

BMPII-Temario-Completo.pdf



Jose98JV



Bases Moleculares de la Patología II



3º Grado en Bioquímica



**Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

Bases Moleculares de la Patología II

Introducción – 28-01-2019

Pautas básicas

Bloques

1. Enfermedades neurológicas
2. Enfermedades metabólicas hereditarias
3. Otras patologías

Evaluación

- Continua
 - Controles. 2 puntos, 1 por cada control.
 - Evaluación de talleres. 2 puntos.
- Final
 - Examen final 6 puntos

Talleres

Artículos de investigación. Grupos de 3/4 personas. Primer trabajo en desdoble. Intervención de todos los miembros del grupo.

Entregar un **resumen**. Con **hallazgos más significativos y un poco de crítica**. De **100 palabras**.

Asistencia obligatoria. En el examen final, pueden entrar conceptos para reforzar conceptos de los artículos.

- **Enfermedades neurológicas**
 - **7 febrero**
 - **14 febrero**
- **Enfermedades metabólicas**
 - **21 marzo**
 - **4 abril**
- **Otras patologías**
 - **11 abril**

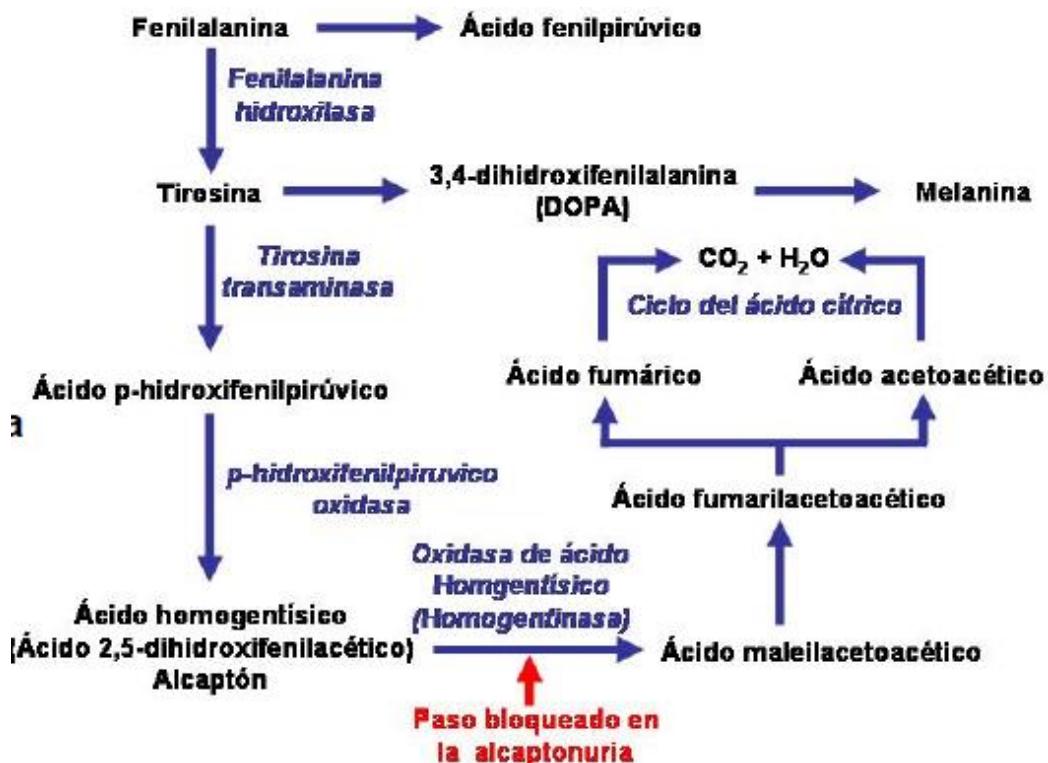
Grupo 8, junto con Javier Herrero. Día 7.

Bases Moleculares de la Patología II

Introducción a las enfermedades genéticas – 29-01-2019

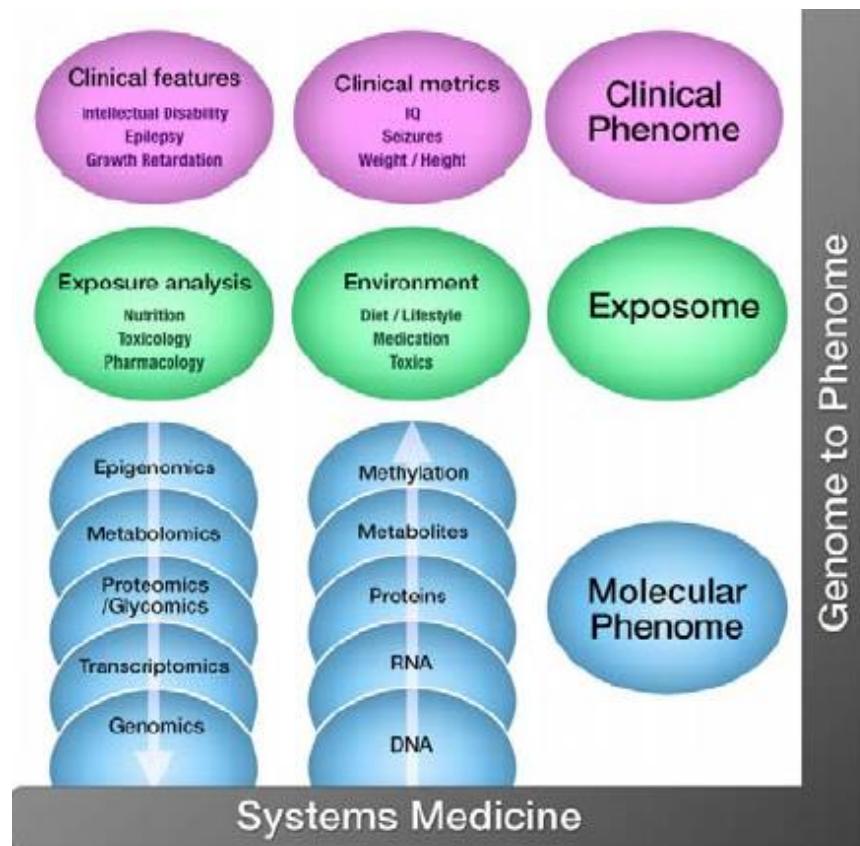
Historia

- Se comienza a hablar de enfermedades hereditarias en El Talmud. Se reconoce la hemofilia.
- Mendel, 1866.
- Teoría cromosómica de la herencia, 1902
- La alcaptonuria es la primera enfermedad genética en la que se reconoce su causa.
 - Falla la homogentinasa, acumulándose ácido homogentísico. Se sufre artritis en la edad, depositándose el ácido homogentísicos en las válvulas cardíacas, articulaciones, etc.
 - Componente hereditario con herencia autosómica recesiva. Se sospechaba por una mayor incidencia en endogamia.
- Técnicas de secuenciación son las que han hecho que muchas enfermedades genéticas se diagnostiquen a nivel de diferencia nucleotídica.



Biología de Sistemas se define como la visión integrada de una célula en una situación patológica, integrando todas las ómicas como algo único. Esto permitiría implementar una medicina personalizada.

Esta, tiene en cuenta el fenoma molecular, como su exposoma y su fenoma clínico. Se habla de las cuatro P: **personalizado, predictivo, participativo y preventivo**.



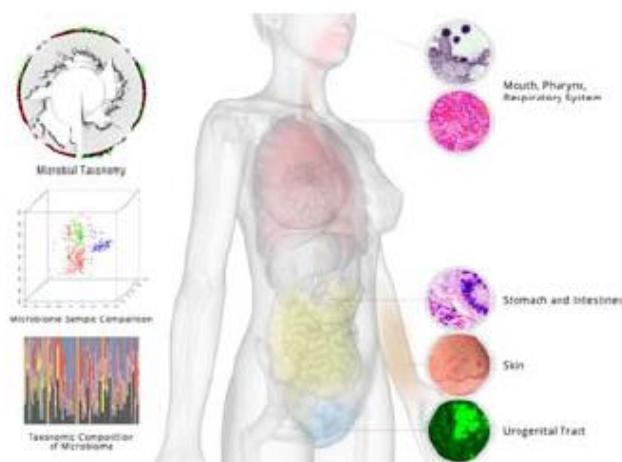
A nivel de consorcios públicos, lo que tiene más importancia es que **se comparten los datos genómicos y clínicos de los pacientes**. Esta es la manera de avanzar, sobre todo en enfermedades raras por su difícil diagnóstico.



Los consorcios privados, liderados por Craig Venter, se dedica a las patologías asociadas al envejecimiento. Se especializa en enfermedades genómicas, microbioma y metaboloma junto con terapias de células madre.

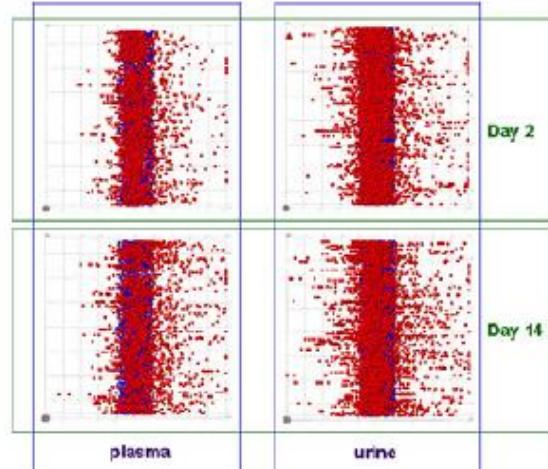
El conjunto de microorganismos que pueblan el organismo humano tienen una asociación con el estado patológico del paciente. Es por ello que enfermedades como Crohn se tratan por medio de transplante de heces (trasplante de microbioma). Es importante también el metaboloma.

THE HUMAN MICROBIOME



Developing improved probiotics, advanced diagnostics and therapeutic approaches to improve health and wellness.

THE HUMAN METABOLOME



Get a clearer picture of that individual's health status and map changes in the small molecules to end points of disease and gene mutations.

Proyecto 3M. Secuenciación de 3 millones de genomas.

Human Genoma Project Write. Lanzado en 2016. Aprender cómo funciona el genoma mediante Biología Sintética, sintetizando cromosomas completos de organismos.

Conceptos clave

El DNA está sujeto a daño por mutágenos exógenos y endógenos. Por un lado son fuente de evolución, pero también de patología. Las mutaciones son en principio al azar, pero hay hotspots como CpG.

Los SNPs pueden ser causantes de enfermedad o polimorfismos. La mayoría no son patogénicas per se, pero en combinación con otras variantes y factores no genéticos, pueden modificar la susceptibilidad a enfermedades multifactoriales o complejas. Son útiles como marcadores.

Pueden ser variante patogénicas de pérdida de función o de ganancia de función. La herencia depende del tipo de mutación, no del gen mutado.

Los fenotipos dominantes, además, pueden deberse a otras razones aparte de la ganancia de función

- **Haploinsuficiencia.** La cantidad de uno de los alelos no es suficiente para tener una célula normal.
- **Dominante negativo.** El producto mutado interfiere con la función normal.

Cada vez más se encuentran penetrancias variables que están causadas por elementos reguladores. **Mutaciones que disminuyen la cantidad de producto génico en productos dominantes, pueden disminuir la penetrancia.**

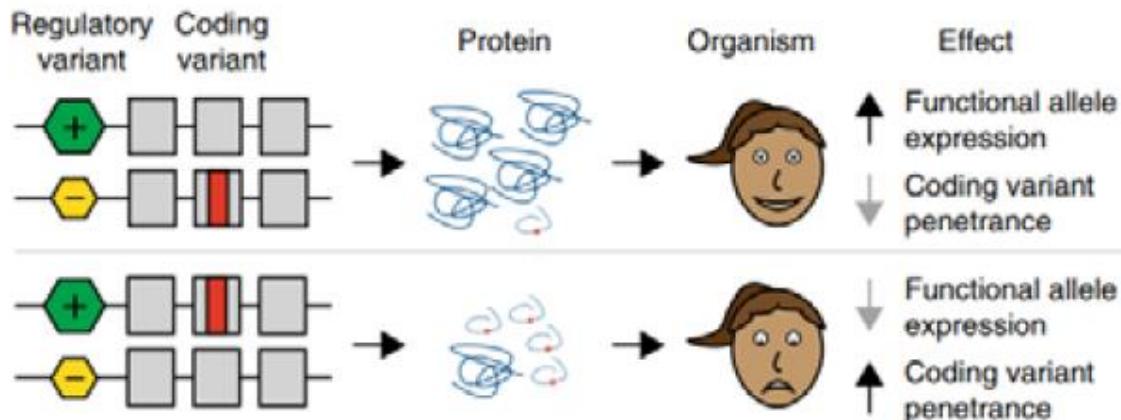


Fig. 1 | Regulatory variants as modifiers of coding variant penetrance.

Ejemplos de enfermedades autosómicas recesivas

Fibrosis quística y enfermedad de Tay-Sachs

La fibrosis quística está provocada por mutaciones en el gen que codifica para CFTR. Este, es un canal regulador del transporte de iones Cl⁻ a través de la membrana. Mutaciones en este gen originan una pérdida de función, que producen un **disminución o una ausencia completa de actividad transportadora**.

La enfermedad de Tay-Sachs (HEXA, 15q23) se produce por **mutaciones de pérdida de función** que producen una **pérdida completa de actividad de la enzima hexoaminidasa A**, codificada por el gen HEX A. Esta, **cataliza la degradación lisosomal del lípido GM2-gangliósido neuronal**. Si no hay actividad hexoaminidasa, el **gangliósido se acumula y produce degeneración neuronal**.

Ejemplos de enfermedades autosómicas dominantes

Enfermedad de Huntington y osteogénesis imperfecta

La **enfermedad de Huntington (4p14.3 HD)** se produce por expansión de la repetición CAG que codifica por Gln localizada en la **región codificante del gen**. Se produce una **ganancia de función**. Se producen una serie de **agregados proteicos tóxicos**, consecuencia de las interacciones de la larga serie de residuos de glutamina que causan la muerte neuronal prematura. La **región de poliQ impide la interacción normal de la huntingtina con otras proteínas**.

La **osteogénesis imperfecta** se produce por mutaciones en los genes COLA1A1 y COL1A2. Provocan una **proteína anormal que causan un grado más severo de la enfermedad que las que reducen su producción**, debido a que se forman moléculas de procolágeno aberrantes.

Acondroplasia

El gen responsable es el **FGFR, receptor del factor de crecimiento fibroblástico**, que regula negativamente el crecimiento de los huesos. Es un gen con una elevada tasa de mutación, pues el 80% de las mutaciones aparecen de novo.

Se suelen corresponder con una **mutación puntual**, denominada **pG380R**. Es una mutación que produce una **ganancia de función de forma que hace constitutiva la inhibición de FGFR3 sobre el crecimiento óseo**.

Ejemplos de enfermedades pseudoautosómicas dominantes

Baja estatura idiopática/discondriostosis de LeriWeill

El gen responsable es el gen SHOX (short stature homeobox), **en las regiones PAR1**. Está relacionado con el **crecimiento longitudinal de los huesos**. El mecanismo de la enfermedad, suele estar provocado por una **haploinsuficiencia de SHOX**. Suele estar provocada por **mutaciones nulas heterocigotas**.

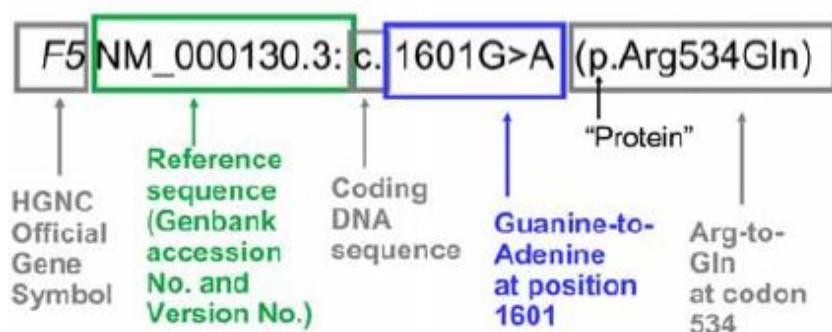
Enfermedades raras - Enfermedades poco frecuentes

Menos de 5 casos cada 10000 habitantes. En su conjunto afectan a un 8% de la población europea.

OMIM

Catálogo de genes y variantes genéticas.

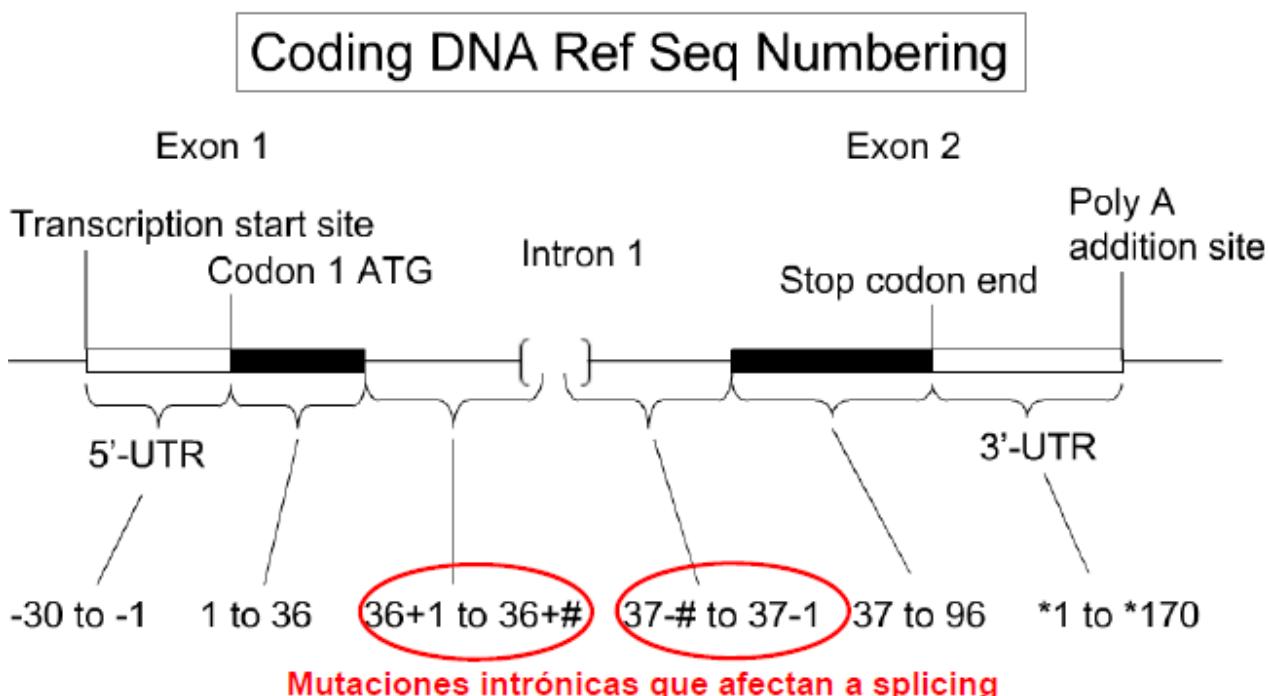
Nomenclatura de mutación



- HGNC – Símbolo oficial del gen
- RefSeq accesión número y número de versión
- Cambio a nivel de nucleótido.
 - Nos referimos al cDNA. Se añade el tipo de cambio. Nucleótido 1, A del ATG.
- Cambio a nivel de proteína
 - Código de una letra o tres letras

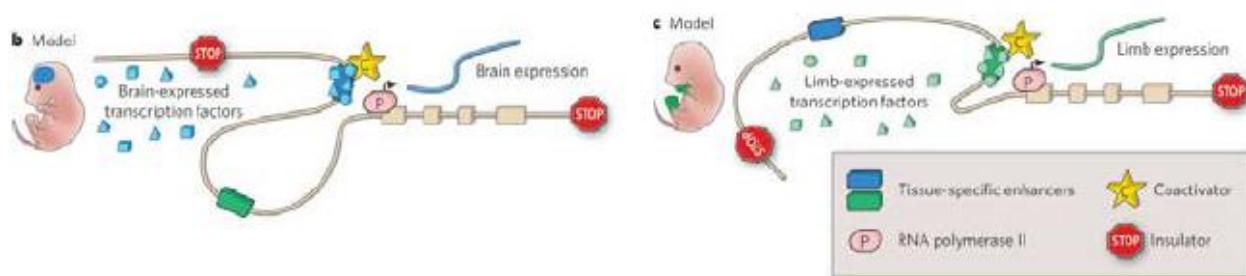
Numeración de los nucleótidos:

- **5'UTR son números negativos desde el -1 al -X.**
- Primer exón ATG, A es el 1.
- A partir del último nucleótido exónico se le llama al número **del último exónico + nucleótido del intrón o – si es en el extremo final del intrón.**



- Codones de parada se ponen asteriscos en el código de una letra o Ter de terminación en el código de tres letras.
- Si se dan inserciones o delecciones, ins/dup o del. A nivel de proteína, suele haber frameshift.
- Los nucleótidos suelen ser exónicos en mayúscula e intrónicos en minúscula.
- En ocasiones hay mutaciones en regiones reguladoras muy lejanas.

Los enhancers se ponen cerca de promotores proximales en el espacio para realizar su función



Tipos de mutaciones patogénicas

- **Mutaciones puntuales**
- **Mutaciones dinámicas.** Son mutaciones del tipo **expansión de trinucleótidos**.
 - Inhiben la transcripción, ganan funciones tanto a nivel de proteína como a nivel de mRNA, secuestrando factores de splicing, por ejemplo.

- **Grandes delecciones/inserciones/inversiones/translocaciones**
 - Introducen cambios en la dosis génicas, interrupciones en genes, fusión de genes, cambian su expresión dependiendo del efecto posicional y manifiestan muchas mutaciones recesivas en el caso de delecciones.
- **Cromosomopatías.** Alteraciones tanto numéricas como estructurales.

Las mutaciones más comunes son las miss-sense.

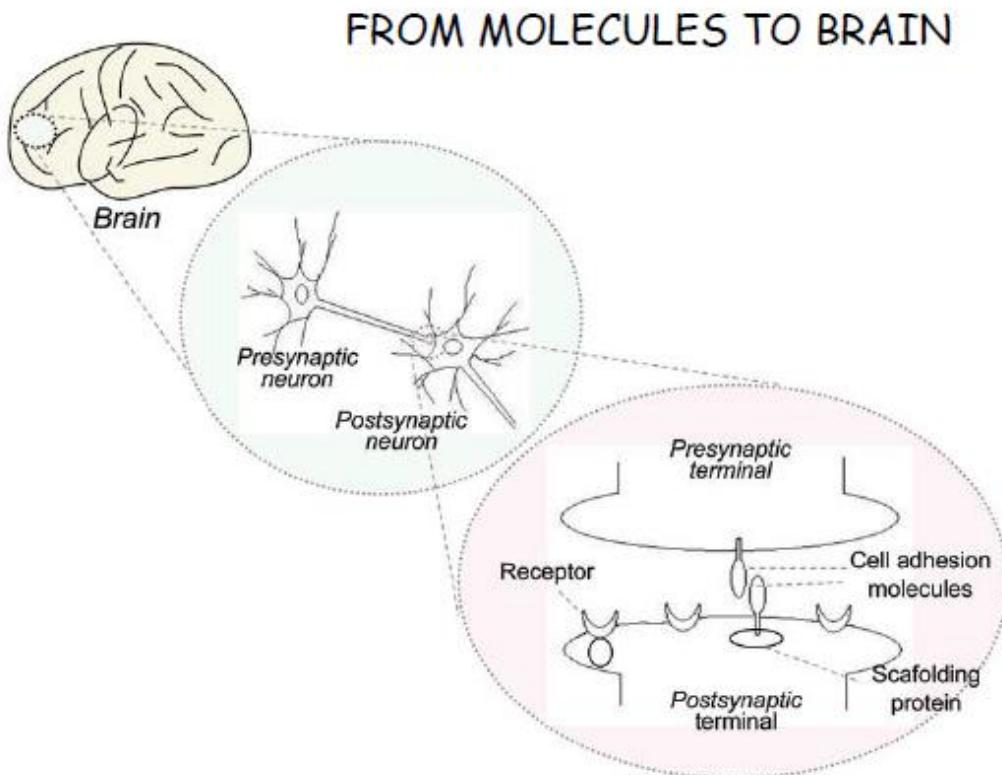
HGMD® Statistics

MUTATION TYPE	NUMBER OF ENTRIES (PREVIOUSLY)
Micro Lesions	
Missense / Nonsense	124,511 (120,901)
Splicing	19,796 (19,247)
Regulatory	3,974 (3,925)
Small Deletions	32,440 (31,571)
Small Insertions	13,570 (13,167)
Small Indels	3,033 (2,970)
Gross Lesions	
Repeat Variations	513 (511)
Gross Insertions / Duplications	4,058 (3,942)
Complex Rearrangements	1,949 (1,925)
Gross Deletions	16,426 (15,999)
Total	220,270 (214,158)

Bases Moleculares de la Patología II

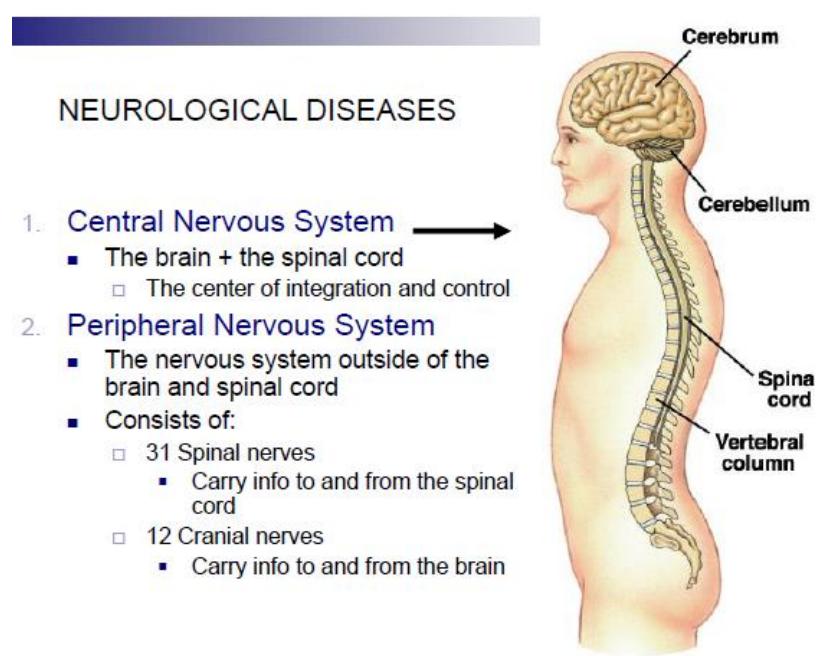
Enfermedades neurológicas – 30-01-2019

El sistema nervioso, en particular el central es un órgano complejo. Gran interés en estudiar y entender cómo funciona el mismo. Tiene un gran número de células conectadas entre sí por unos patrones precisos, **estudiado por la conectómica**.



La propia actividad del sistema nervioso central está dada por la **conectómica**, siendo alteradas en patología.

Las enfermedades neurológicas se definen como aquellas que afectan al sistema nervioso **central y periférico**:



Síntomas muy variados. Dependen de la **región del sistema nervioso afectado y por ello, de los circuitos afectados en cada caso**. Por ejemplo: visión doble, afasia, temblor en manos, debilidad extrema, parálisis, pérdida de coordinación, alucinaciones, desdoblamientos de la personalidad, depresión...

