Huntington's». *Lancet Neurol.* **2003**, 2, 520.
- Zeron, M.M. et al., «Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death». *Mol. Cel. Neurosci.* **2001**, 17, 41-53.
- Zuccato, C.; Ciammola, A.; Rigamonti, D. and Cattaneo, E., «Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease». *Science*, **2001**, 293, 493-498.
- Zuccato, C.; Tartari, M.; Crotti, A.; Goffredo, D.; Valenza, M.; Conti, L.; Cataudella, T.; Leavitt, B.R.; Hayden, M.R.; Timmusk, T.; Rigamonti, D. and Cattaneo, E., «Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes». *Nature Genetics*, **2003**, 35, 76-83.