Son un **gran problema social**. **2.000 millones de personas sufren enfermedad neurológica o mental**. **El coste del tratamiento es elevado**. Por ello, las enfermedades del sistema nervioso tienen un gran impacto social. Más de 1/3 de la población estarían afectadas. Es una **causa importante de discapacidad y dependencia**. Se ha estimado que el coste es comparable al coste de todos los cánceres, diabetes y enfermedades cardiovasculares juntas.

Añadido a esto, está el hecho de que para la mayoría de enfermedades neurológicas tenemos tratamientos **muy poco eficaces**. En muchas enfermedades neurológicas no hay tratamiento, y en algunas otras tratamientos paliativos más o menos eficaces.

Las enfermedades neurológicas son **heterogéneas**. Por ello, las enfermedades neurológicas se clasifican en:

- **Enfermedades del neurodesarrollo.** Espina bífida, microcefalia, lisencefalia. Afectan fundamentalmente a niños pequeños.
- **Enfermedades neurodegenerativas.** En general, el sistema nervioso se ha desarrollado bien, pero **hay una progresiva pérdida de neuronas y con ello una progresiva pérdida de enfermedades neurológicas**.
 - Alzheimer, demencia, parkinson, Huntington, ataxias, motoneuronales, priones
- **Enfermedades neuroinflamatorias.** Esclerosis múltiples.
- **Enfermedades neurometabólicas.** Suelen ser multisistémicas, pero tienen una incidencia especial en el sistema nervioso, como las lisosomales y mitocondriales.
- **Enfermedades epilépticas.** Hiperestimulación sincrónica de numerosas neuronas. Es un grupo amplio de enfermedades con distintas causas.
- **Enfermedades neurosensoriales.** Sordera, distrofias retinales, hipoacusias
- **Enfermedades con el dolor.** Dolor crónico, migrañas, dolores de cabeza.
- **Enfermedades neuromusculares.**
- **Cerebrovasculares.** Se caracterizan por **problemas en los vasos sanguíneos del cerebro, siendo enfermedades de origen vascular produciendo una serie de consecuencias neurológicas**. Aneurismas intracraneales, hemorragias subaracnoides, ictus.
- **Lesiones traumáticas del SNC. Por traumatismos.** Lesiones de la médula espinal, por ejemplo.
- **Infecciones del sistema nervioso.** Meningitis (inflamación del tejido conectivo que recubren el encéfalo), encefalitis.
- **Tumores neurales.** Como consecuencia de la acumulación de mutaciones. **Medulloblastomas (cerebelo), neuroblastomas (SNP) y gliomas**
- **Enfermedades mentales o neuropsiquiátricas.** Trastornos del espectro autista, ansiedad, drogadicción.

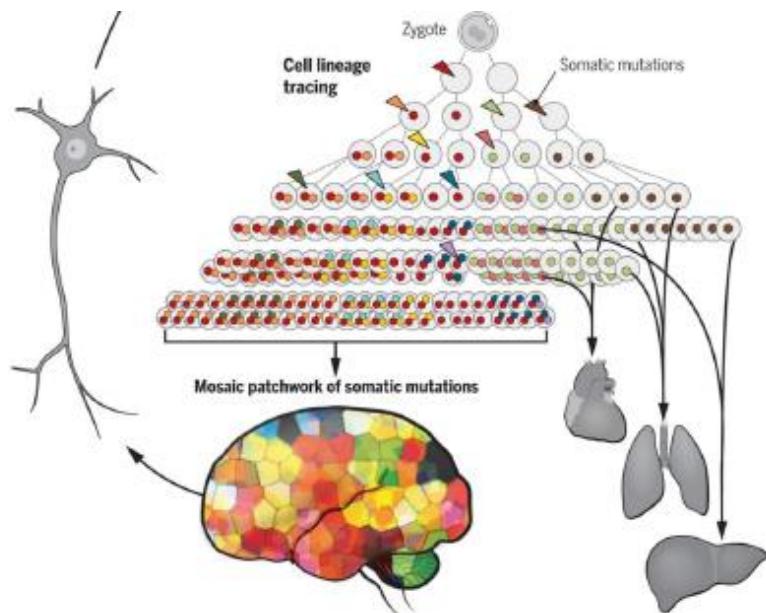
En la realidad, algunas clasificaciones se solapan.

En la asignatura se hablará de **enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas**.

En cuanto a la genética de las enfermedades neurológicas:

- **Neurogenéticas.** Hereditarias y de baja frecuencia, parte del grupo de enfermedades raras.
 - Herencia mendeliana. Puede ser recesiva o dominante.
 - Herencia mitocondrial
- **Esporádicas.** Son más comunes en la población. Sabemos menos de su origen, por lo que se indica que puede haber una influencia tanto de factores genéticos como de factores ambientales.

Las mutaciones somáticas son **importantes**. Recientemente, durante el desarrollo embrionario las células se van dividiendo y en estas pueden ir acumulándose mutaciones. La tasa de mutaciones es relativamente baja, por lo que se suele considerar que todas las células del organismo tienen el mismo genoma.

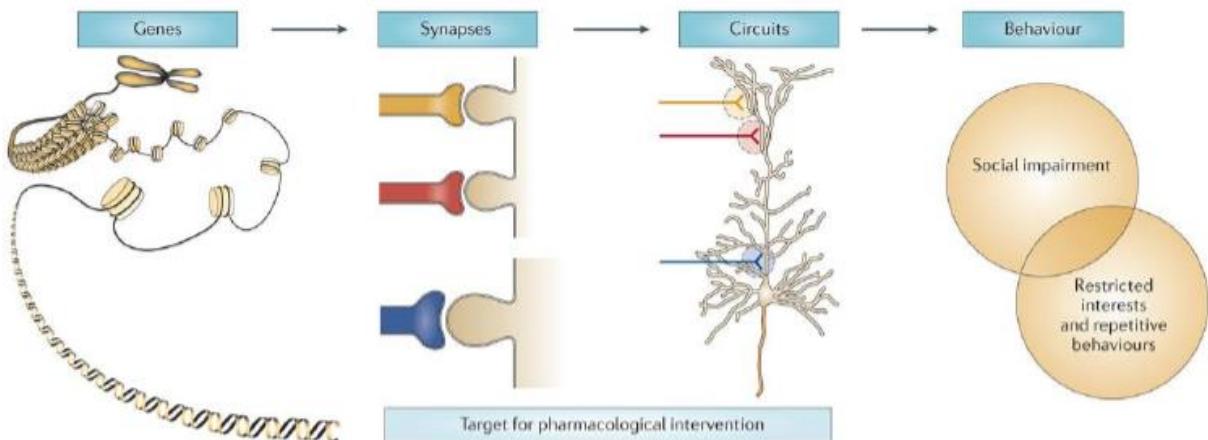


Parece ser que durante toda la proliferación celular, se acumulan más mutaciones de la que pensábamos. Es así que se puede llegar a considerar el cerebro como un mosaico celular que no se heredan y no están en DNA sanguíneo, pudiendo dar lugar a patología.

Quizá muchas de las enfermedades que clasificamos como esporádicas no hereditarias podrían deberse a mutaciones somáticas que no se transmiten a la descendencia. Serían, así, enfermedades somáticas no hereditarias y genéticas.

Las enfermedades genéticas raras se estudian porque son fáciles de estudiar y para entender mecanismos de patogénesis aplicables a enfermedades más frecuentes. En el caso de **espectro autista**, existen variantes muy poco frecuentes que sí son hereditarias y que se han identificado **mutaciones**. Esto nos ha permitido ver qué está alterado en procesos en otros pacientes con la misma sintomatología.

Los genes alterados pueden estar implicadas con traducción de proteínas, Wnt y señalización sináptica. Las mutaciones que se han encontrado están en una serie de pathways implicados. También pueden estar implicados a nivel celular tanto en sinapsis, localización... que producirían alteraciones en los circuitos del SNC.



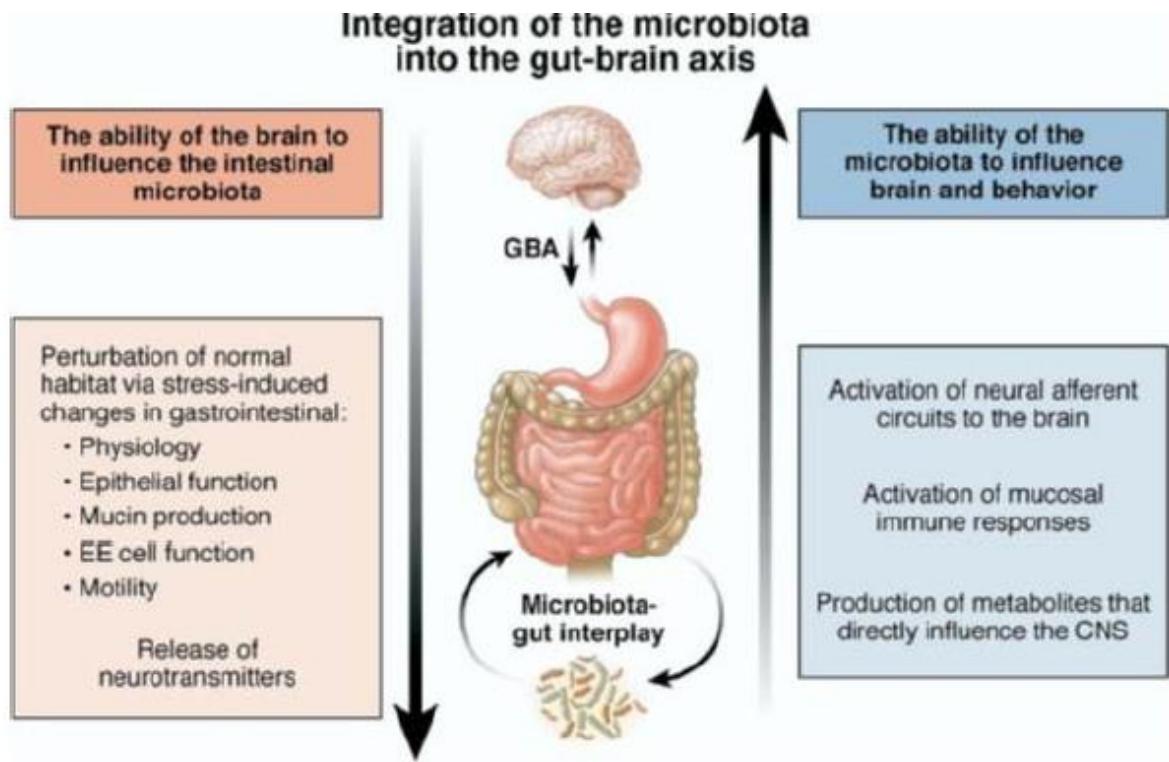
Al hablar de **enfermedades neurológicas**, así, necesitamos entender lo que ocurre a nivel molecular, celular y circuitual. Se sabe bastante a nivel molecular. A nivel celular se comienza a tener un conocimiento aceptable, pero a nivel de circuitos se sabe muy poco. Los síntomas de una enfermedad, dependen directamente de los circuitos afectados y esto depende muy indirectamente de las alteraciones moleculares.

Familias afectadas por enfermedades neurológicas, con una misma alteración, pueden dar lugar a un conectoma distinto. Además, hay una gran importancia de los factores ambientales, aún más en el sistema nervioso. Entre sus funciones, está recibir información del ambiente y modificar su expresión génica para dar lugar a remodelación de cromatina y de la célula y circuitería, ya sea a corto o largo plazo.

Cause	Connectome	Consequence	Classification
Mutation A + epigenetic factors		Seizure	Epilepsy
Mutation A + epigenetic factors		Hallucinations	Schizophrenia

Otra cuestión importante es tener en cuenta que **somos organismos integrales**. Cuando hablamos de **enfermedades neurológicas** hay que tener una visión integrada, pues el sistema nervioso en conexión con todos los órganos y por lo tanto hay señales que también influyen al sistema nervioso y en su salud. **Un ejemplo de ello es el microbioma, por ejemplo. Existe un cross-talking entre situaciones microbianas y cerebro.**

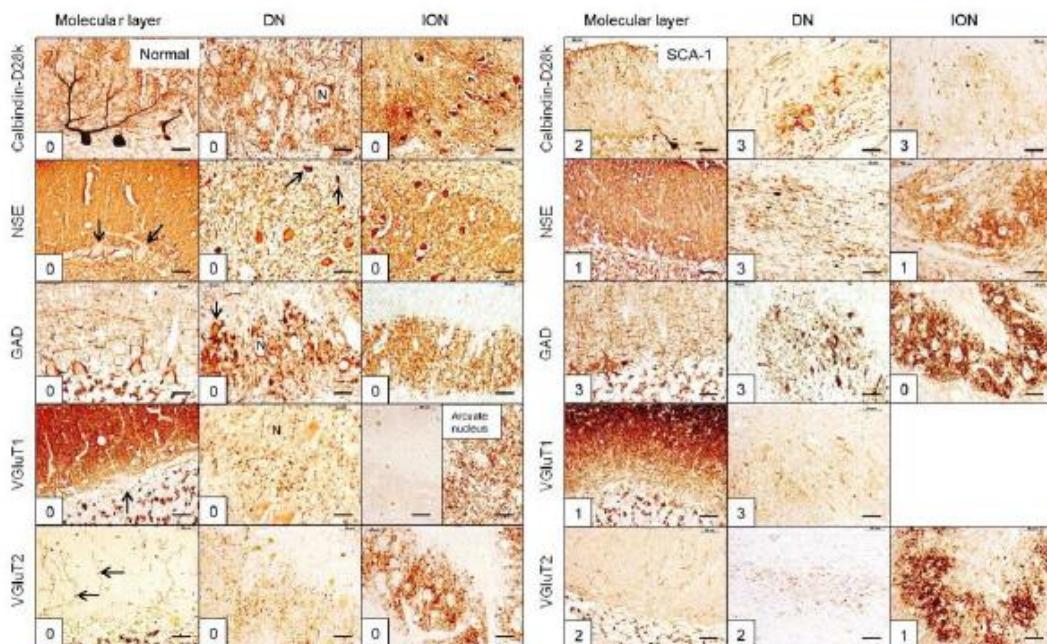
Señales de estrés pueden modificar la composición del microbioma produciéndose alteraciones digestivas. Cambios en la composición del microbioma también mandan señales al sistema nervioso de manera directa o mediada por el sistema inmune.



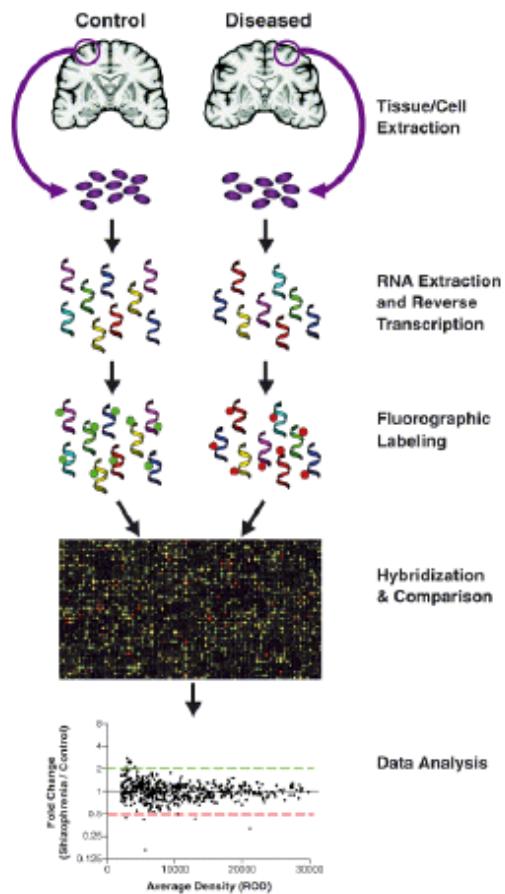
La composición de la microbiota intestinal puede ser así, importante en el desarrollo de trastornos del desarrollo del SN y en enfermedades neurodegenerativas. Cambios en el microbioma pueden contribuir al desarrollo de enfermedades neurológicas.

En cuanto a los métodos de estudio, tenemos:

- Análisis post-mortem del tejido nervioso humano.
 - Modificaciones de la expresión génica por IHC.



- Microscopía electrónica
- Transcriptómica, proteómica y metabolómica



Bases Moleculares de la Patología II

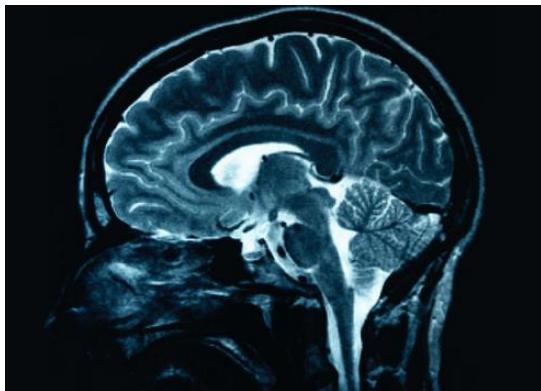
Metodologías para estudiar enfermedades neurológicas – 01-02-2019

Neuroimagen in vivo

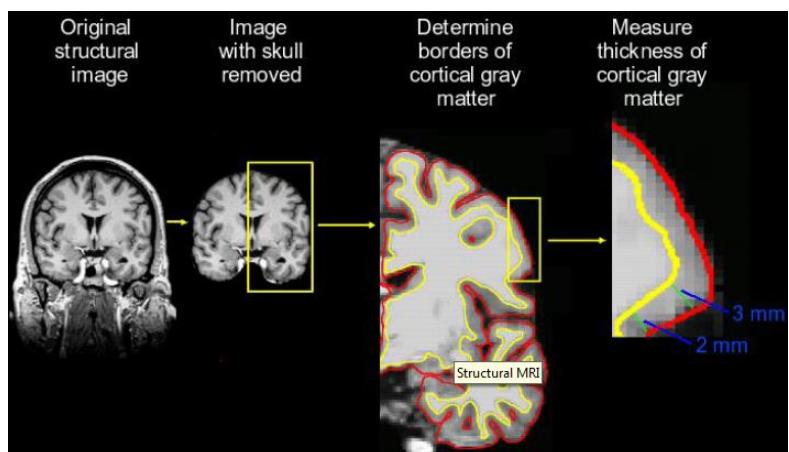
MRI

Resonancia magnética nuclear. Al paciente se le somete a un campo magnético. Nos da una información estructural muy buena, con una buena información estructural **anatómica** del sistema nervioso.

Fijándonos en la **corteza cerebral** podemos incluso medir su **espesor**, dándonos idea del grado de desarrollo. Así, se pueden **cuantificar** toda una serie de parámetros.



Sin embargo, tiene una limitación de resolución. Al fijarnos en la **sustancia gris de la corteza cerebral**, podemos cuantificar su espesor pero somos incapaces de distinguir las distintas capas de neuronas que hay en la corteza cerebral (ni neuronas, ni sinapsis). Podemos ver núcleos, áreas, etc.

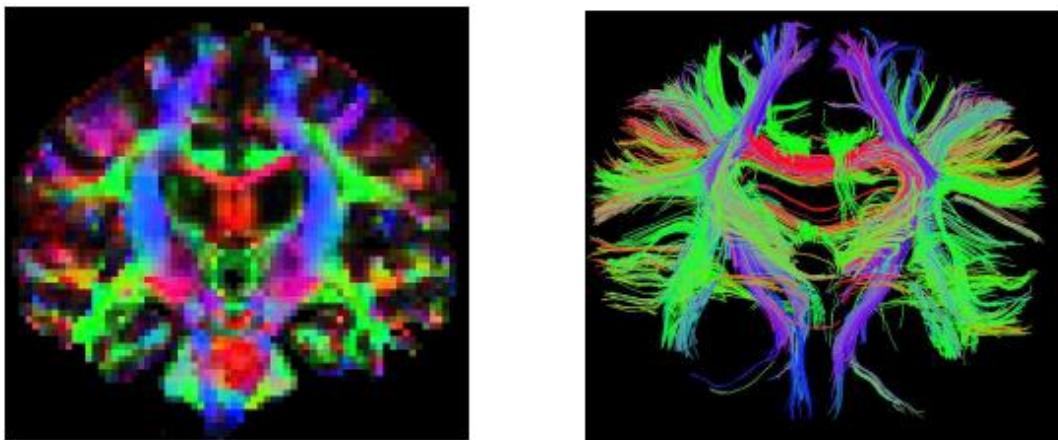


Es una técnica que se usa mucho y que nos permite ver la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo. Existen variantes de esta técnica que nos permiten obtener otro tipo de información.

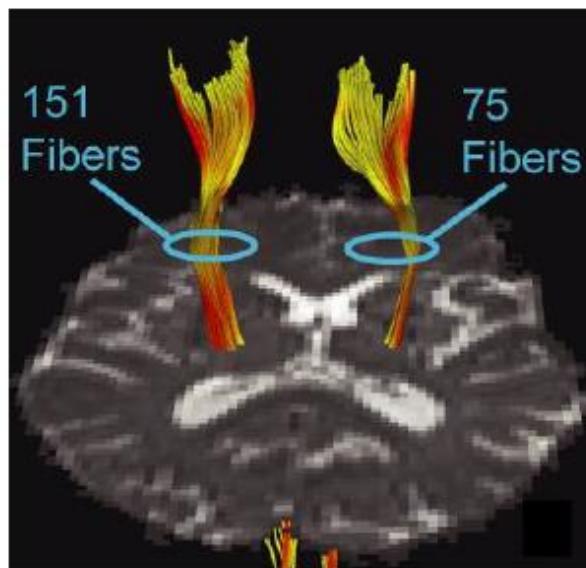
Imagen de tensor difusional (DTI).

Se registra la señal que emiten las moléculas de agua, teniendo una señal diferente dependiendo de su grado de movilidad. Tienen una movilidad muy distinta dependiendo de si se encuentran en un ambiente hidrofílico o hidrofóbico, permitiéndonos ver una diferente movilidad del agua en las zonas de los axones mielinizados.

Así, somos capaces de ver una zona mielinizada. Gracias al procesamiento informático, de las imágenes difusas que obtenemos podemos ver con cierta resolución tractos nerviosos mielinizados.



La interpretación de estas imágenes es complicada y es estudiada por la **conectómica**. Esta técnica también se puede plantear para seguir lesiones traumáticas o procesos que afectan al sistema nervioso.



En un ejemplo, se realiza una **cuantificación entre zonas afectadas o no afectadas por un ictus** del número de fibras mielinizadas (útil cuando no es bilateral).

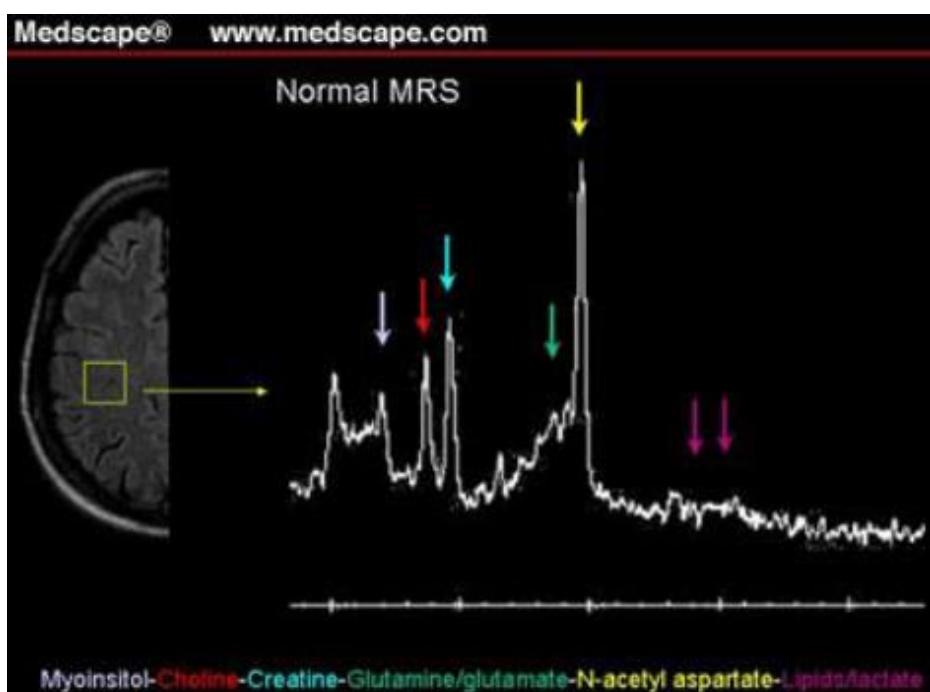
Espectroscopía de resonancia magnética

La señal que vemos en un MRI está constituida por muchas señales. La señal la podemos descomponer en un **espectro de señales** que nos dice qué señal viene de cada frecuencia. Podemos ver muy pocas moléculas como **picos separados**, debido a que la gran mayoría de las moléculas están en un gran pico no enseñado.

Las moléculas cuyos picos podemos discernir, serían:

- **Myoinositol.**
- **Colina**
- **Creatina**
- **Glutamina/glutamato**
- **N-acetil-aspartato.** Está implicado con la mielinización y es un buen marcador de la salud neuronal. Se termina viendo una disminución del pico en enfermedades neurodegenerativas.
- **Lipidos o lactato.** El pico del lactato casi no se ve, debido a que los astrocitos son capaces de producir la glucosa en piruvato, lactato y se lo pasan a las neuronas para que las active en las neuronas.

Si en un paciente observamos un pico de lactato, nos indica, con frecuencia, una **disfunción mitocondrial** (el lactato no está siendo metabolizado de una manera normal). Esto permite darnos una idea del perfil metabólico de un paciente in vivo.



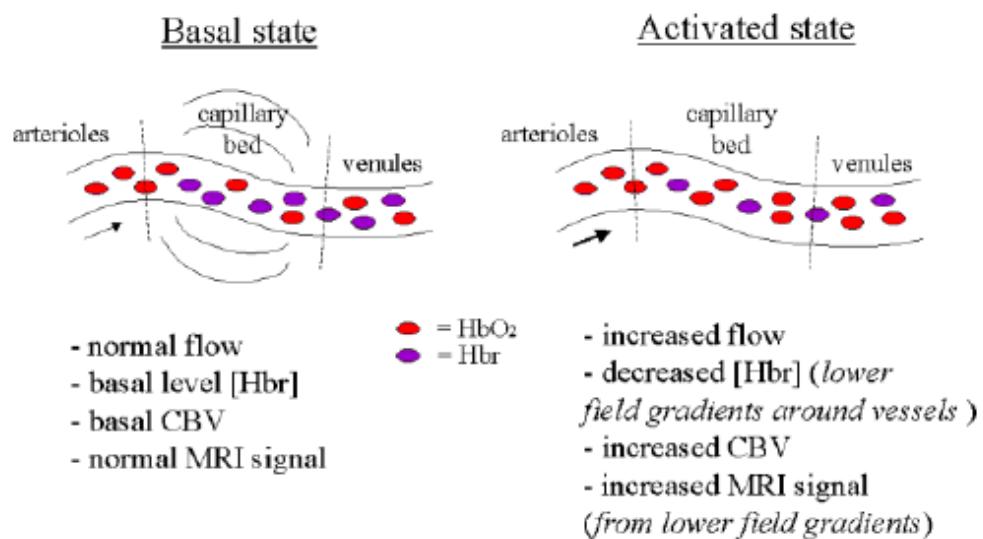
Usando esta técnica, se han **identificado disfunciones mitocondriales, del metabolismo con fosfolípidos en áreas concretas del sistema nervioso in vivo.**

Imagen de resonancia magnética funcional

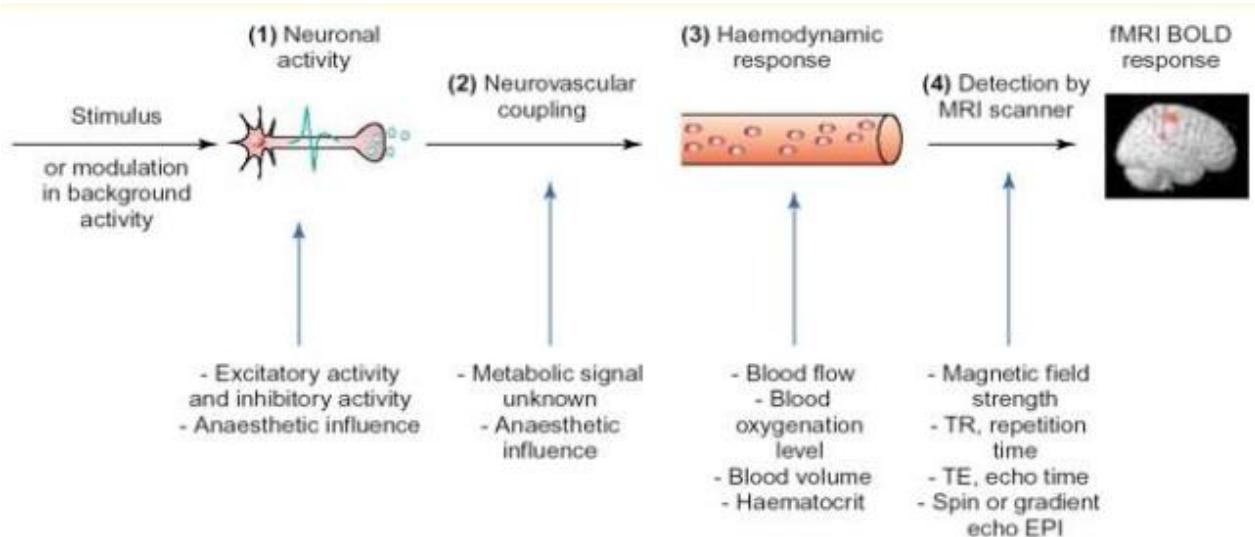
Esta técnica está dirigida a obtener información sobre la **actividad del sistema nervioso**. Es muy importante ver la anatomía del sistema nervioso, pero mucho más ver cómo funcionan las distintas áreas del sistema nervioso.

La **fMRI se basa en la detección de la señal de la hemoglobina**. La hemoglobina es una proteína de la sangre, que puede estar oxigenada o desoxigenada. La imagen de resonancia magnética funcional es diferente dependiendo de la situación de oxigenación de la hemoglobina.

En los capilares, tenemos una señal X que se corresponde a la cantidad de hemoglobina oxigenada que tengan esos capilares. **Cuando se activa una región del sistema nervioso se incrementa el flujo sanguíneo en los capilares. Así, disminuye la hemoglobina desoxigenada** porque aumenta la oxigenada y aumenta la señal de fMRI.

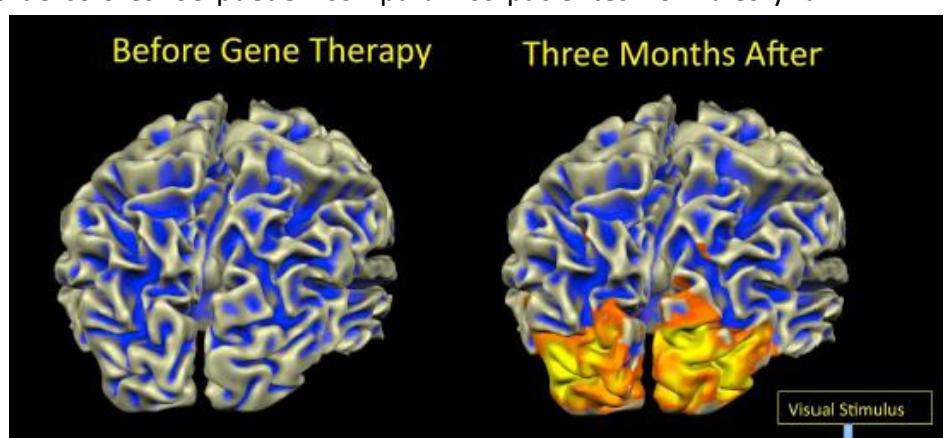


El efecto hemodinámico gobierna este efecto. La liberación de neurotransmisores excitadores en la hendidura sináptica es recaptado por los astrocitos. Eso, produce en los astrocitos la liberación de una serie de liberación de metabolitos en los vasos sanguíneos (derivados del ácido araquidónico, por ejemplo). Dichos metabolitos influyen en las células endoteliales disparando el incremento de la respuesta hemodinámica.



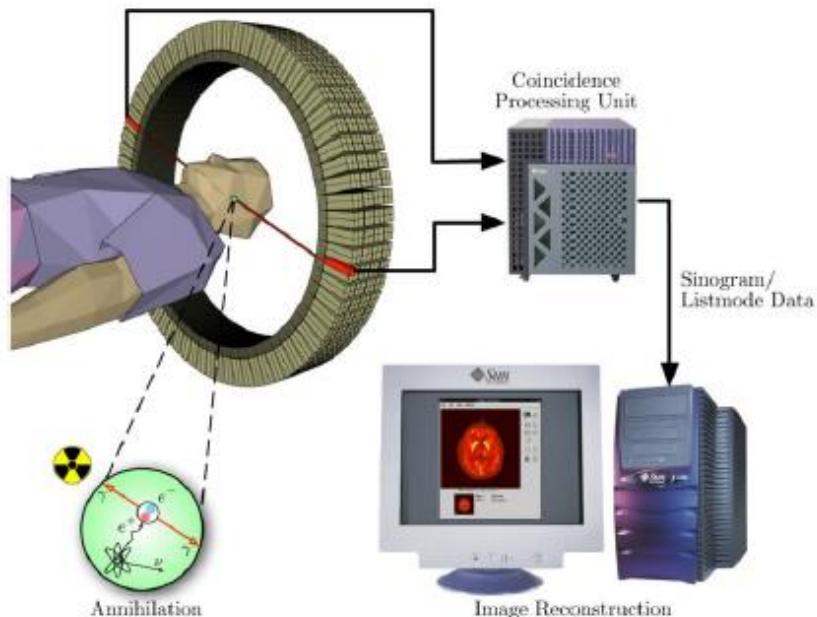
Se suelen visualizar con un código de colores. Se pueden comparar los pacientes normales y la afectación con un ictus, por ejemplo.

Nos permite **cuantificar la actividad de una enfermedad a lo largo de su historia**. Además, nos permite **medir la eficacia de una intervención terapéutica**. En el ejemplo, **reconstitución de la visualización por medio de terapia génica**.



Tomografía de emisión de positrones

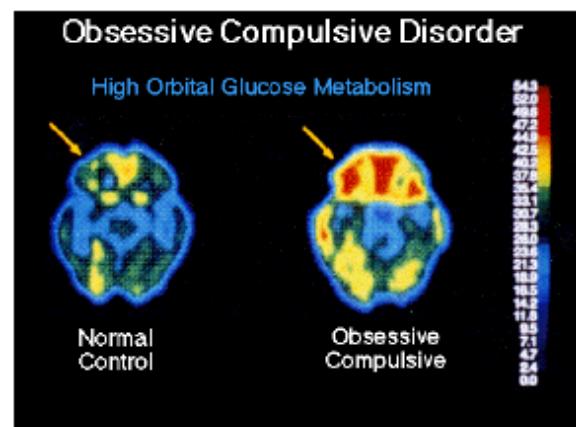
Más invasiva. Se basa en **registrar la señal producida por positrones**. Se usan moléculas como la **fluorodeoxiglucosa**, un análogo no metabolizable de la glucosa, marcado. La actividad neuronal produce un incremento en la captación de glucosa y en el metabolismo de glucosa.



Si suministramos a un paciente **fluorodesoxiglucosa** y vemos la **señal de positrones**, vemos más señal en las **áreas del sistema nervioso con más actividad**. Esto es una medida indirecta del metabolismo de glucosa, podemos ver así la activación de las zonas.

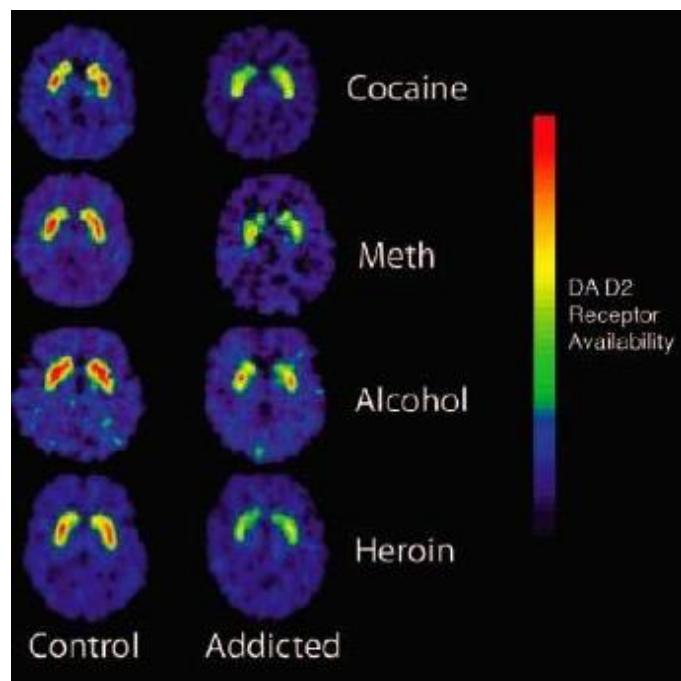
En pacientes con **trastornos obsesivos compulsivos** hay **áreas con hipermetabolismo**, por ejemplo. Como **inconvenientes**, es su **invasividad**. Nos da un **parámetro**, sin embargo, **molecularmente definido**.

Tiene la **ventaja** de que no solo podemos utilizar **fluorodesoxiglucosa**, sino cualquier molécula marcada con un radioisótopo que emite positrones. Esto nos permite, realmente, **visualizar muchas cosas en el SNC de un paciente mientras está vivo**.



Utilizando **agonistas que se puedan marcar con un radioisótopo**, se puede ver fácilmente. Para cualquier ligando de cualquier proteína podemos obtener un derivado de un radioisótopo que emita positrones.

Por ejemplo, se puede ver la distribución de receptores de dopamina D2 en condición patológica (**adicción**) y control. Es una técnica invasiva, pero nos permite medir cosas que no podríamos medir *in vivo* con ninguna otra técnica.



Electroencefalografía

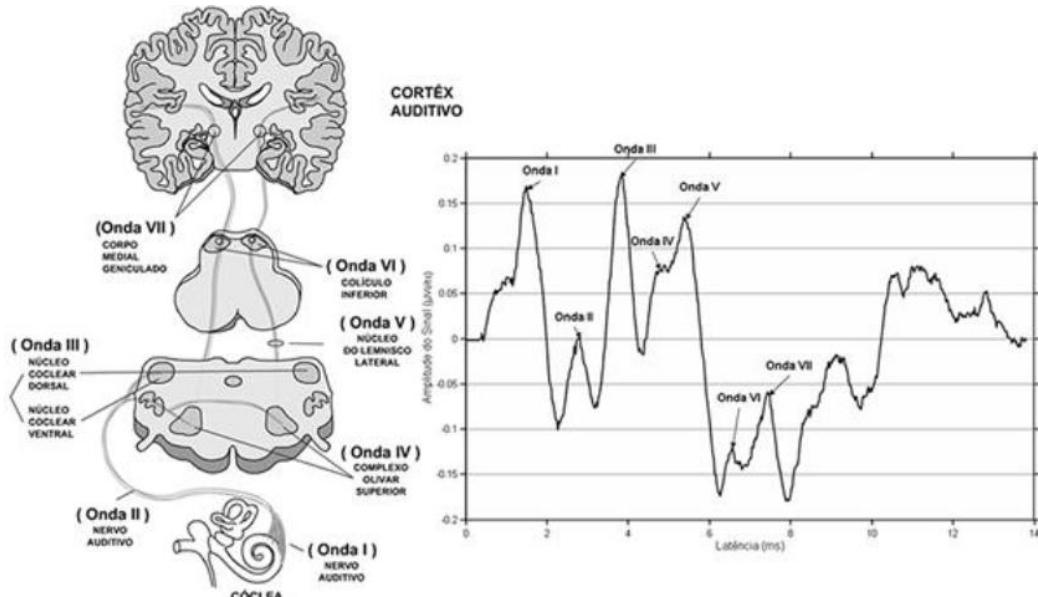
Dirigidas a medir la actividad neuronal de una manera más directa. Se mide la actividad eléctrica de las neuronas.

Las técnicas de electroencefalografía ponen electrodos al paciente y medimos la actividad eléctrica que llegan a través del cráneo, meninges, piel y pelo. Esto nos da un **electroencefalograma**, que es la media de toda la actividad eléctrica de la corteza cerebral que somos capaces de detectar.

Nos proporciona **muy poca información, muy básica**. Si el EEG es plano, no hay actividad en la corteza cerebral.

El registro de potenciales evocados nos da más información. Es un electroencefalograma en el que mide las diferencias del sujeto en reposo y tras recibir un estímulo.

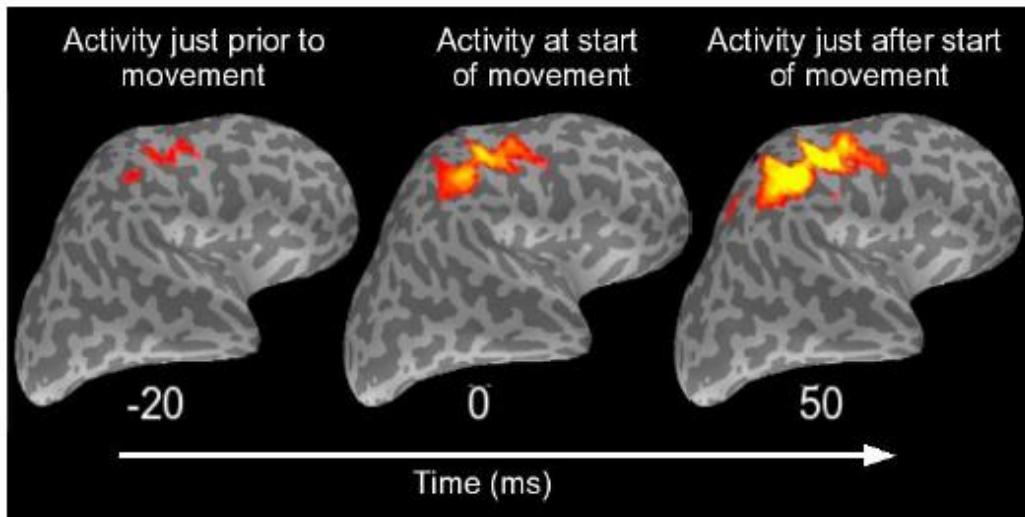
En respuesta a un sonido, por ejemplo, hay como **7 u 8 ondas**. Cada onda corresponde a la estimulación de una estructura distinta. En respuesta a un sonido registramos ondas que se corresponden con las distintas estaciones de la vía auditiva. Sabiendo qué ondas aparecen y cuáles no, podríamos saber a qué se debe una hipoacusia no mecánica.



Magnetoencefalografía

La magnetoencefalografía mide lo mismo, pues **toda corriente eléctrica tiene asociada un campo magnético perpendicular**. En la magnetoencefalografía, el aparato detecta el campo magnético y procesa en respuesta a estímulos la actividad neuronal.

Su gran ventaja es que nos permite ver la actividad neuronal con una gran resolución temporal. Estamos viendo directamente actividad eléctrica. La **resolución**, sin embargo, es bastante mala.



Su mayor inconveniente es el coste del aparato, no estando en el uso clínico habitual.

Algunos magnetoencefalógrafos nos permiten registrar actividad eléctrica cerebral en respuesta a muchas más actividades del paciente debido a que son portátiles.



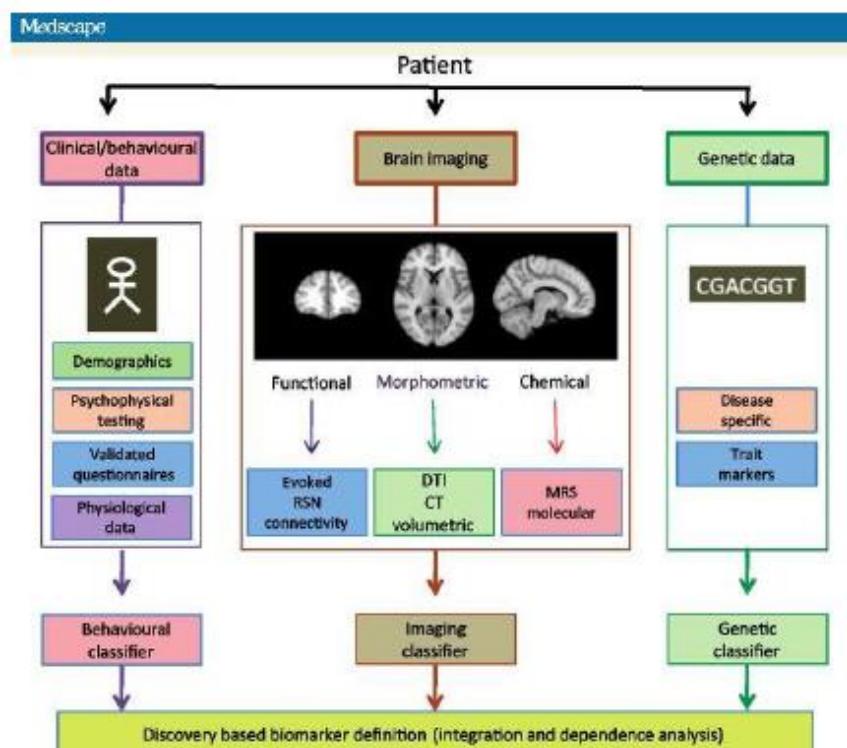
Tenemos tecnologías que nos permiten estudiar neuronas, dendritas y sinapsis, pero no in vivo.

Cómo manejar un paciente con una información neurológica

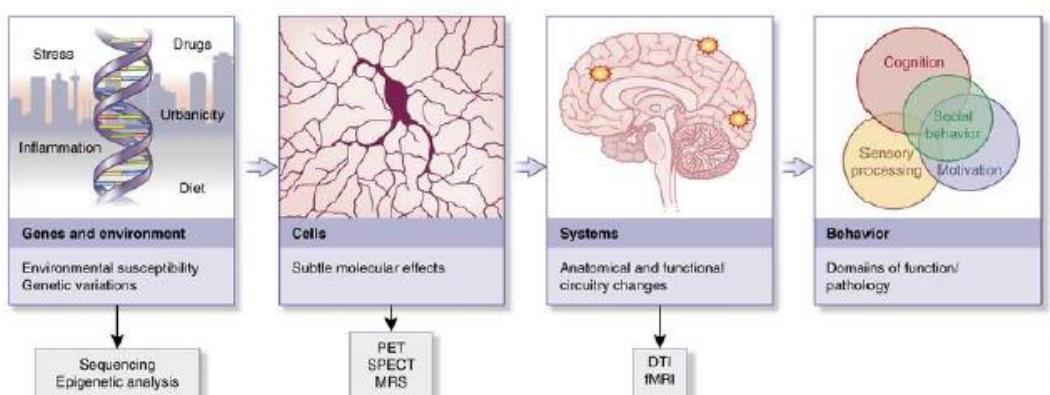
- Evaluación clínica.
- Técnicas de neuroimagen.
 - Las técnicas que hemos visto nos permite hacer un análisis funcional, morfométricas y químicas.
- Técnicas genéticas.
 - Secuenciación de genoma completo o de exoma completo, por ejemplo.

Sin embargo, muchas enfermedades neurológicas tienen síntomas mucho más tarde que cuando comienza el avance de la enfermedad. Cuando obtenemos los datos de un paciente, no estamos al comienzo de su enfermedad, sino que hay toda una fase anterior que no hemos sido capaces de detectar.

Muchas enfermedades neurológicas se caracterizan por una fase prodrómica o asintomática de la enfermedad.



The search for genetic & imaging biomarkers in neuropsychiatric disorders



Bases Moleculares de la Patología II

Modelos de patología neuronal – 04-02-2019

Existen **dos grandes tipos de modelos experimentales**

- **Modelos celulares.** Tratan de **reproducir la enfermedad en una placa de cultivo.** La enfermedad en la gran mayoría de las veces, sólo puede ser reproducible en algunos procesos específicos.
Se **pueden usar células de pacientes o células de animales modificadas genéticamente.** Son muy fáciles de manejar y se pueden realizar muchos estudios a nivel molecular, **dándonos gran cantidad de información sobre los mecanismos de patogénesis de la enfermedad.**
- **Modelos animales.** Animales tratados con un fármaco o animales modificados genéticamente. Son más difíciles de obtener y manejar que los cultivos celulares. Son más complicados. Sin embargo, como gran ventaja, nos permiten **estudiar los síntomas clínicos y la conducta de un animal.** Por ello, son muy relevantes desde el punto de vista fisiopatológico.

Modelos celulares

Podemos tener **células derivadas de paciente o modificadas genéticamente.**

- **Pacientes.** Llevan las mutaciones **responsables de la enfermedad.** Principalmente, está limitado a tejidos accesibles como la sangre, la piel y la mucosa olfativa. Reprogramación celular.
- **Modificadas genéticamente.** En cultivos primarios o líneas celulares. Pueden modificarse con la mutación.

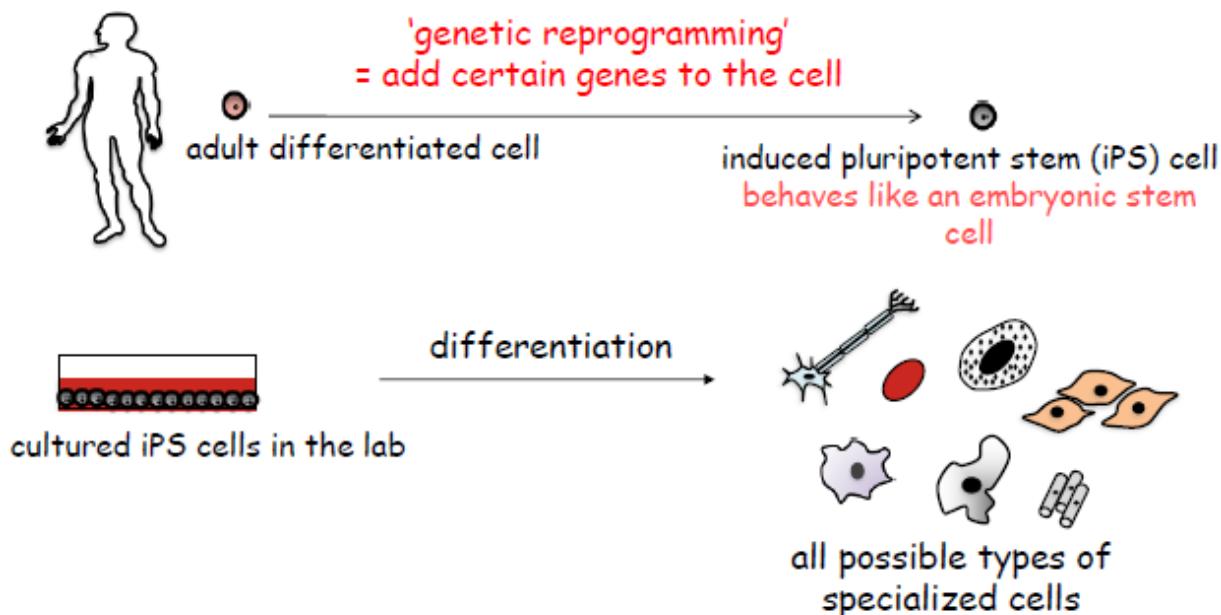
Células derivadas de pacientes

Dos estrategias para conseguir células del sistema nervioso. **Para obtener neuronas o células de glía del paciente, las obtendremos por reprogramación.**

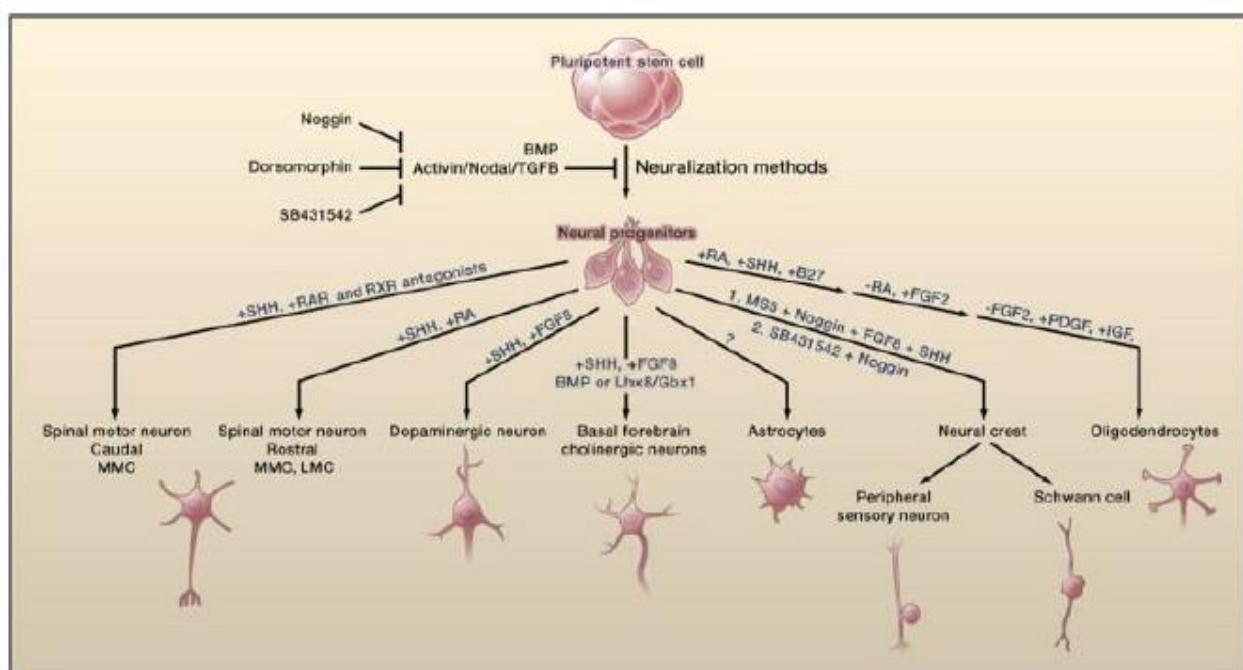
- **Células iPS.** Células pluripotentes inducidas.
- **Células iN.** Células neurales inducidas. Reprogramación directa a **células del sistema nervioso.**

Células iPS

Las células iPS se obtienen por reprogramación genética con los factores OSKM. Una vez que se tiene un cultivo de células iPS en el laboratorio, se puede diferenciar a cualquier tipo de célula diferenciada del organismo.

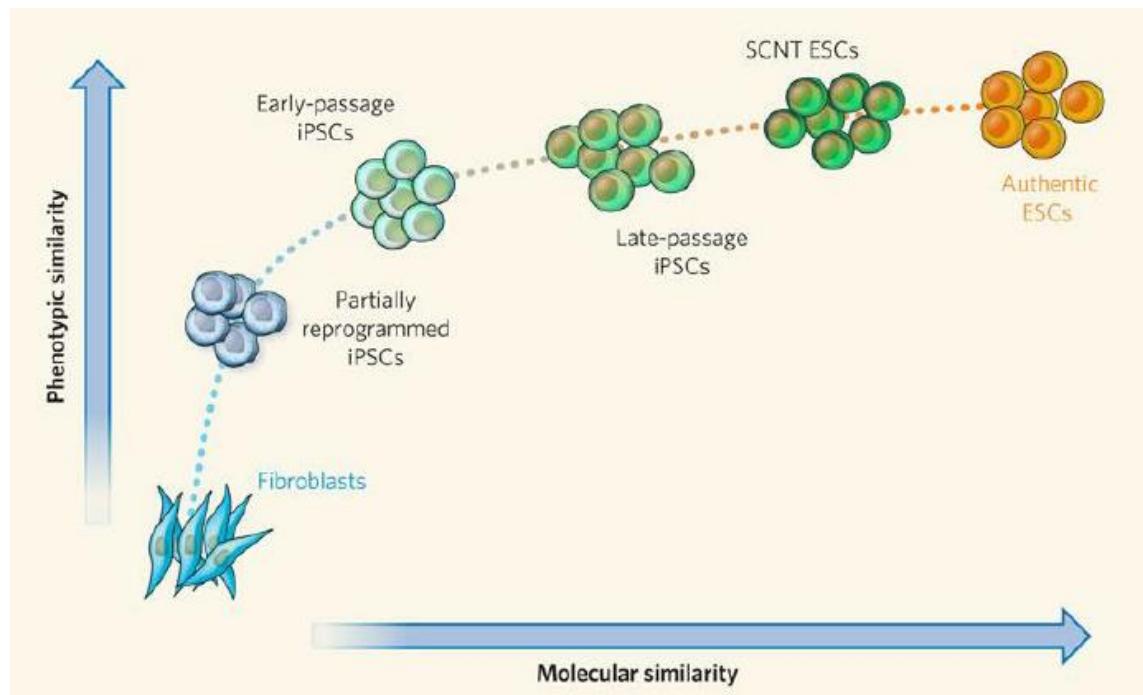


Las condiciones de diferenciación de las células iPS están bastante bien estudiadas. Dichas células pluripotentes se pondrán a diferenciar a distintos tipos de neuronas mediante la adición de distintos factores al medio de cultivo.

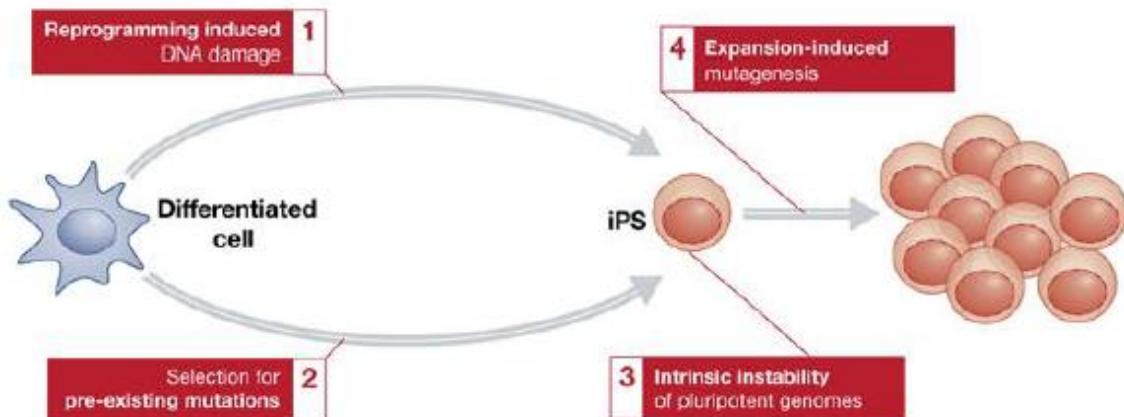


Así, a partir de células iPS podemos obtener cualquier tipo celular del sistema nervioso. Las células iPS son una herramienta muy útil, pero tiene **sus inconvenientes**.

- Las células iPS son **fenotípicamente muy parecidas a células embrionarias**. Cuando se hacen estudios de similitud molecular más detallados, uno se da cuenta de que las células morfológicamente parecidas a las células embrionarias, a nivel molecular no lo son tanto. **Esto es debido a que el proceso de reprogramación no es siempre perfecto.**



- Distintas células iPS, durante la reprogramación unas se reprograman mejor y otras peor. Cuando tenemos células iPS, cada clon de células podría ser diferente.
- Existe bastante inestabilidad genómica en estas iPS, por lo que se podrían introducir mutaciones que no estaban en las células del paciente. Esto exige el uso de controles.



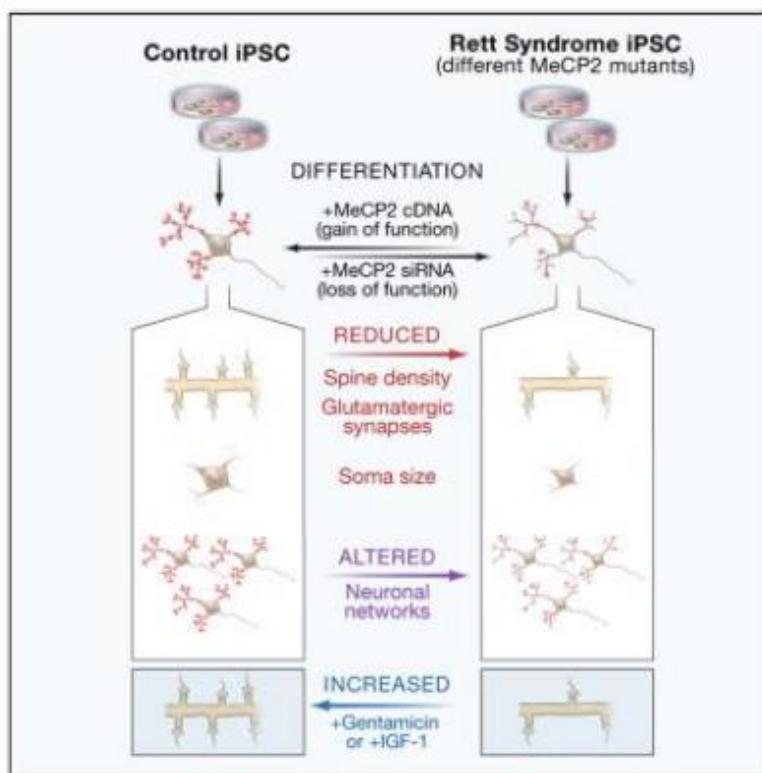
A partir de un paciente se obtiene una biopsia de piel, que se reprograman a iPS y se diferencian a neuronas. Si expresan un fenotipo asociado a la enfermedad se podría hacer un screening de posibles fármacos que podrían ser útiles en el tratamiento del paciente.

Modelo celular del síndrome de Rett

Forma patológica rara del autismo. Se intenta reproducir algunos de los procesos asociados al autismo. A partir de pacientes con síndromes de Rett, se reprograman a células iPS y se diferenciaron a neuronas glutamatérgicas.

Se usan **distintas líneas de células iPS**. El síndrome de Rett se debe a mutaciones en MeCP2. Se usaron células de distintos pacientes con distintas mutaciones en el gen.

Lo que se observa es que en las células derivadas de paciente, **en todas**, había una **menor densidad de espinas dendríticas, una menor densidad de sinapsis y el tamaño de las neuronas era más pequeño que el tamaño de las neuronas normales**. Esto podría llegar a hacernos pensar que podría haber una atrofia en el desarrollo neuronal.

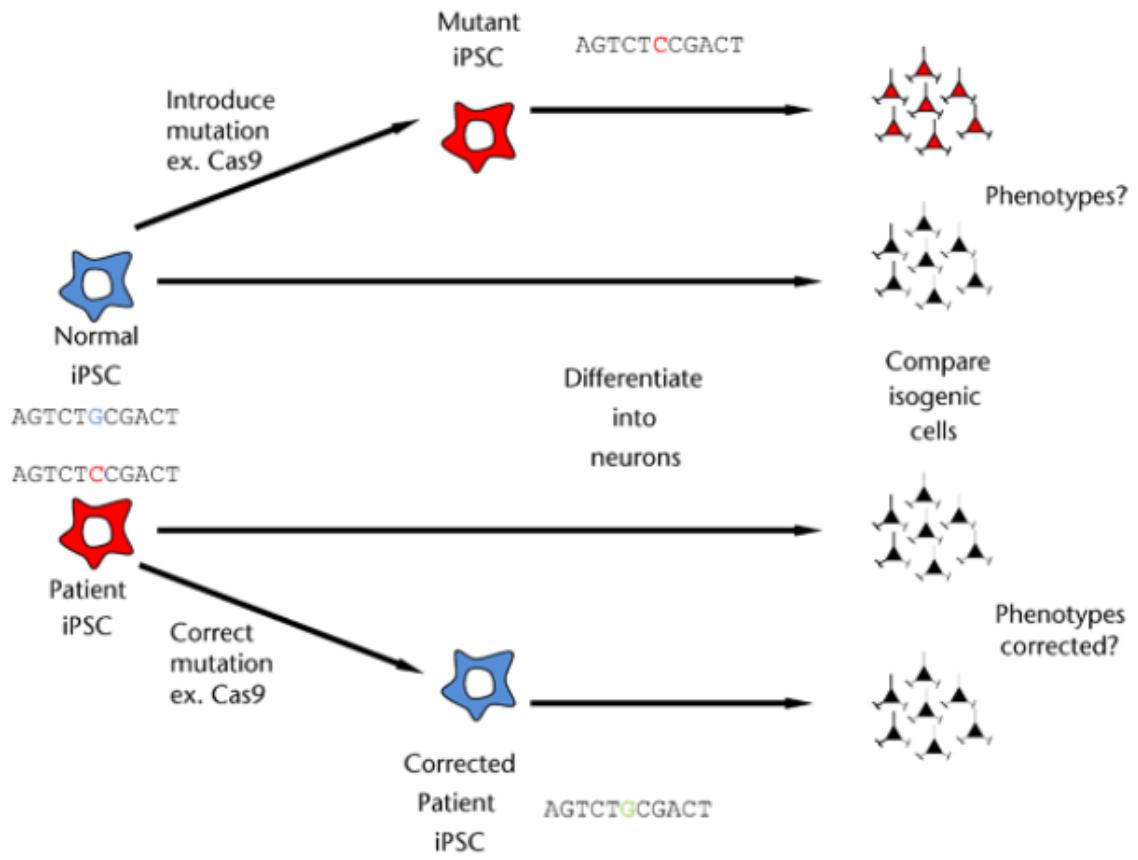


Las neuronas de pacientes intentaron **rescatarlas con el cDNA de MeCP2**. Observaron que cuando introducían el gen MeCP2, aumentaban los parámetros que anteriormente estaban disminuidos. Y por otro lado, **introdujeron siRNA contra MeCP2 en las células control, lo que inducía el fenotipo patológico**.

Nos hace pensar que puede que haya un defecto de la formación de espinas dendríticas **in vivo**.

Haciendo un screening de moléculas, encontraron que el fenotipo enfermo se podía rescatar por IGF-1 o gentamicina.

En el experimento ideal, se debería hacer un experimento cruzado de corrección de la patología en células de paciente e inducción de la misma en células de controles.

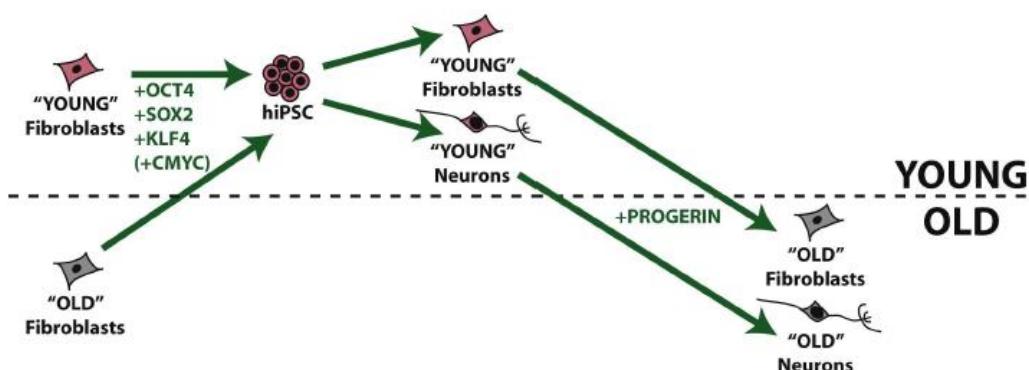


Modelo de la enfermedad de Parkinson

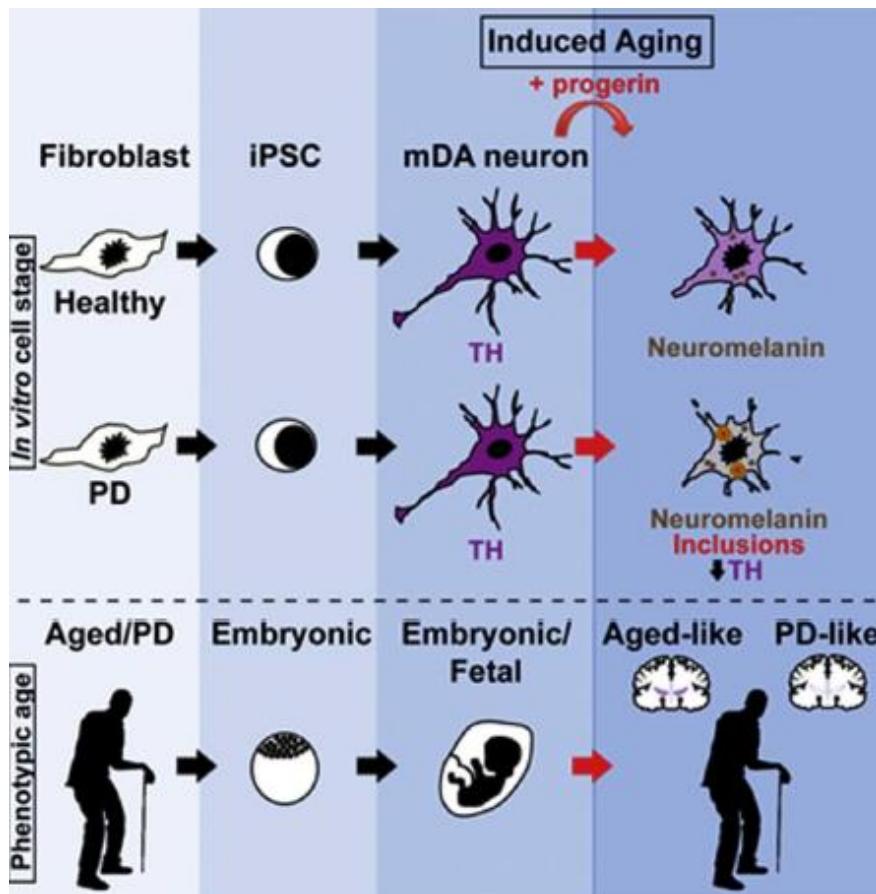
Una de las limitaciones más importantes de la iPSC es que durante la reprogramación se eliminan muchas marcas epigenéticas, entre ellas, las asociadas al **envejecimiento celular**. Cuando reprogramamos el fibroblasto, las células quedan “rejuvenecidas”. Esto plantea que desde células iPS, siempre vamos a obtener **neuronas jóvenes**.

Algunas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas están asociadas al envejecimiento. Es muy difícil observar un fenotipo de una enfermedad asociada al envejecimiento en neurona joven.

Para resolver este problema, se ha intentado hacer un **envejecimiento in vitro acelerado**. Uno de los trucos utilizados es el uso de **la introducción de cDNA de la progerina**, una enfermedad asociada a la progeria, envejecimiento rápido y prematuro. Dicho procedimiento funciona. Esto ha permitido modelizar in vitro algunos aspectos de la enfermedad de Parkinson.



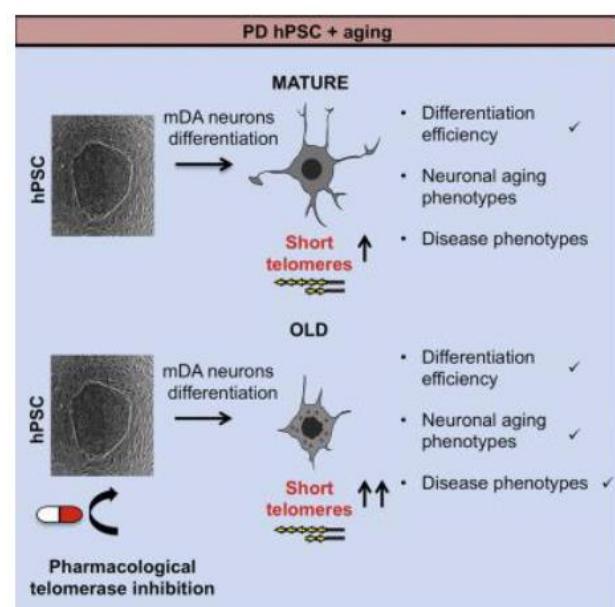
Mediante diferenciación a neuronas dopamínergicas, se obtienen neuronas jóvenes tanto las derivadas de sujetos sanos como Parkinson. Ambas tienen niveles suficientes de tiroxina hidroxilasa.



A continuación, añadieron **progerina con las mutaciones asociadas a progeria**. Observaron que en las neuronas asociadas a progeria se produjo **neuromelanina en las neuronas control**. En pacientes con la enfermedad de Parkinson, sus neuronas tenían **neuromelanina y agregados de proteína (α -sinucleína, uno de los marcadores de la enfermedad de Parkinson)**, junto con una disminución de la expresión de **tirosin hidroxilasa**.

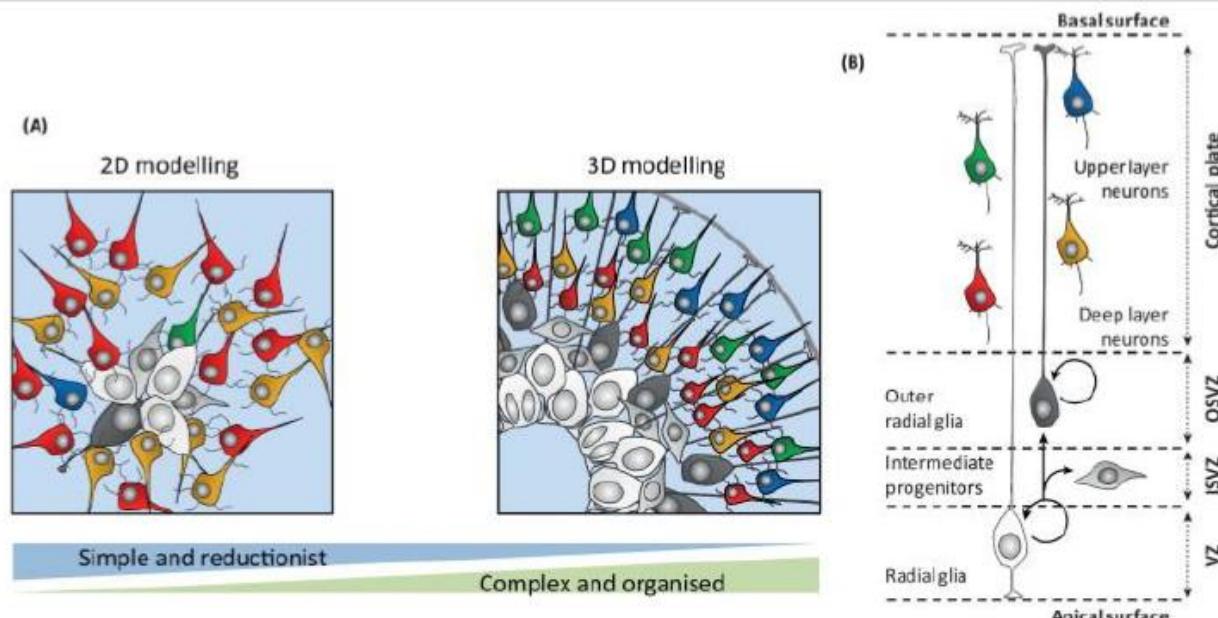
Con este envejecimiento inducido, así, tendremos un buen modelo de los procesos asociados a la enfermedad.

El problema de este truco, es que el envejecimiento inducido es **artefactual**. El envejecimiento natural no es el mismo que se produce durante la progeria. Se está trabajando en envejecer neuronas de manera más fisiológica. **El uso de inhibidores de telomerasa, inducen neuronas viejas.**



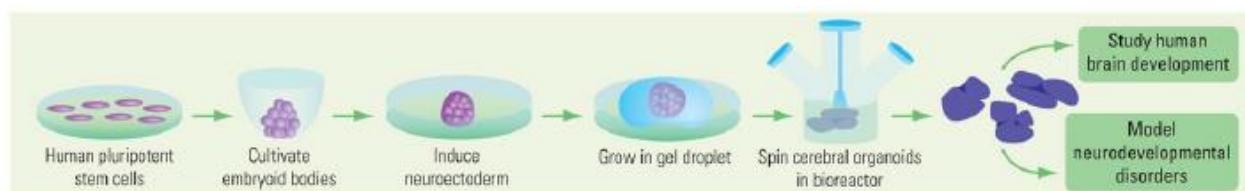
Importancia de la organización tridimensional de las células.

Las células van a estar conectadas de una manera muy diferente en una placa en dos dimensiones, mientras que *in vivo* van a tener una organización en capas con distintos patrones de conexión.



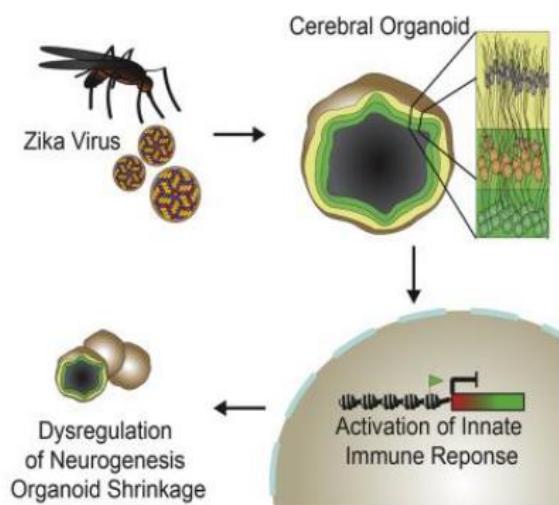
Se han desarrollado sistemas con **organoides**: agregados celulares que se diferencian en algo parecido a un órgano.

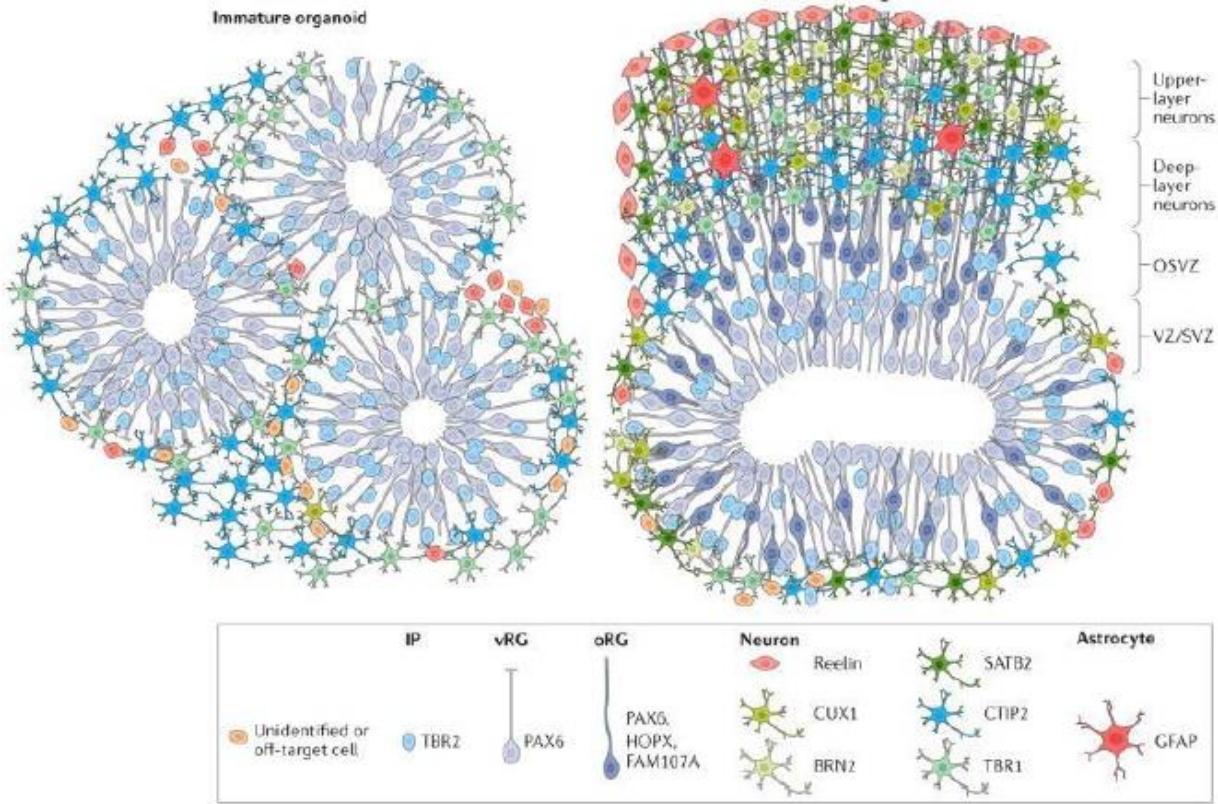
Se cultivan células pluripotentes en suspensión, formando cuerpos embrioides. Se tratan con una serie de factores que hacen que se convierten en células del neuroectodermo (con ácido retinoico, por ejemplo). Se cultivan los agregados en una serie de medios, obteniendo unos agregados a lo que podría ser un cerebro, en gotas de gel.



Se obtienen agregados de formas variadas. En el centro se encuentran **células madre neurales y en la periferia neuronas diferenciadas dispuestas en capas**. Como ventaja, tienen que las neuronas están dispuestas en capas donde van a formar conexiones sinápticas de una manera más parecida a como están *in vivo*, **reflejando algo parecido a un cerebro en desarrollo**. Se pueden usar para hacer modelos en distintas patologías.

Son útiles para estudiar trastornos del desarrollo cerebral, importantes para saber cómo el virus del Zika producía microcefalia. Se observa en los organoides un tamaño más pequeño cuando son infectados con el virus. Hay menor proliferación de precursores neuronales y apoptosis de neuronas. Estudiándolos a nivel molecular, se han visto una serie de genes que podrían ser responsables de estos procesos, que se expresan en respuesta al virus Zika.

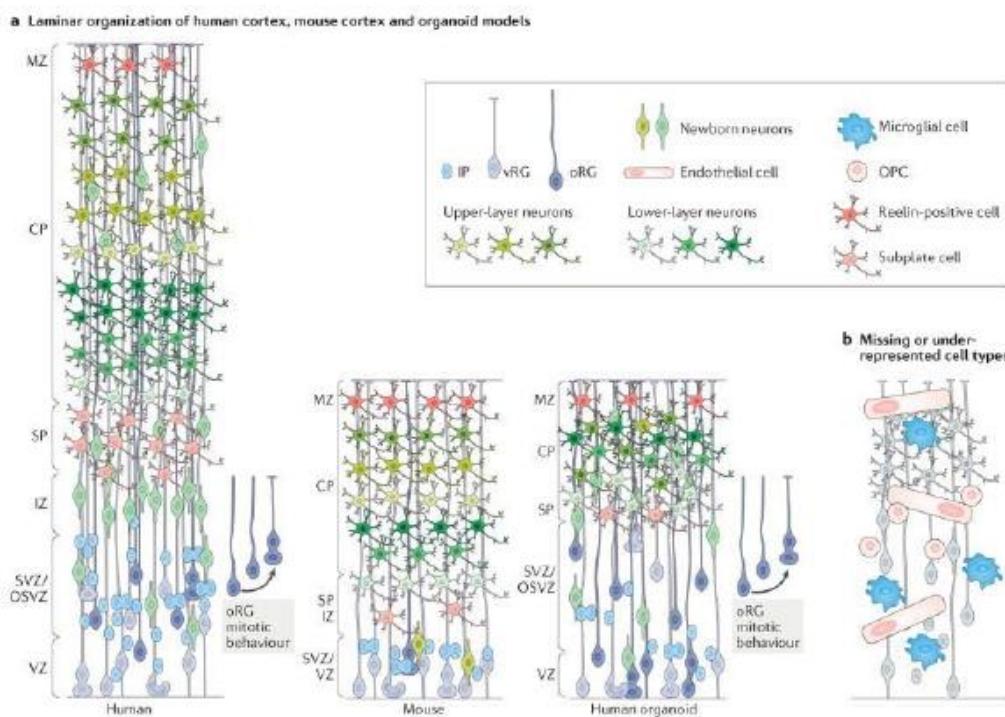




Los **organoides actuales** van organizándose en distintas capas de neuronas conforme van madurando. Parece que habría una cierta similitud con la corteza cerebral del ratón, pero con menos organización.

En el organoide hay tipos celulares ausentes o muy poco representados:

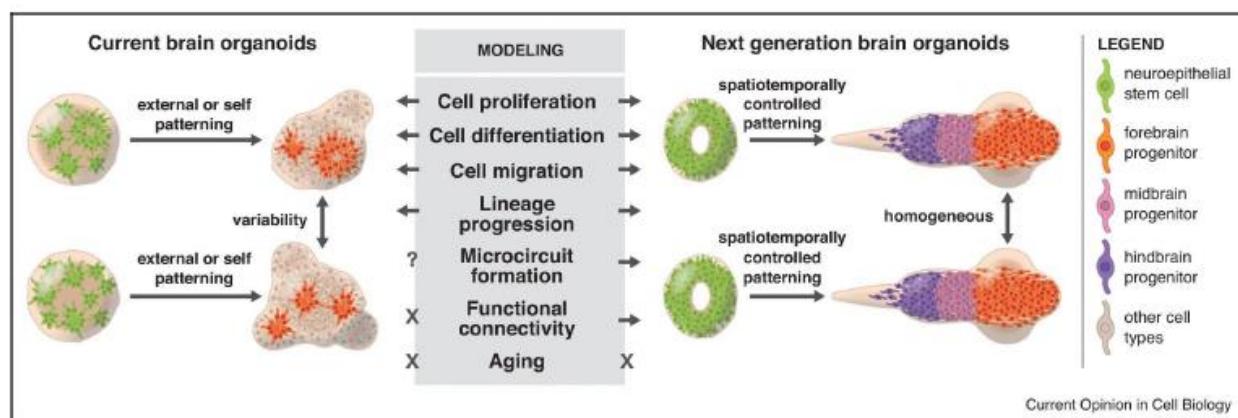
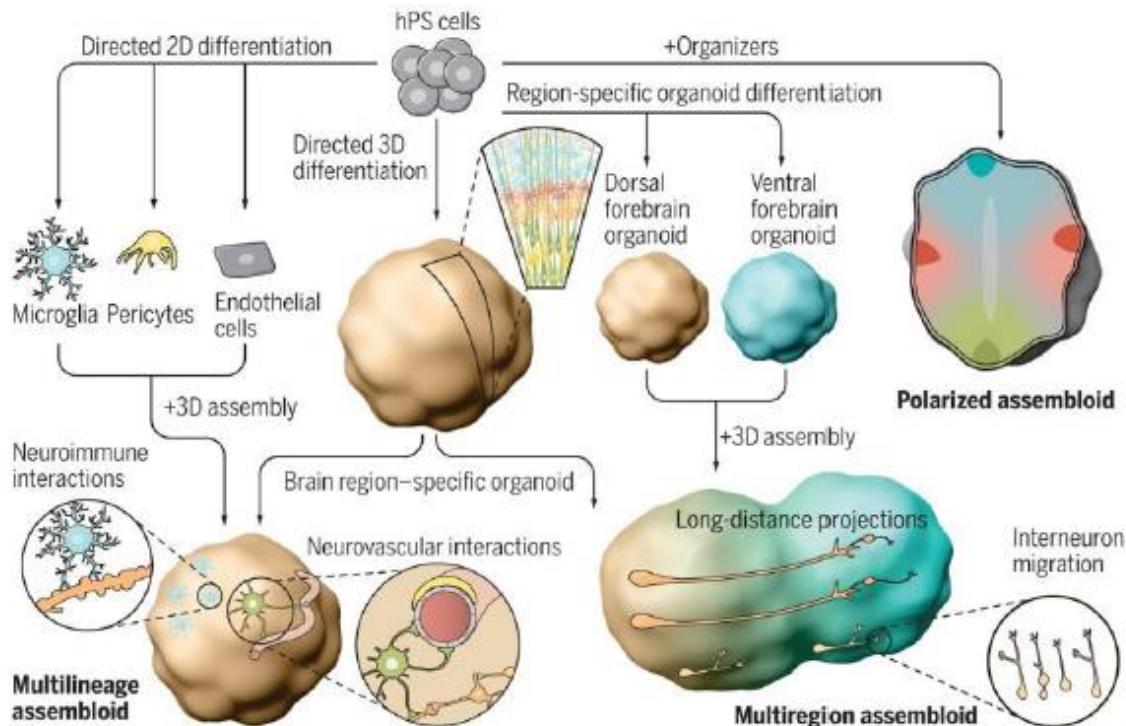
- Pocos oligodendrocitos, por lo cual no va a haber prácticamente axones mielinizados
- No hay células de microglía. Son los macrófagos del sistema nervioso, pudiendo contribuir.
- No tenemos células endoteliales ni pericitos.



Además, en un cerebro real, hay una especialización zonal. En los organoides, no hay una polarización clara, estando muy lejos de obtener un cerebro *in vitro*.

Se está intentando añadir a los organoides dichas células que faltan, introduciendo organoides que ya tengan estos tipos, para ver si se forman estructuras iguales.

Si hay organoides con distintas polarizaciones, podemos fusionarlos para ir obteniendo organoides más complicados que se vayan pareciendo más a un cerebro.



Células iN

Reprogramación directa, mediante neuronas inducidas o astrocitos inducidos de manera directa.
Se reprograman fibroblastos de piel humana para convertirlos directamente en neuronas o astrocitos.

Bases Moleculares de la Patología

Modelos de enfermedades neurológicas – 05-02-2019

iNs

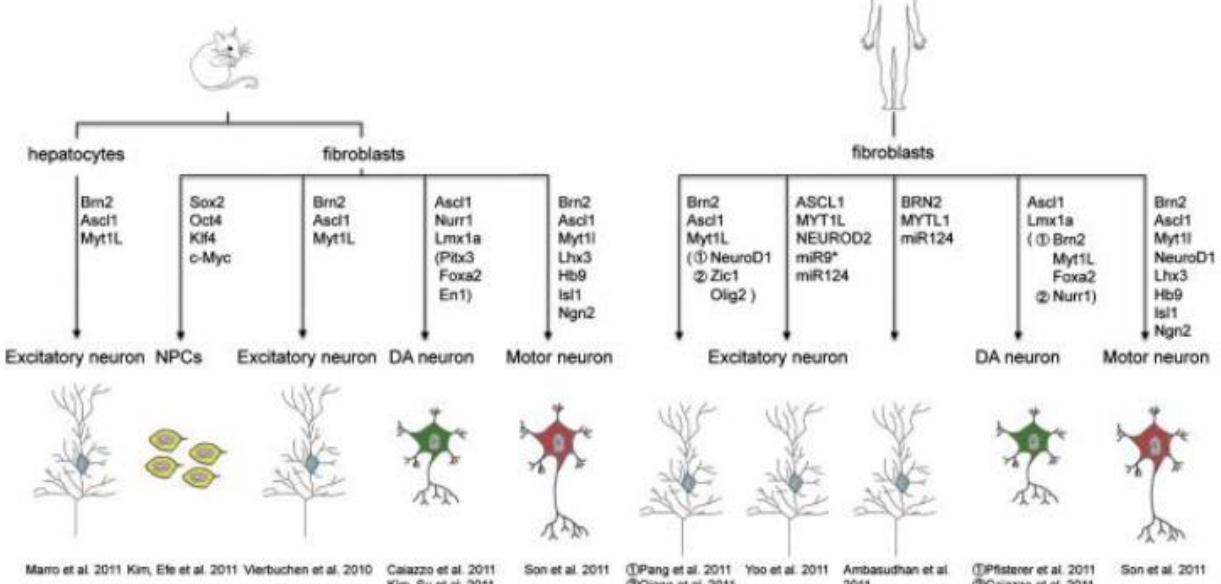
Se puede realizar mediante

- Factores de transcripción
- micro-RNAs
- Combinación de factores de transcripción y micro-RNAs

Dependiendo de los distintos tipos de factores de transcripción usados, se pueden obtener distintos tipos de neuronas. También se pueden obtener **astrocitos y oligodendroцитos**.

Una cuestión importante del proceso es que es una **reprogramación directa**. No se produce un paso intermedio por un estado plástico de stemness. Se ha demostrado que no hay expresión de factores de pluripotencia en ningún momento el proceso.

Así, se disminuye la expresión de los genes típicos de fibroblastos y aumenta la expresión de los genes típicos de neuronas.



Las células obtenidas corresponden con neuronas.

- Presentan la morfología neuronal
- Expresan marcadores típicos de las neuronas
- Presentan una polarización celular, con axones y dendritas.
- Desarrollan un potencial de membrana estable
- Son capaces de generar potenciales de acción
- Se expresan receptores funcionales de neurotransmisores

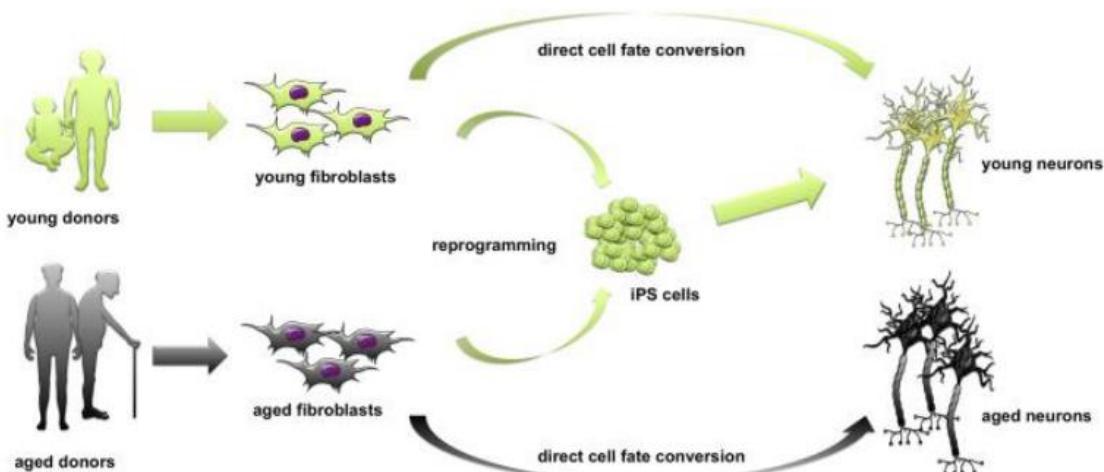
Lo que no está claro es hasta qué punto maduran las neuronas

- En algunos laboratorios se ha visto que las neuronas tienen funciones pre y post-sinápticas. También tienen una plasticidad sináptica.

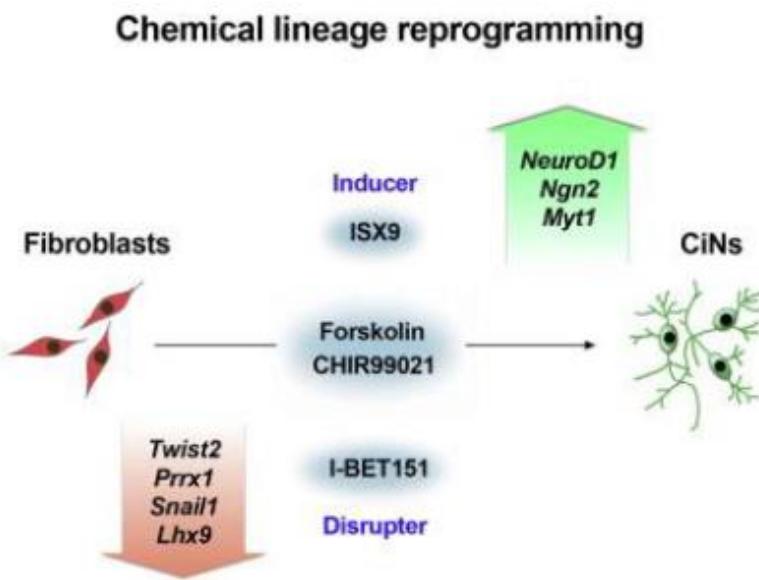
Property	Specific criteria	Degree of reprogramming
Characteristic neuronal morphology	Complex dendritic arborization	
Expression of multiple pan-neuronal markers	Tuj1, MAP2, NeuN, Tau, Synapsin	
Cell polarization	Distinction of axons and dendrites	
Development of a stable resting membrane potential	-50 mV ~ -70 mV	
Generation of a single action potential upon current injection	Stereotypic membrane voltage response in current-clamp recording mode	Partially reprogrammed iN cells, immature iN cells
Spontaneous or evoked repetitive action potentials		
Expression of functional NT receptors	Membrane current in response to NT receptor agonist	
Postsynaptic function	Spontaneous and evoked PSCs in coculture with primary neurons	
Presynaptic function	PSCs in pure iN culture Paired recording	
Synaptic plasticity	Short term facilitation/ depression	Fully reprogrammed iN cells, mature iN cells

Abbreviations: NT neurotransmitter, MAP2 microtubule associated protein 2

Otra característica importante en la reprogramación directa es que no se eliminan todos los marcadores epigenéticos relacionados con el envejecimiento. Esto constituye una ventaja frente al de las células iPS. No tenemos que inducir el envejecimiento, sino que los marcadores ya están allí.



Como ventaja adicional, sería la **reprogramación directa** sin necesidad de introducir ningún gen en los fibroblastos. Para introducir estos genes, se usan **vectores lentivirales**. Sin embargo, añadiendo una combinación de cuatro fármacos al medio de cultivo, podemos transformar fibroblastos en neuronas químicamente inducidas (CiNs).



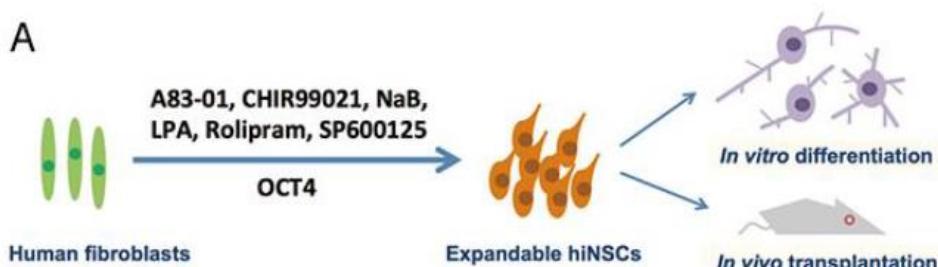
Algunos fármacos inducen la formación de factores de transcripción típicos de neuronas y otros tienen un efecto disruptor sobre los genes fibroblásticos. Otros funcionan en la remodelación morfológica.

Como desventajas frente a las células iPS:

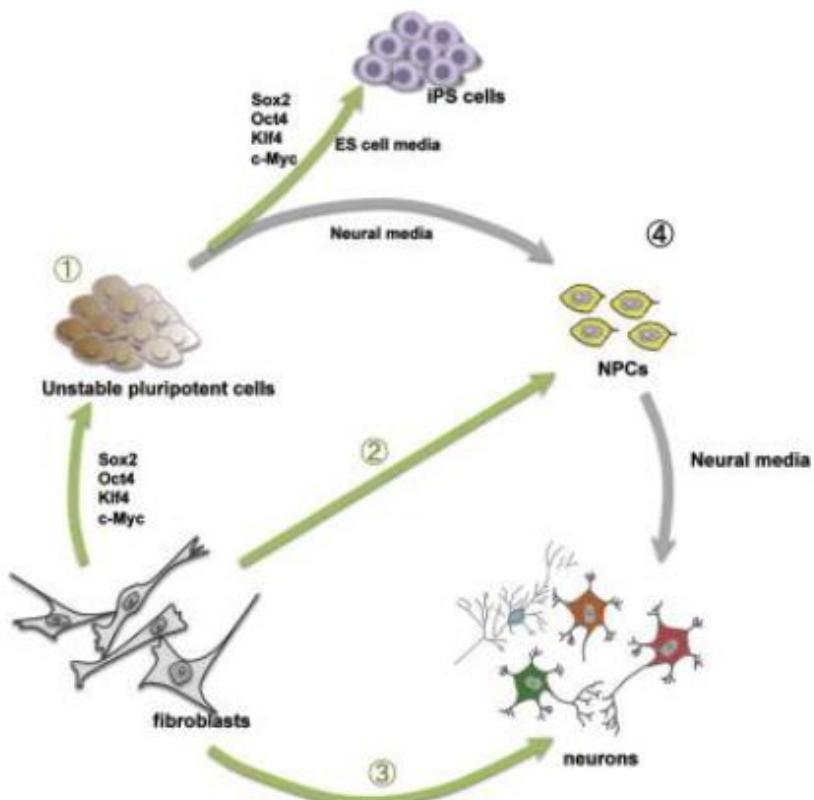
- No obtención de algunos tipos celulares en la reprogramación.
- Cuando se amplifican los fibroblastos del paciente (que además pueden entrar en senescencia), obtenemos **neuronas, células post-mitóticas**, a partir de los cuales no podemos hacer más experimentos.
Hay una **limitación del material**.
- Las **células iPS** pueden proliferar de manera indefinida, con lo cual no se obtienen más en las **iNs**.

Se ha intentado buscar un sistema intermedio en el que se dé una **reprogramación directa de fibroblastos a células madre neurales**, en lugar de a células neurales. Estas células madre neurales se pueden cultivar bien, sabiendo además los factores necesarios para la diferenciación a distintos tipos de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Hay sistemas que hacen una combinación de moléculas. Se ha encontrado un problema con ellas, que la **reprogramación no era directa**, sino indirecta por **paso de intermediarios por células pluripotentes**. Así, sí se produciría una acumulación de **mutaciones** por inestabilidad genómica de iPS cells y una **remodelación de las marcas epigenéticas** del envejecimiento.



Estos modelos celulares son así, muy útiles pero insuficientes. No basta con reproducir un proceso asociado a la enfermedad, sino que queríamos ver un modelo que reproduzca directamente como los modelos animales.



Modelos animales

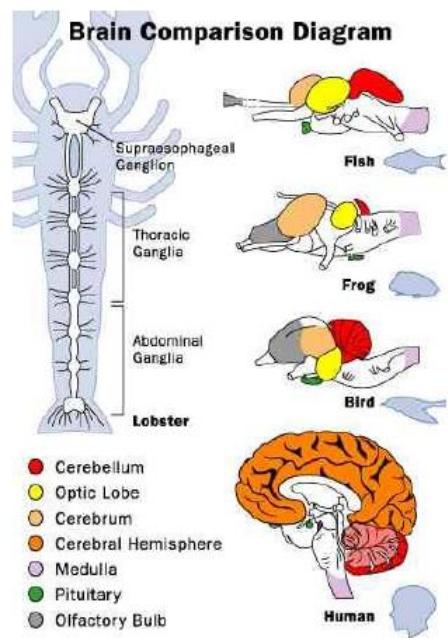
Se han utilizado muchos modelos animales, pero se han usado algunos con unas características especiales:

- **Fácil manejo en el laboratorio.** Pequeño tamaño.
- **Animal de amplia distribución.**
- **Producción sencilla.** Ciclos reproductivos cortos y animalarios sencillos.
- **Disponibilidad de herramientas para modificarlos genéticamente.**

Usados *C. elegans*, *Drosophila*, pez cebra y el ratón. Sin embargo, a la hora de modelizar animales del sistema nervioso hay que llegar a pensar en la organización de los distintos sistemas nerviosos.

Sistemas invertebrados

En invertebrados, hay una serie de ganglios y un ganglio céfálico de mayor tamaño, situado en la zona de la cabeza. Se le suele llamar “cerebro”, pero la estructura del ganglio no tiene que ver con el cerebro de vertebrados. Por ello, no suele ser un modelo muy bueno, reproduciendo **procesos asociados a la enfermedad en lugar de la enfermedad en sí**.



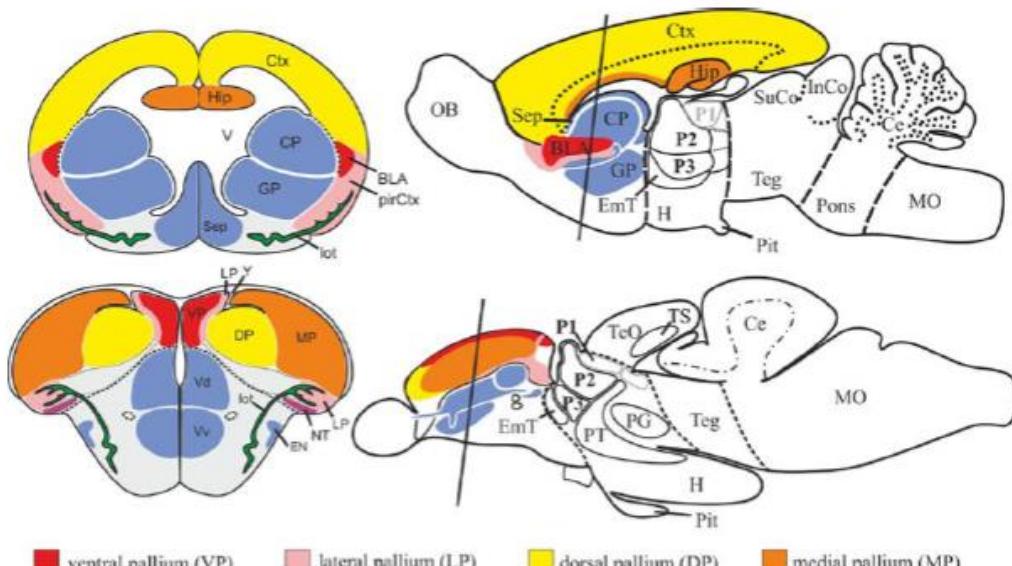
Sistemas vertebrados

En vertebrados, los modelos más utilizados son peces y roedores.

Pez cebra como modelo vertebrado

El pez cebra es un animal pequeño y barato de mantener. Tiene un sistema nervioso típico de vertebrados. Tiene la ventaja de que es el **sistema nervioso de vertebrado más sencillo que existe en la naturaleza**, pudiendo estudiar con un nivel de detalle mucho mayor.

Al compararlo con el ratón, encontramos que en el **pez cebra hay un palio medio equivalente al hipocampo de mamíferos. El palio dorsal, es el equivalente a la corteza cerebral de mamíferos**. Un pez tiene poco de corteza cerebral en comparación con un mamífero, **quizá estudiar la zona del hipocampo tendría más sentido y utilidad**.

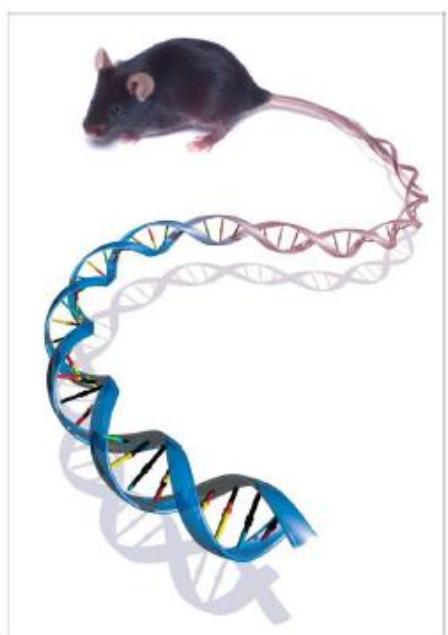


Ratón

Ratón. La anatomía y fisiología es relativamente cerca a los humanos, tienen un ciclo de vida corto, son fácilmente modificados, tiene el genoma secuenciado y se pueden hacer ensayos de comportamiento para poder medir funciones neurológicas en los ratones.

Se usan para estudio de fisiopatología, identificación de biomarcadores y abordajes clínicos.

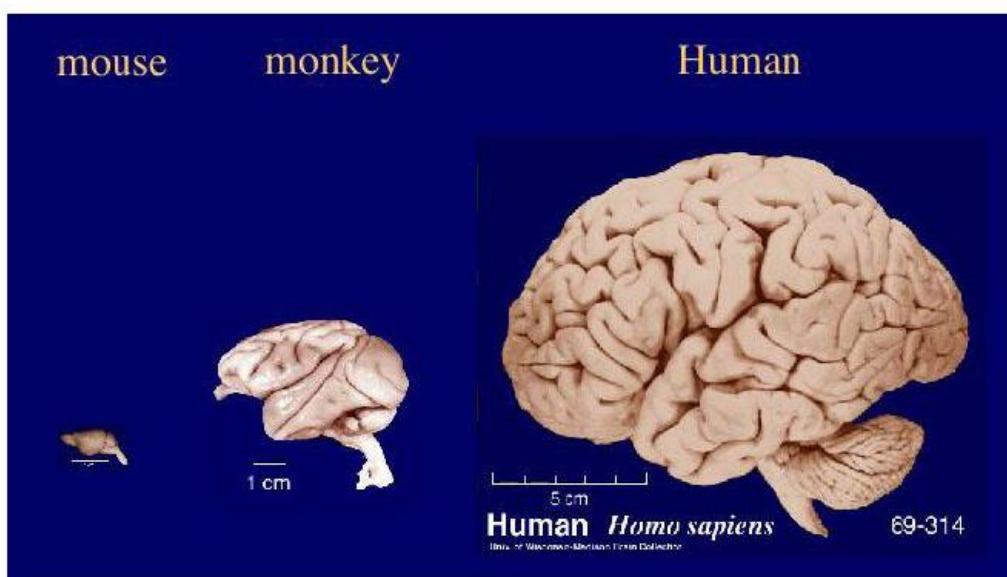
Sin embargo, están muy alejados de los primates en organización cerebral. En los primates, por ejemplo, aparecen una serie de áreas en la corteza frontal que en el cerebro del ratón no existen.

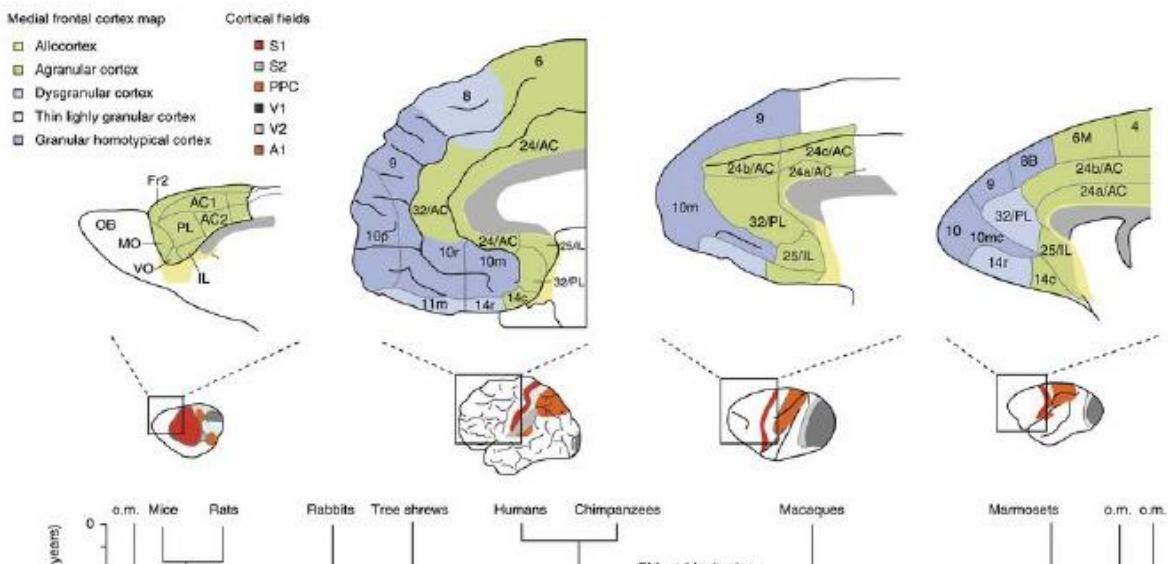


- Study of the molecular, cellular and organ pathophysiology of disease.
- Identification of biomarkers.
- Assay of therapeutic approaches (pharmacological, gene & cell therapies).

Primates no humanos

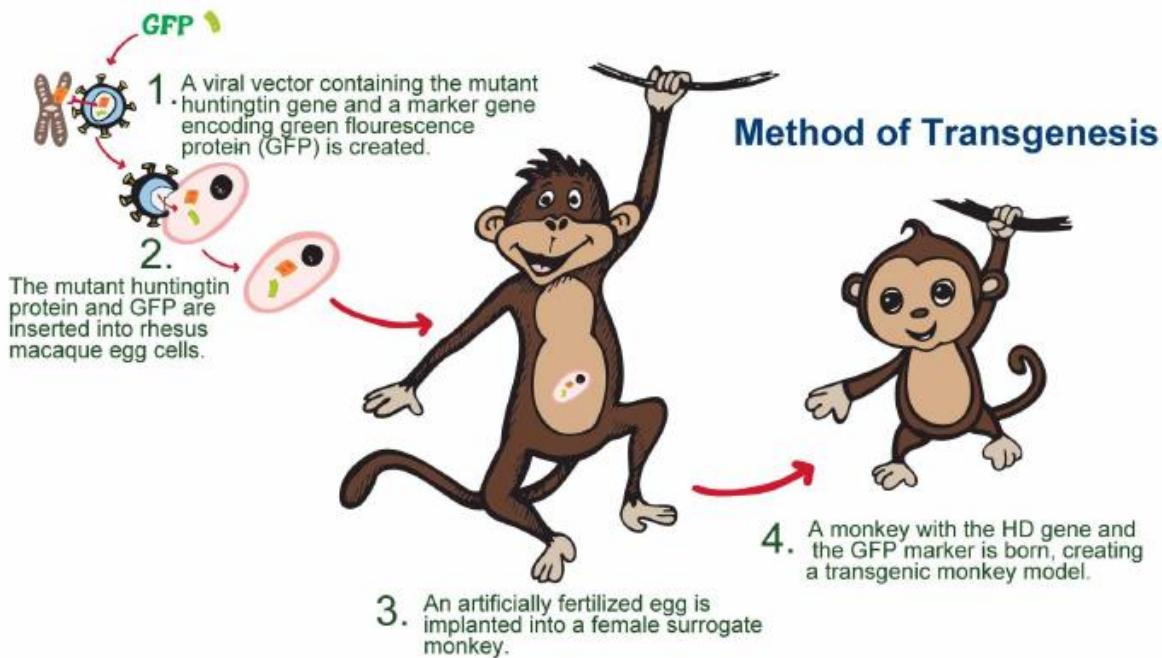
Se ha planteado por ello el uso de primates no humanos como animales modelo. Los primates hominoideos no se usan en experimentación por razones éticas. Se están utilizando como modelo los monos titíes y los macacos.





La utilización de primates no humanos ha sido escasa debido a que no había buenas herramientas genéticas para modificar el genoma de los primates, no siendo los ciclos reproductivos como los humanos.

Modelos de autismo (Rett) y Huntington en macacos.



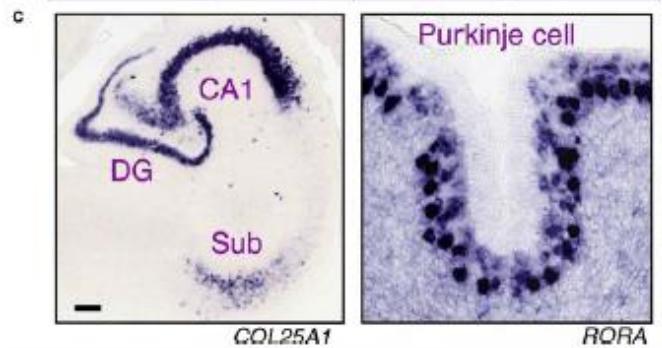
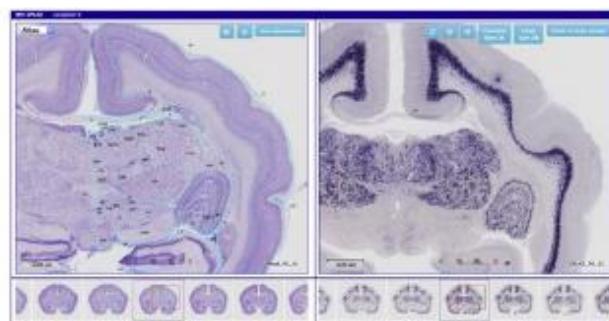
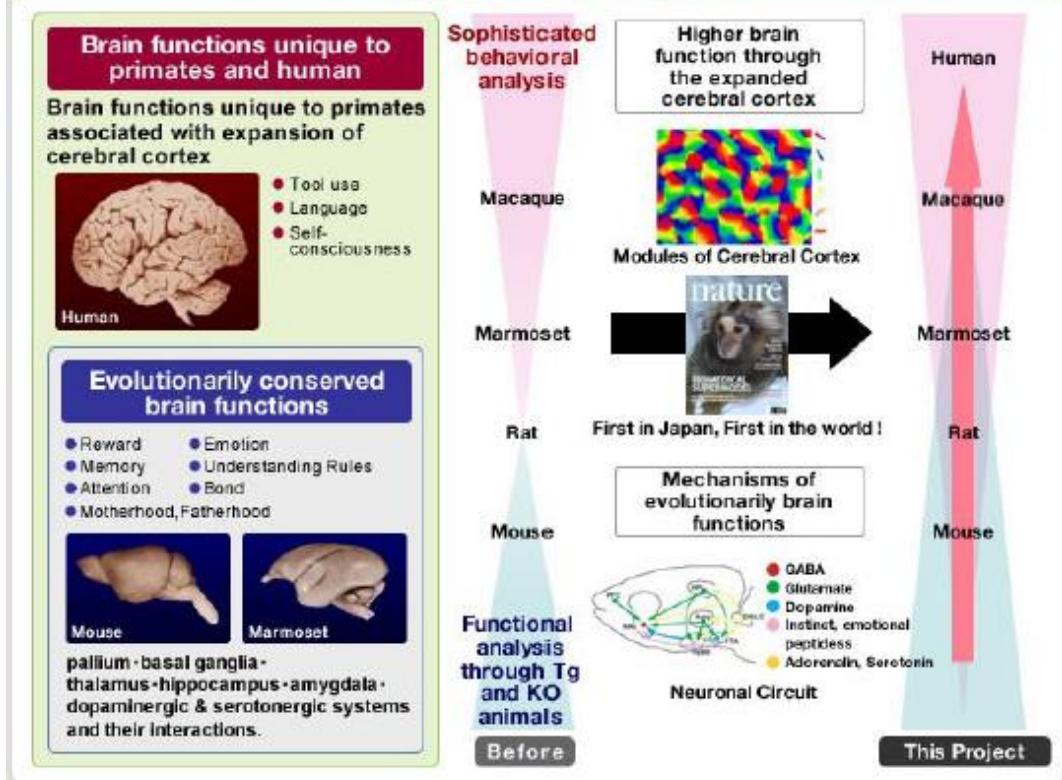
El uso de titíes se hace debido a que hay una facilidad a la hora de hacer animales modificados genéticamente.

Hay una serie de funciones **conservadas**. Sin embargo hay una serie de funciones que sólo vamos a encontrar en primates, pues están asociadas a la expansión de la corteza cerebral.

Los macacos muestran un comportamiento más sofisticado, pero obtener modificaciones genéticas es más complicado. Los titíes son la opción como modelo en Japón para la modificación.

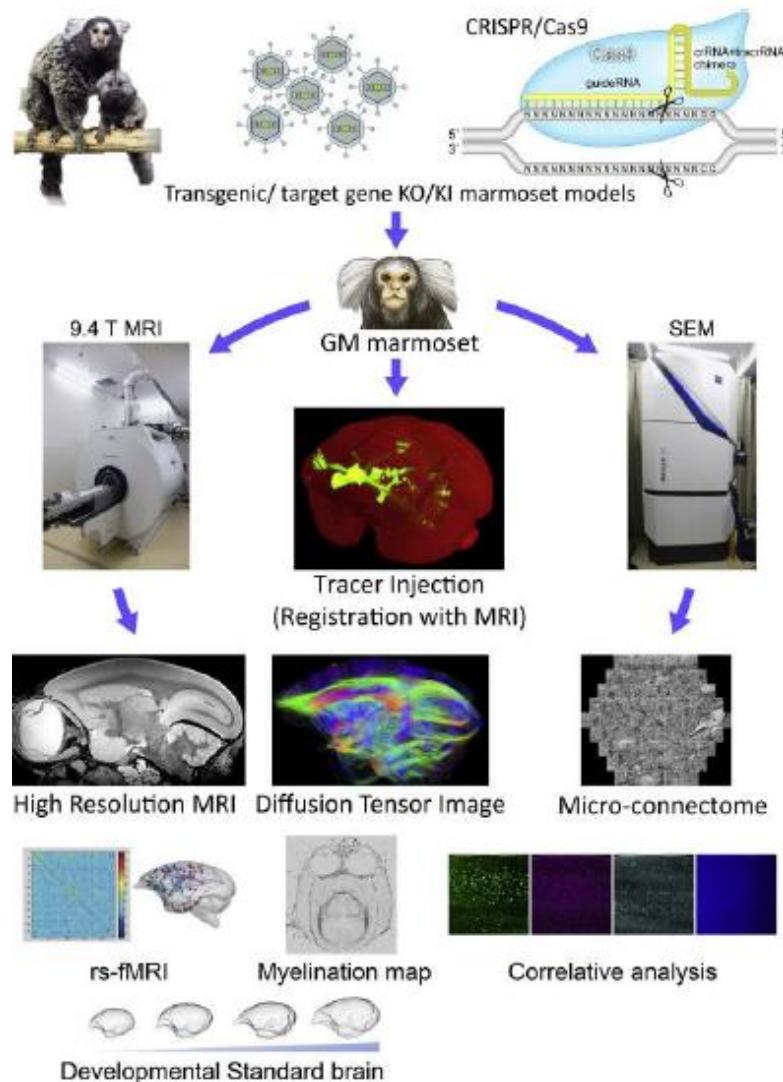
En todos los genes estudiados en titíes, el patrón de expresión es idéntico o muy similar al patrón de expresión que se muestra en humanos.

Strategic Exploitation of Neuro-Genetics for Emergence of the Mind Development into Human Mind

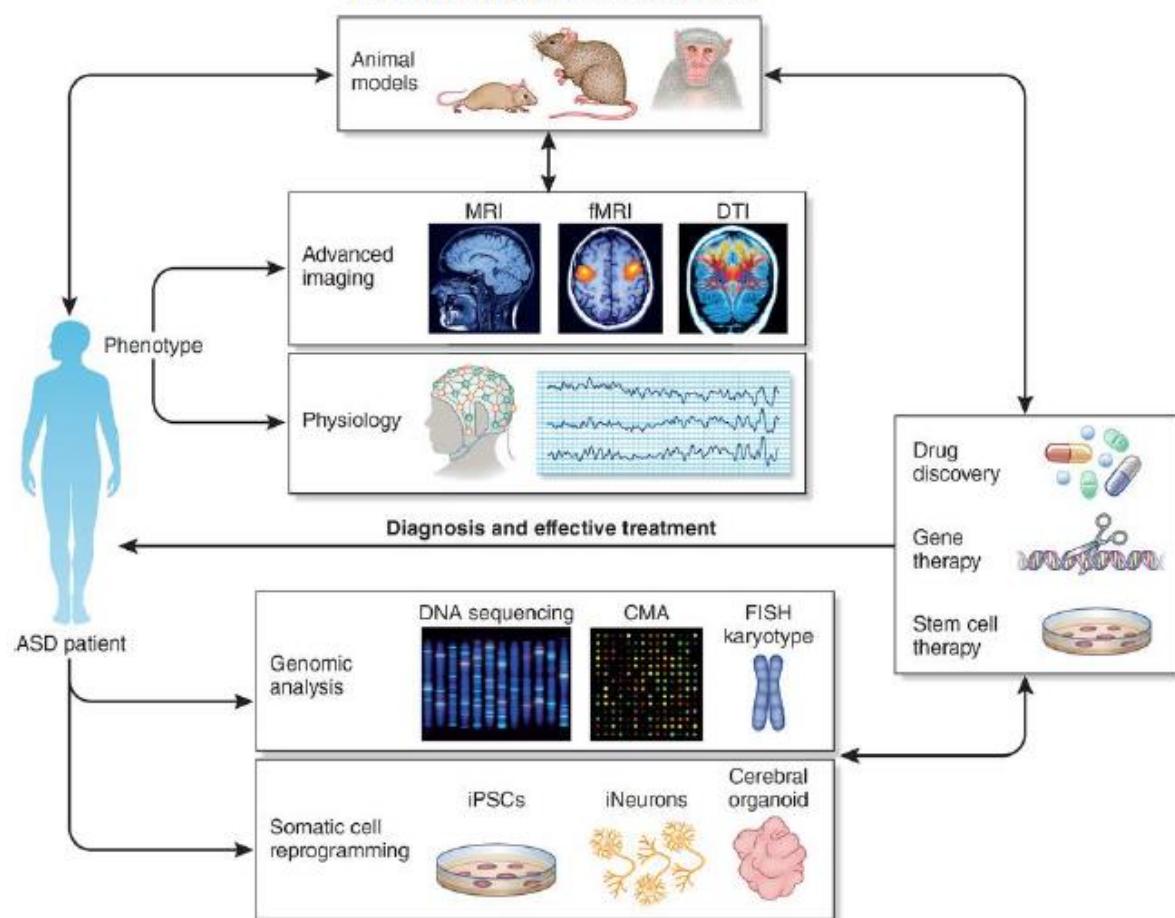


Se quiere hacer una **batería de monos modificados genéticamente** para obtener **mapas de alta resolución** y una vez que muere el mono, análisis post-mortem. Así, se obtendría una gran base de datos.

Combinando los resultados de distintos modelos, se puede tener un mejor entendimiento de la enfermedad.



Combination of animal models, cells and organoids with cutting-edge technology to characterize human disease.



Bases Moleculares de la Patología II

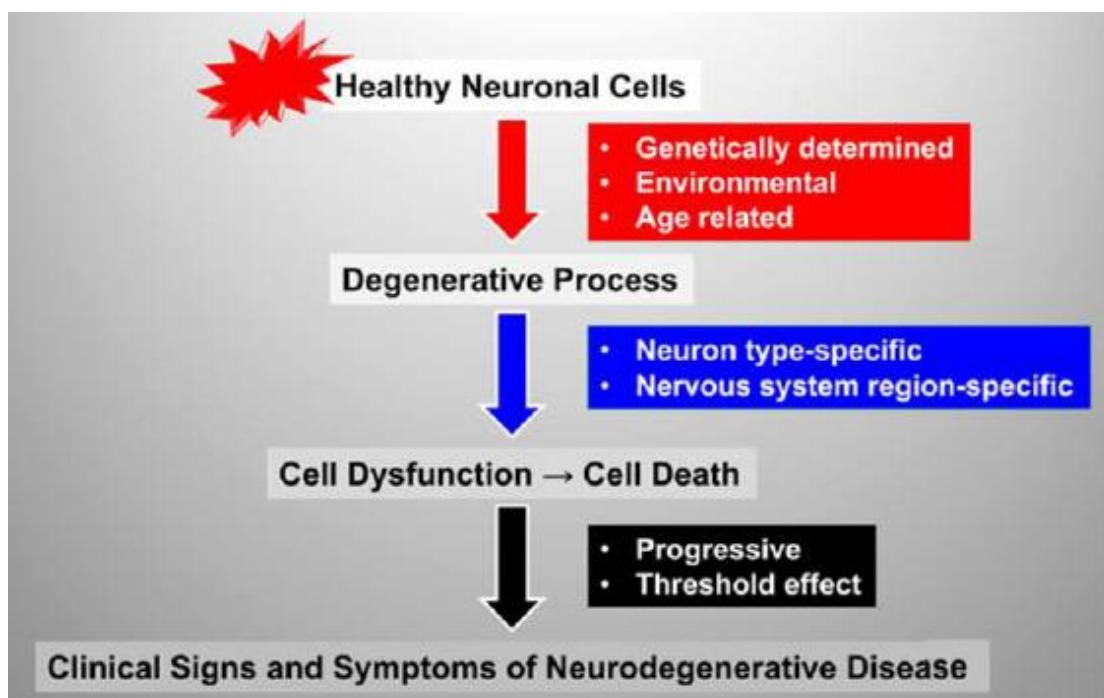
Enfermedades neurodegenerativas – 06-02-2019

Correo: javierdiaznido@gmail.com. Presentaciones en 106.

Se caracterizan por una **pérdida progresiva de funciones neurológicas, siendo crónicas**. Se debe a la pérdida progresiva del neuronas **en áreas distintas del SNC**.

En una enfermedad neurodegenerativa, **empezamos con células neuronales sanas y que por alguna causa (genética, envejecimiento, factores ambientales), comienzan un proceso degenerativo**. Este proceso será **específico de región y de tipo de neurona**.

Comienza con una disfunción de la neurona y culmina con su muerte. Esto ocurre progresivamente hasta que el número de neuronas muertas supera un cierto umbral, **de manera que a partir de un cierto umbral se dan síntomas clínicos**.



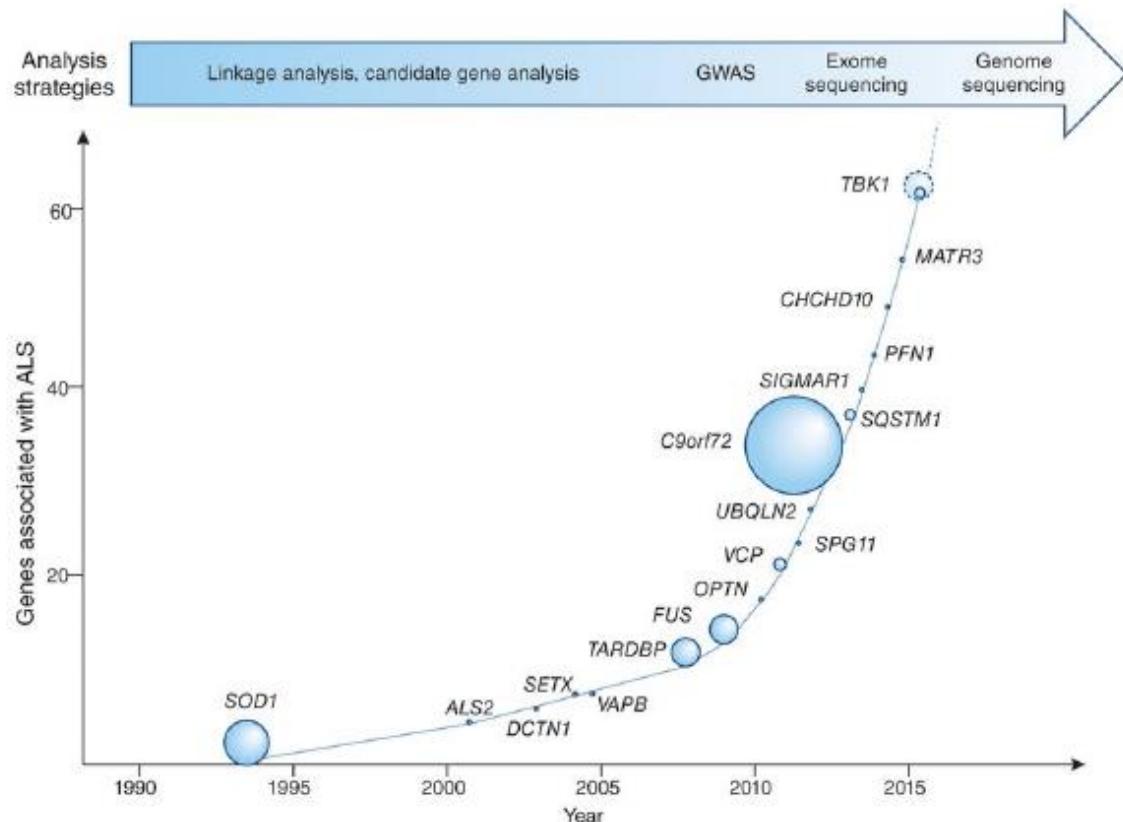
Genética de las enfermedades neurodegenerativas

- Hereditaria
 - Herencias mendelianas
 - Herencias mitocondriales
- Esporádicas

Una misma enfermedad se puede producir por todos los mecanismos genéticos, tanto hereditarios como susceptibilidades. Sin embargo, entrarán dentro de un rango, no serán exactamente la misma enfermedad.

Con la secuenciación masiva, se ha incrementado la cantidad de genes asociados a enfermedades neurodegenerativas.

El descubrimiento de estos genes nos ayuda a entender las vías moleculares afectadas en enfermedades neurodegenerativas.



Clasificación de las enfermedades neurodegenerativas

Clasificación clínica

Se basa en la zona afectada y los síntomas. No es muy útil, pues no nos dice nada del origen de la enfermedad, de los mecanismos implicados y no podemos desarrollar terapias a partir de ella. En distintos grupos, tenemos enfermedades que pueden compartir mecanismos patológicos y a su vez, enfermedades en el mismo grupo que tienen distintos mecanismos.

Cortex cerebral

Generalmente, causan una pérdida de funciones cognitivas, siendo las típicas demencias. Uno de los ejemplos más típicos es la enfermedad de Alzheimer, una demencia caracterizada por pérdida de memoria que afecta fundamentalmente a la corteza cerebral.

Ganglios basales

Hay problemas en el control fino del movimiento. Por ejemplo, Huntington (movimientos espasmódicos) y Parkinson (lentos y temblor).

Tronco encefálico y cerebelo

Producen una pérdida de coordinación del movimiento, ataxias. Problemas en la postura o al hablar.

Enfermedades de motoneuronas

Producen una parálisis progresiva y por lo tanto, también, una atrofia muscular progresiva.

Ejemplos de enfermedades con mecanismos distintos dentro del mismo grupo y viceversa.

- **Enfermedades de expansión de CAG → producen tractos de poliglutamina.** Pueden estar en distintas proteínas, y dependiendo de en qué proteína esté, producirá distinta patología.
 - Hungtintina. Produce una **degeneración del estriado y en los ganglios basales habrá un trastorno del movimiento.**
 - Ataxinas. **Degeneración de neuronas en el cerebelo y médula espinal, pérdida de coordinación.**
 - Receptor de andrógenos. Funciona como receptor de andrógenos, **pero se produce una degeneración específica de motoneuronas.** Produce **atrofia muscular espino-bulbar.**

En todas ellas, se producen interacciones aberrantes en estas proteínas, pero afectando a diferentes vías aunque su mecanismo de patogénesis es parecida.

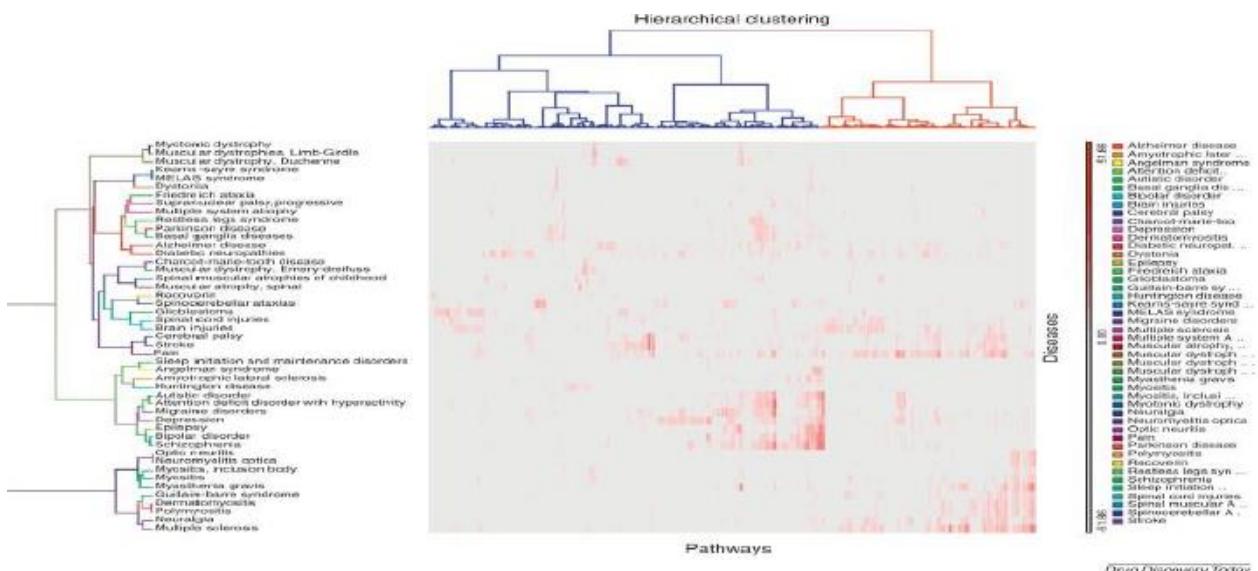
- Algunas ataxias se deben a expansiones de poliglutamina y otras, a causas como mutaciones en la frataxina.

La clasificación sigue sin ser útiles porque como las enfermedades son progresivas, **la degeneración puede extenderse a otras zonas del cerebro**. Es decir, por ejemplo en enfermedad de Hungtinton, la degeneración del estriado puede extenderse a la corteza y allí producir daño y síntomas típicos de una demencia.

Clasificación en base a los mecanismos patogénicos

Aquellas vías afectadas que comparten mecanismos patogénicos pertenecerían a un mismo grupo. El problema es que los datos quizá no sean suficientes o relevantes. No se conocen todos los mecanismos implicados, **con lo cual en parte los datos no pueden ser muy relevantes o incompletos a partir de modelos que quizá no reproducen bien la enfermedad.**

Las enfermedades que están próximas podrían ser tratadas de una manera similar. Es un modelo útil, porque es capaz de generar hipótesis.

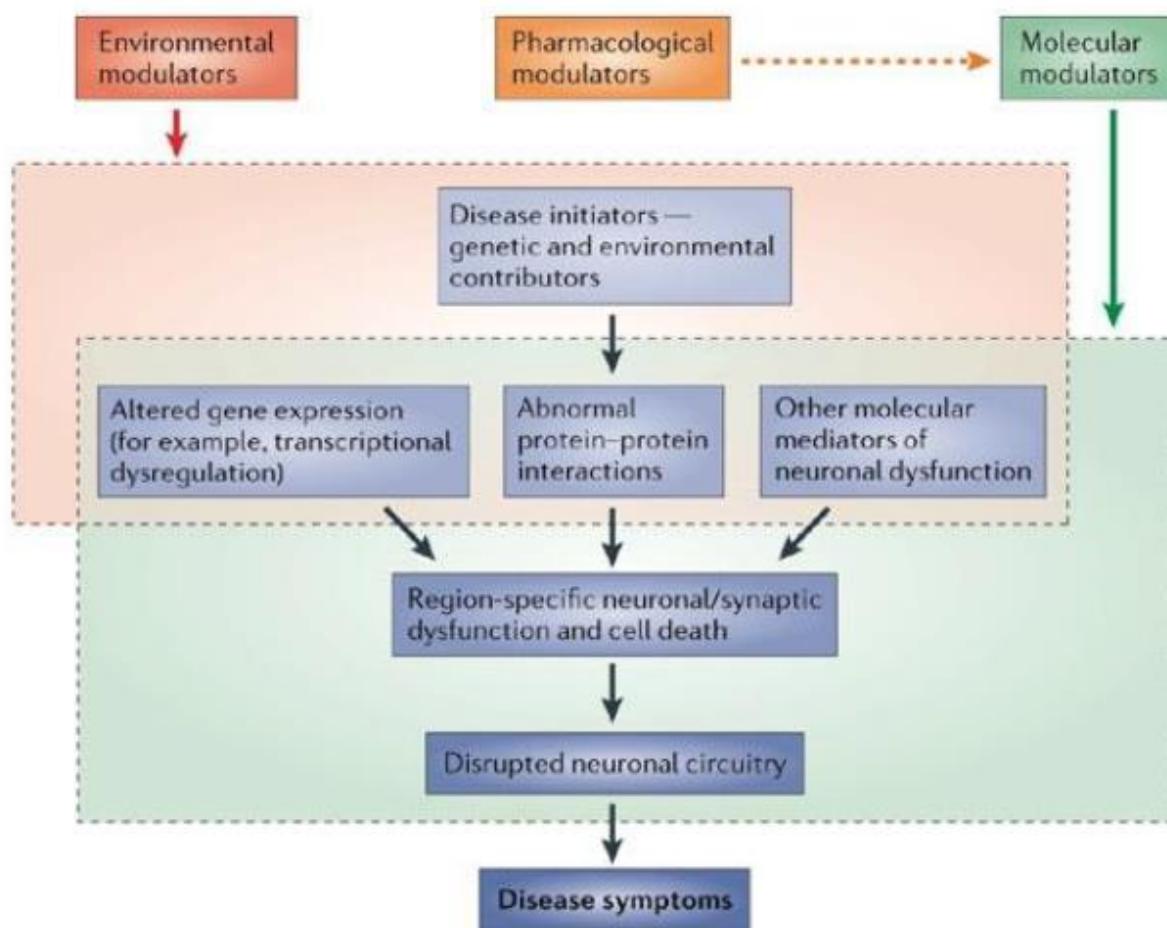


Patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas

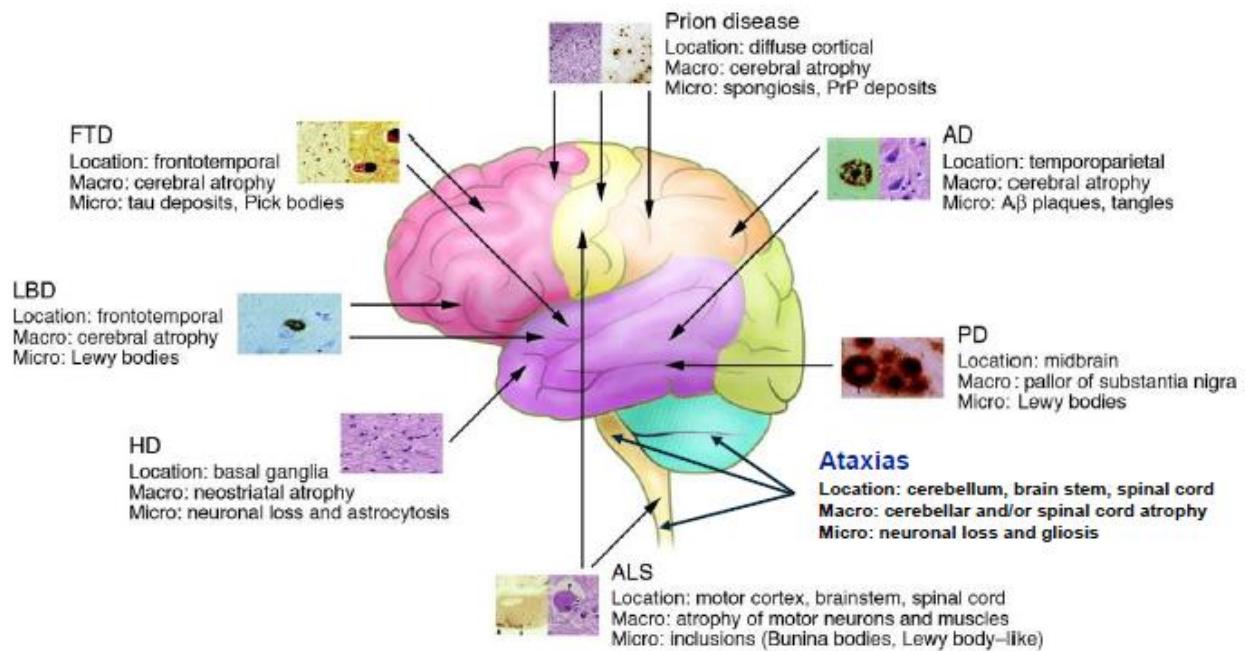
Se intentan discernir:

- Iniciadores de la enfermedad
- Mecanismos moleculares implicados
- Entender cómo estos mecanismos moleculares llevan a la muerte de las neuronas y por qué eso se produce sólo en determinadas neuronas de determinadas neuronas cerebrales.
- Entender cómo se alteran los circuitos neuronales, y cómo se traduce eso en los síntomas de la enfermedad.

En la actualidad, **sabemos bastante de factores genéticos**; mucho de **mecanismos implicados**; no **sabemos muy bien la selectividad de neuronas** y **muy poco de cómo se alteran los circuitos neuronales**.

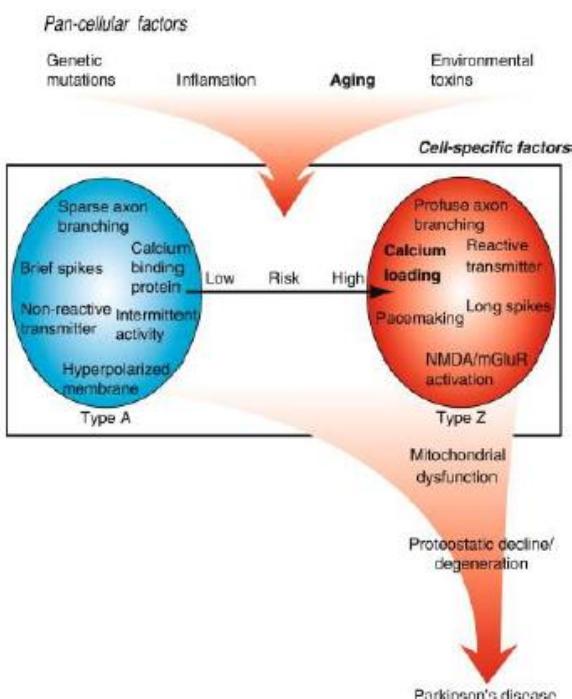


Una de las cuestiones importantes es la **vulnerabilidad selectiva de ciertos tipos de neuronas y no de otras**. Por otro lado, **también hay una selectividad de la zona afectada, dependiendo de la enfermedad (Alzheimer disease vs FT dementia)**



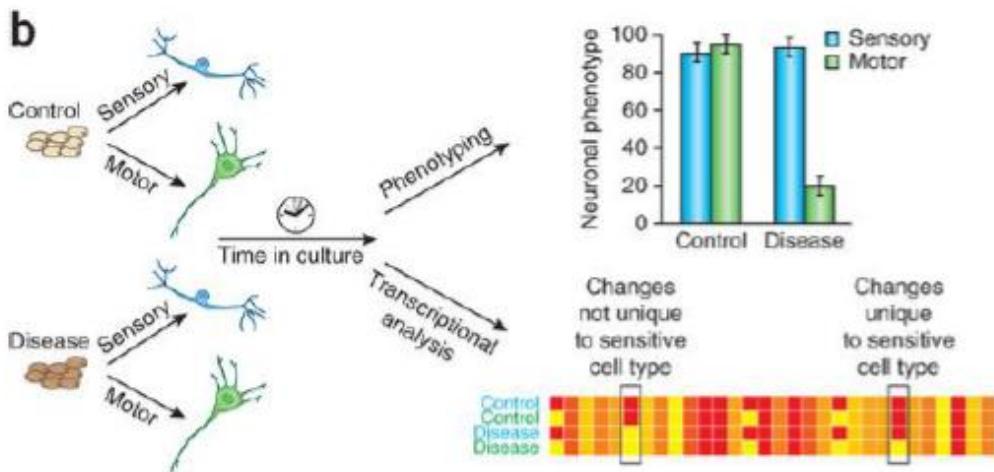
La selectividad por las neuronas conlleva a una serie de hipótesis. La enfermedad, resultará de la interacción de dos tipos de factores:

- **Pan celulares, afectan a todas las células.** Por ejemplo, **mutaciones en la α-sinucleinas se expresarán en todas las neuronas.**
 - **Específicos de células.** Cada **tipo neuronal es completamente diferente** de otras: neurotransmisores, ramificación axonal, tipo de proteínas fijadoras de calcio, tipos de receptores, tipos de actividad electro-fisiológicas.
- Esas diferencias, **frente a un defecto pan-cellular, provocan altos y bajos riesgos de vulnerabilidad.** En este caso, por ejemplo, **las neuronas dopaminérgicas son las que tienen una mayor vulnerabilidad** y por ello desarrollan fenotipo enfermo.



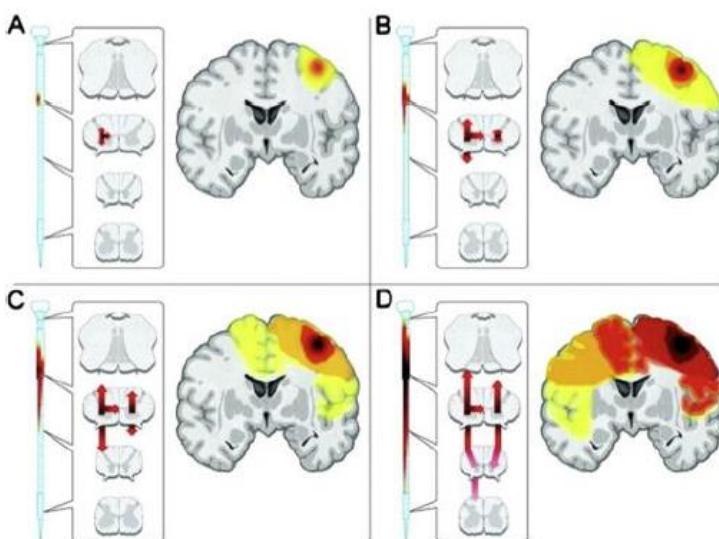
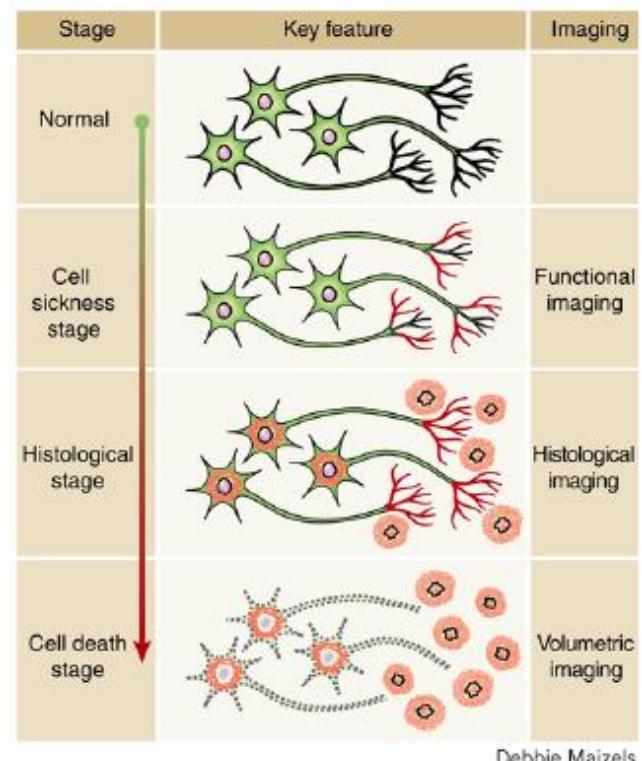
Así, sería interesante saber qué factores son los que permiten la resistencia que hace resistente a unas neuronas frente a las otras.

Preparando a partir de células iPS de sujetos sanos y de pacientes para una enfermedad de motoneuronas, neuronas sensoriales y motoneuronas, podemos comparar los factores para poder saber el por qué una vulnerabilidad selectiva de esas motoneuronas.



Las enfermedades neurodegenerativas avanzan de **manera temporal y espacial**. Comienzan generalmente con una disfunción de ciertas neuronas y pérdida de sinapsis. Así, tendremos neuronas enfermas que aún no han muerto (se podría medir por técnicas de neuroimagen funcional que midan actividad neuronal). Según va avanzando la enfermedad, la neurona se va atrofiando (comprobable mediante técnicas de neuroimagen volumétrica). La neurona muere con el tiempo.

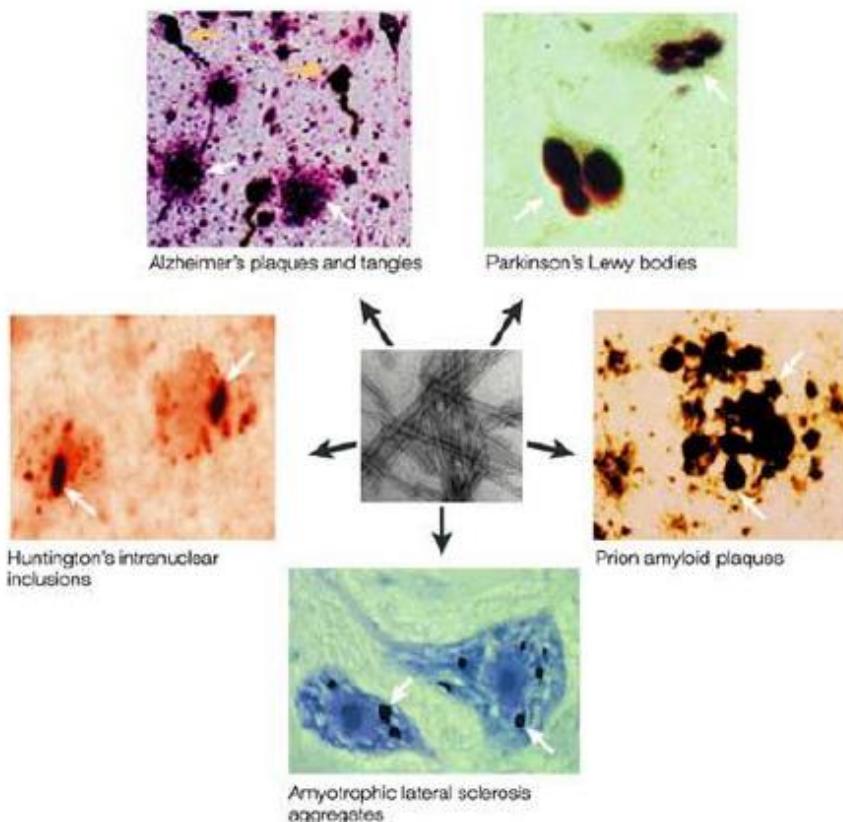
También hay una **progresión espacial**. Al principio se ve afectada una zona de la corteza motora en ALS, pero se puede ir extendiendo a lo largo de la médula espinal. Este progreso puede estar relacionado con la conectómica.



Mecanismos de patogénesis

Aparición de agregados de proteínas

En cada enfermedad, aparece un tipo de agregados distinto, pero hay enfermedades que pueden tener más de un tipo de agregados, tanto intracelulares como extracelulares.

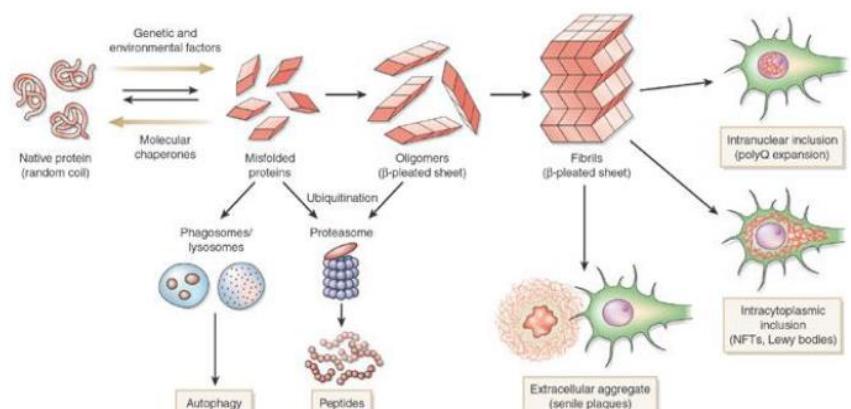


Nature Reviews | Neuroscience

Suele haber agregados de la proteína tau, que suele estar asociada a microtúbulos, pero que en enfermedad producen grandes agregados. Otros agregados pueden ser extracelulares del péptido β -amiloide.

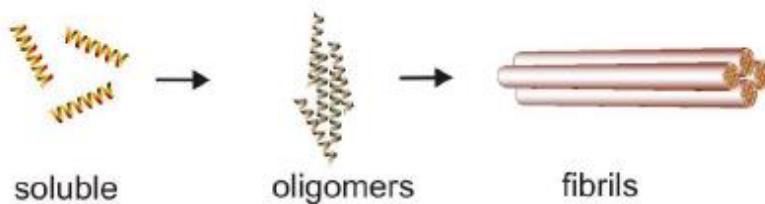
Un tema común a enfermedades neurodegenerativas puede ser la **formación de agregados de proteínas**. Se está dedicando mucha atención a entender por qué se producen muchos agregados, que son una consecuencia indirecta de un mal plegamiento de las proteínas.

Hay determinadas mutaciones que favorecen que la proteína se plieguen de manera incorrecta. Hay factores ambientales que también pueden estar implicados, como estrés oxidativo que promueven el plegamiento incorrecto. Existen mecanismos para controlarlo, como **autofagia** o **proteosoma**. Sin embargo, la gran producción de proteínas mal plegadas sobrepasa la capacidad de la célula y se agrega en fibrillas y agregados.



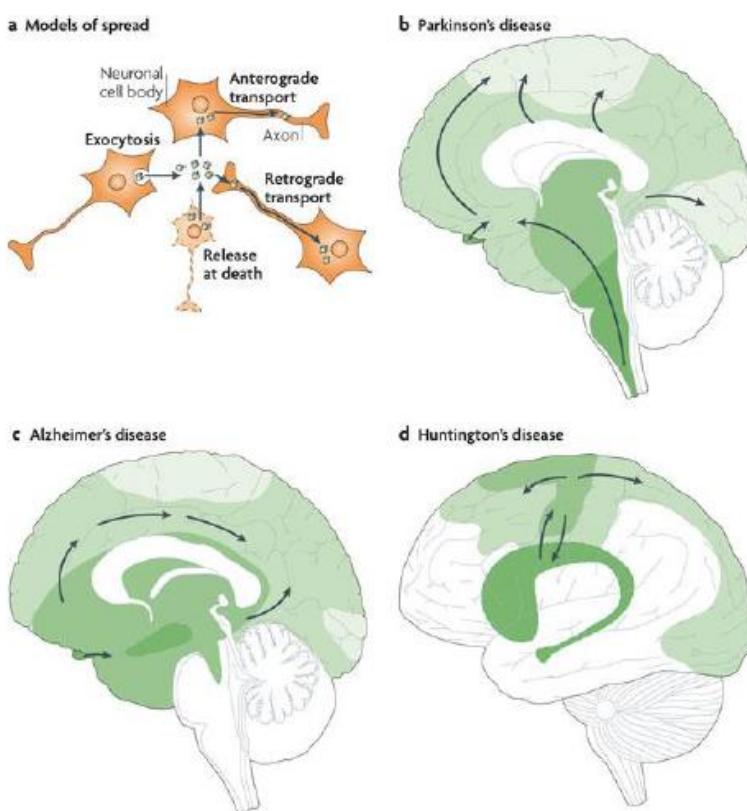
Los agregados de proteínas **tendrían que ver bastante con el envejecimiento**. En un cerebro joven, el nivel de agregados de proteínas es muy bajo. En un cerebro normal, **hay una acumulación pero que está por debajo del umbral patológico**. Hay personas con una **mayor predisposición genética y agentes ambientales que incrementan la formación de agregados**. La suma de factores podría aumentar el efecto patológico.

Estos agregados suelen ser **bastante neurotóxicos**. Ha habido mucha duda y controversia en qué especies ha sido la más neurotóxica (agregados solubles, oligómeros o fibrillas). El **consenso** sería que normalmente, todos tienen una cierta toxicidad, pero que los más neurotóxicos serían los oligómeros. Es importante saber esto, **porque esto nos concierne a la hora de desarrollar distintos tratamientos**.



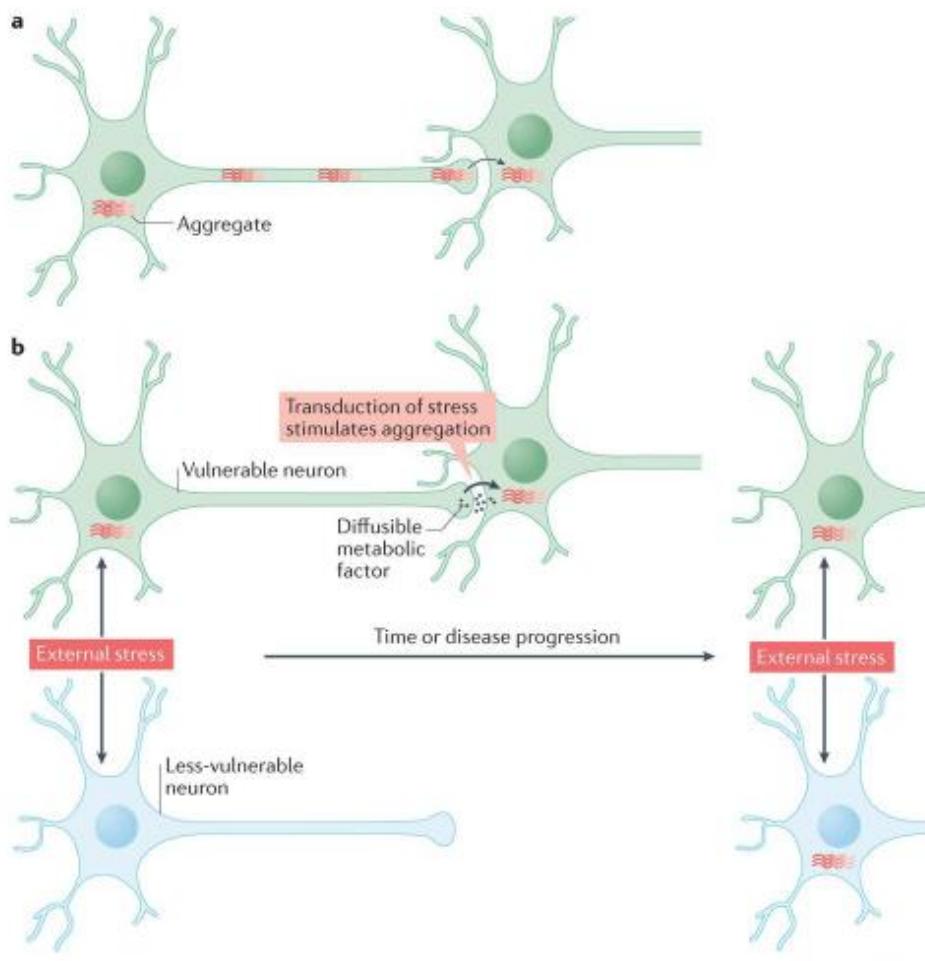
Su toxicidad se debe a la interacción aberrante con muchas proteínas y en muchos compartimentos celulares (en las mitocondrias, membrana sináptica, factores de transcripción...). Cuando se forman estos agregados, no tenemos un camino lineal, sino que se van a alterar muchas cosas a la vez. Así, **habrá muchas vías alteradas a la vez, habiendo una amplificación del efecto**. Si queremos diseñar tratamientos, **no bastará con incidir sobre una vía sola, sino que habrá que hacerlo sobre varias**.

Por último, los agregados se extienden conforme va avanzando la enfermedad de unas regiones a otras. En la enfermedad de Huntington, aparecen en el estriado y siguen en la corteza cerebral. En Parkinson, también siguen un patrón de conexiones.



Lo que no está claro es por qué se extienden estos agregados, pero hay dos teorías.

- Los agregados pasan de unas neuronas a otras, catalizando la agregación de proteínas al entrar en una neurona. Así se comportarían los priones. Se cree que este podría ser uno de los mecanismos de patogénesis.
- Otras posibilidades abogan a que la formación de agregados en neuronas más vulnerables provocan una serie de señales metabólicas difusibles que estimulan la agregación, como citoquinas proinflamatorias.

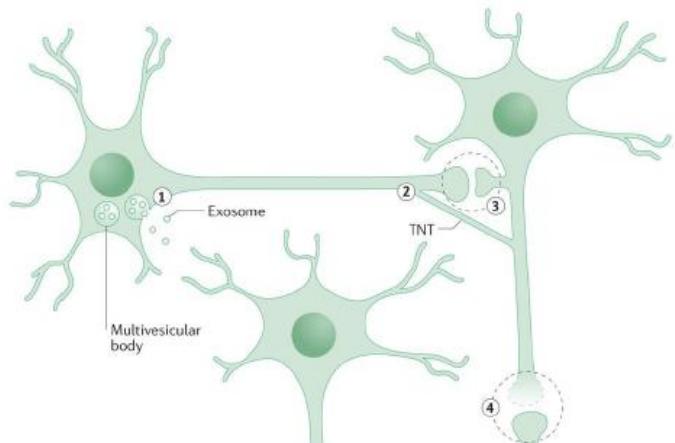


Nature Reviews | Neuroscience

Es posible que ocurran ambas cosas a la vez. Se está estudiando mucho cómo pasan los agregados de unas a otras:

- Sináptica
- A través de células de glía
- Exosomas
- Trans-neural tubes.

Todos estos detalles podrían ser **importantes para el desarrollo de tratamientos**.



Nature Reviews | Neuroscience

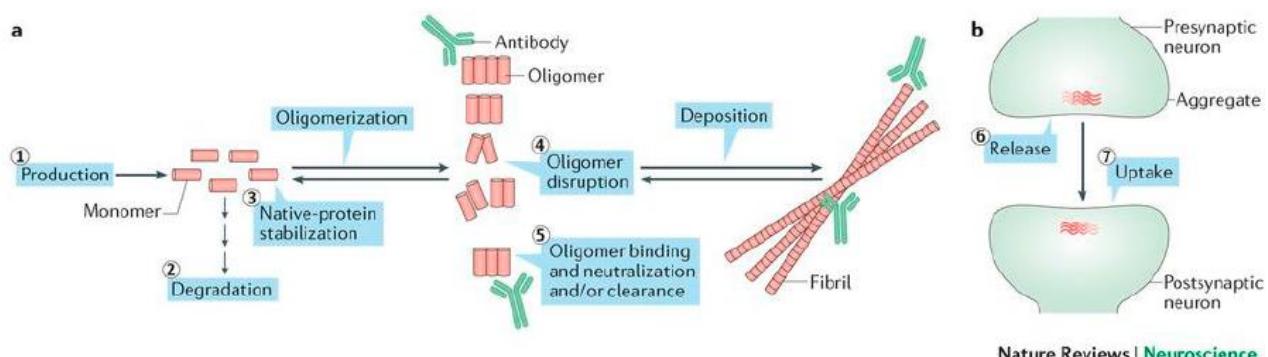
Bases Moleculares de la Patología II

Enfermedades neurodegenerativas – 08-02-2019

Se discute que los agregados pueden transmitirse de una célula a otra, por vías que no están muy acordadas.

Todo este conocimiento está sirviendo para hacer distintos tipos de terapias:

- Bloquear la producción
- Aumentando su degradación
- Estabilizando la forma de la proteína nativa
- Rompiendo los oligómeros
- Uniéndolos y neutralizándolos y eliminándolos
- Bloqueando la liberación de agregados por algunas neuronas o inhibiendo la captación de las neuronas no afectadas.

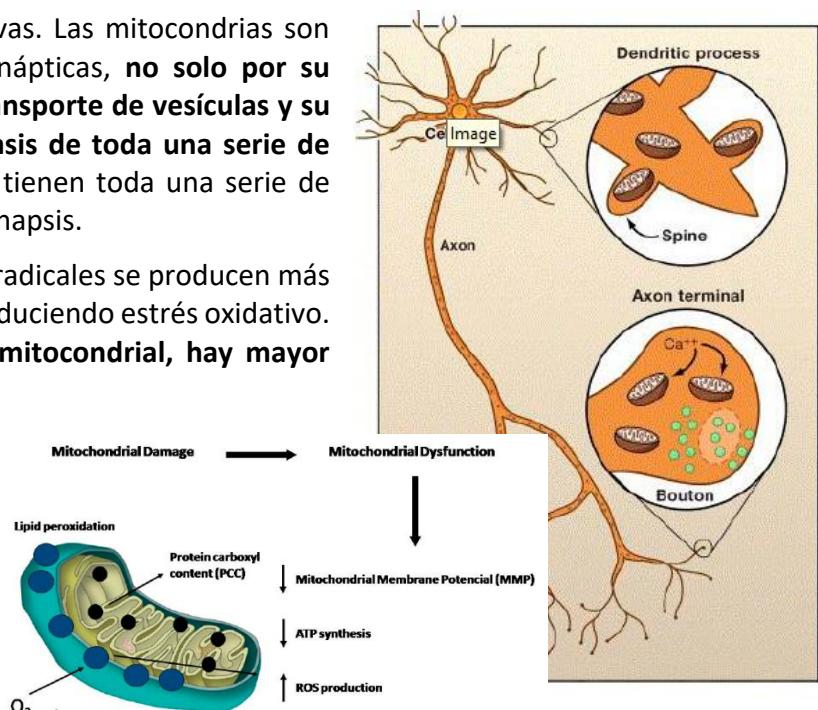


Disfunción mitocondrial

En muchas enfermedades neurodegenerativas. Las mitocondrias son críticas desde los terminales pre y post-sinápticas, **no solo por su función bioenergética (necesaria para el transporte de vesículas y su meabolismo) sino también en la homeostasis de toda una serie de iones como el calcio**. Así, las mitocondrias tienen toda una serie de procesos esenciales en la generación de la sinapsis.

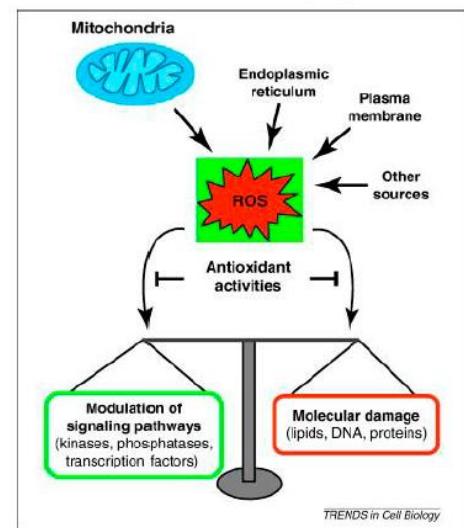
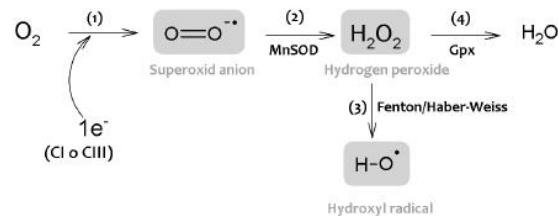
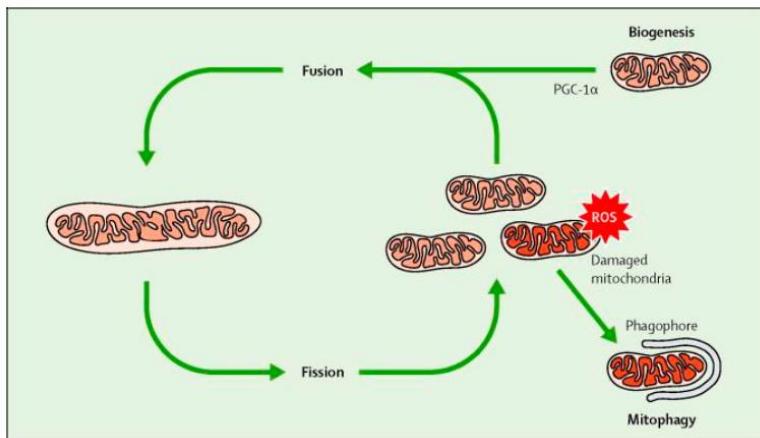
En las mitocondrias se producen **ROS**. Estos radicales se producen más cuando hay una disfunción mitocondrial, produciendo estrés oxidativo. **Debido a la mayor cantidad de actividad mitocondrial, hay mayor cantidad de estrés oxidativo.**

Existen toda una serie de enzimas que se encargan de estos ROS. A pesar de toda esta respuesta antioxidante, **en procesos de envejecimiento y neurodegenerativos, influye bastante en enfermedades neurodegenerativas.**

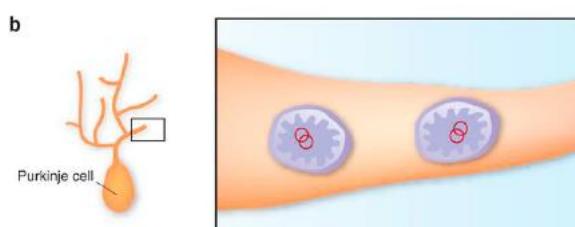
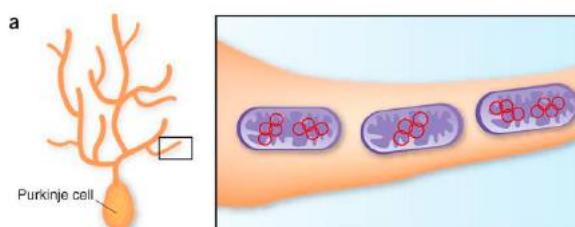
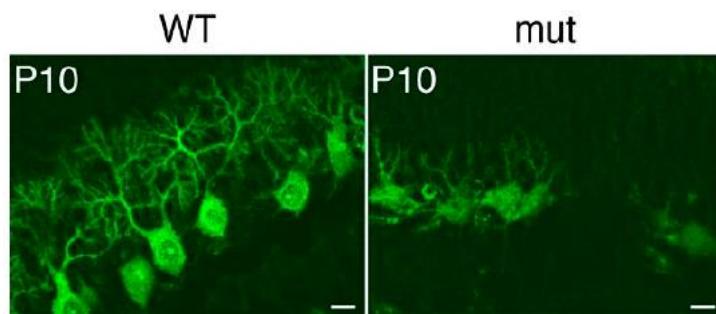


En las neuronas también es muy importante la **dinámica mitocondrial**. Las mitocondrias en las células forman un **retículo** y están sometidas constantemente a procesos de **fusión** y de **fisión**. Estos procesos son muy importantes.

En la fisión, **aquellas mitocondrias que se encuentran dañadas son eliminadas por el proceso de mitofagia**. Este dinamismo es crítico en las neuronas, y cualquier fallo en esta dinámica es capaz de provocar **anormalidades neuronales**.



Hay algunas enfermedades neurológicas causadas por deficiencias en mecanismos de fusión mitocondrial (**mitofusina**). En algunas neuropatías, se observan **mitocondrias más pequeñas** y **toda una atrofia dendrítica de las células de Purkinje en comparación con las normales**. Esto, ilustra la importancia que tiene la dinámica mitocondrial.

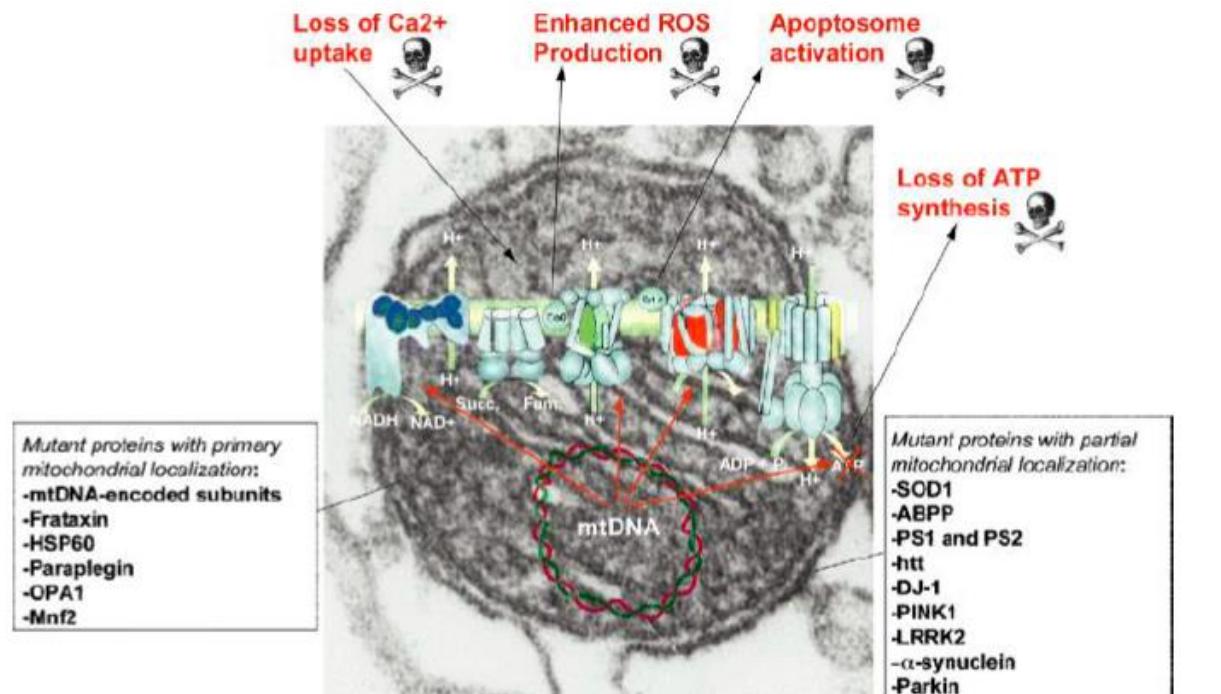
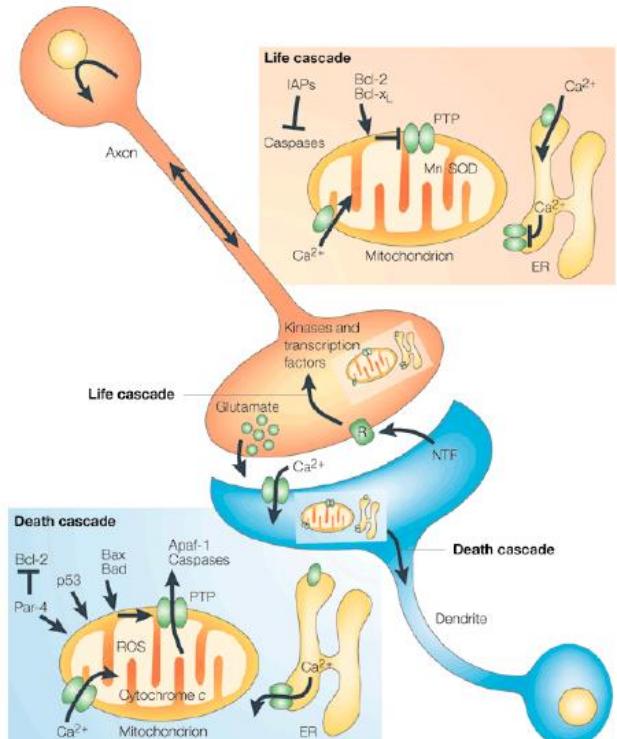


Otro aspecto de las mitocondrias es su **papel importante en el control de la muerte celular por apoptosis**. La activación de caspasas va a estar controlada por las mitocondrias. Uno de los eventos clave es la **liberación del citocromo c de las mismas en la regulación de la apoptosis**.

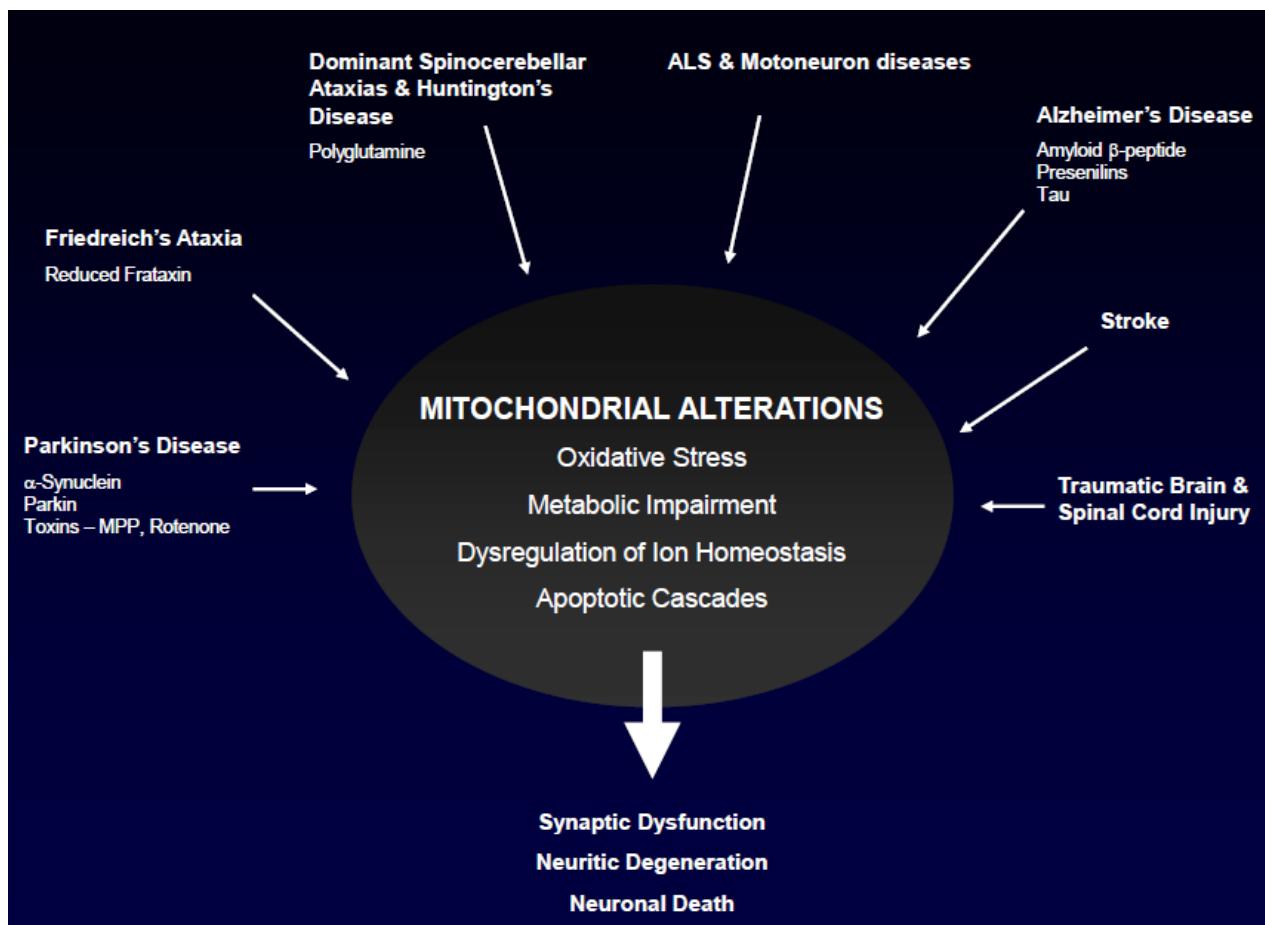
En el sistema nervioso, en algunos procesos neurodegenerativos se observa una activación de caspasas que no está en toda la neurona, sino restringida a los terminales sinápticos. Esto, da lugar a una **retracción de las sinapsis**. De una manera parecida a como hay una muerte celular, habría una “**muerte de sinapsis**”, que llevaría a la **atrofia de la misma**.

Hay, además, toda una serie de proteínas implicadas en enfermedades neurodegenerativas que están en las mitocondrias:

- **Proteínas mutantes mitocondriales.**
 - Frataxina
 - HSP60
 - Paraplegina
- **Proteínas que están parcialmente asociadas a la mitocondria pero que se asocian más en enfermedades neurodegenerativas**
 - Hungtintina
 - SOD1
 - ABPP
 - PS1 y PS2
 - DJ-1
 - OPA1
 - Mnf2
 - Tau, asociada a microtúbulos.
En determinadas situaciones interacciona con mitocondrias.
 - α -sinucleína.



En distintas enfermedades y por distintas causas, se producirían alteraciones mitocondriales que van a conducir a un estrés oxidativo, a un fallo metabólico y a una desregulación de iones como el calcio y activación de cascadas apoptóticas. Estas serían las causas de la disfunción de sinapsis, muerte neuronal y degeneración neuronal.

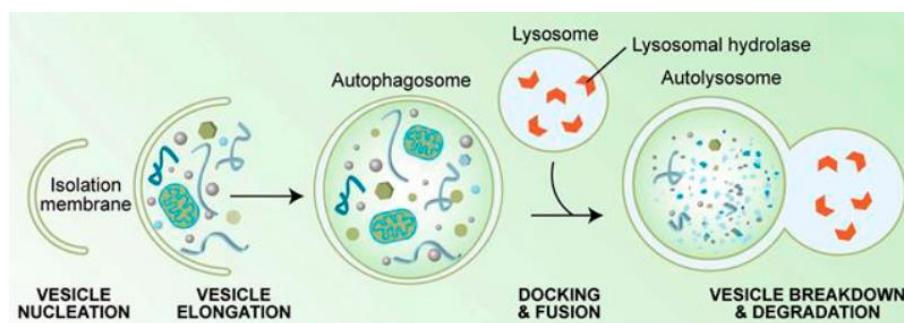


Como estas alteraciones mitocondriales son comunes a muchas enfermedades neurodegenerativas, podrían ser útiles como terapia generalizada.

Autofagia

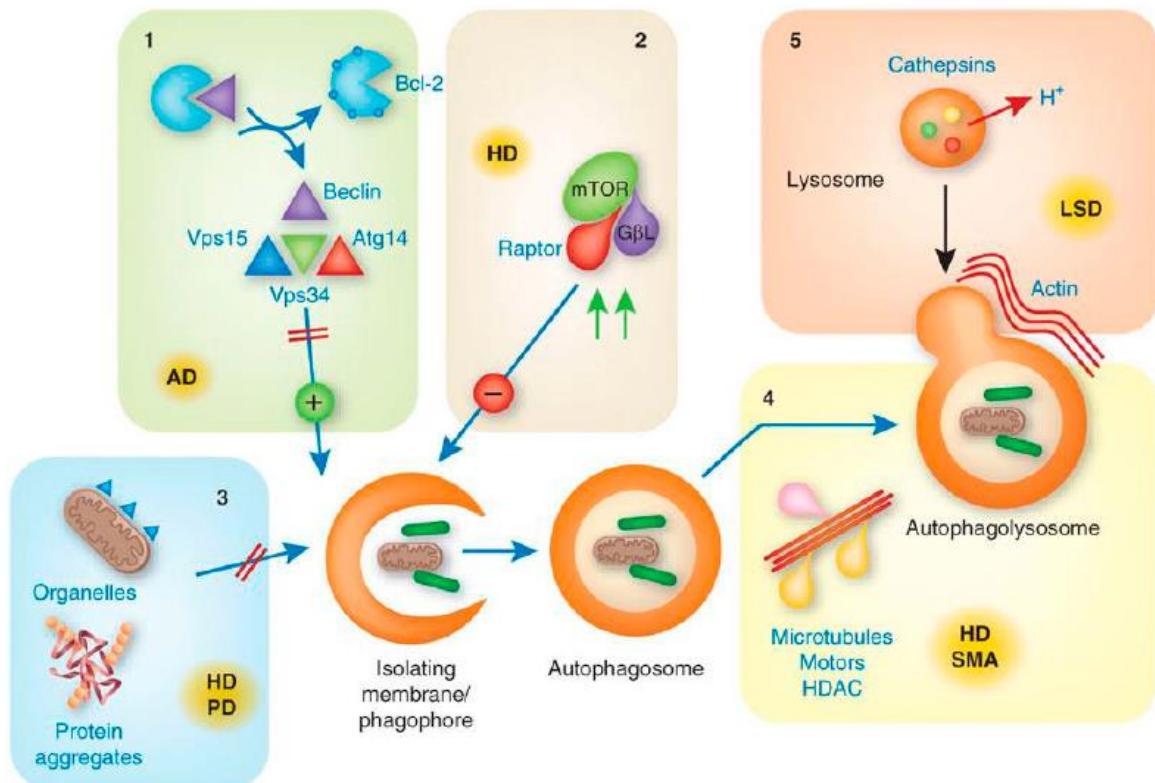
Las alteraciones en la autofagia podrían estar conectando tanto con la **formación de agregados** como con **disfunciones mitocondriales**. La autofagia es uno de los mecanismos capaces de eliminar ambos tipos de daño. Durante el proceso de autofagia, se forma un **fagóforo** que envuelve a todo **aquello que se quiera eliminar**. El autofagosoma se une con un lisosoma, **degradando el contenido**.

En muchas enfermedades neurodegenerativas hay **defectos en la autofagia**. En un principio se creyó que había un exceso de autofagia, porque las neuronas se veían llenas de fagosomes, pero lo que ocurría realmente era que el **déficit de la misma produce la acumulación de autofagosomas**.



Hay así un déficit de autofagia que se ha visto en distintas enfermedades neurodegenerativas.
Incrementar la autofagia puede ser útil para eliminar agregados de proteína.

Macroautophagy is altered in some neurodegenerative diseases

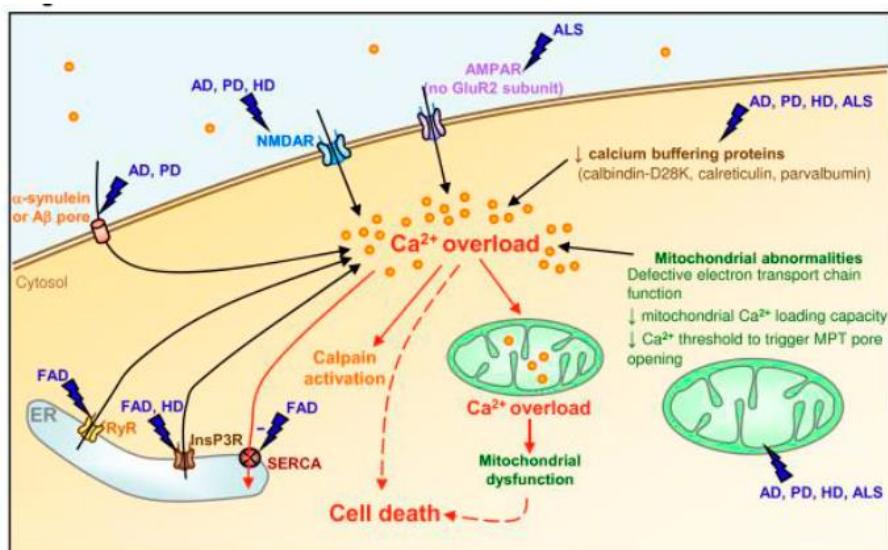


Alteraciones de la homeostasis del calcio

Hay un **papel del retículo endoplásmico, mitocondria y canales de la membrana plasmática**. En muchas enfermedades neurodegenerativas hay un **exceso de calcio neurotóxico**. Existe un proceso denominado **excitotoxicidad**.

El glutamato tiene receptores de distintos tipos, produciendo algunos un aumento fisiológico de la **entrada de calcio**. Hay situaciones en las que hay un **exceso de glutamato o una alteración de los receptores**, produce una entrada desmedida del calcio.

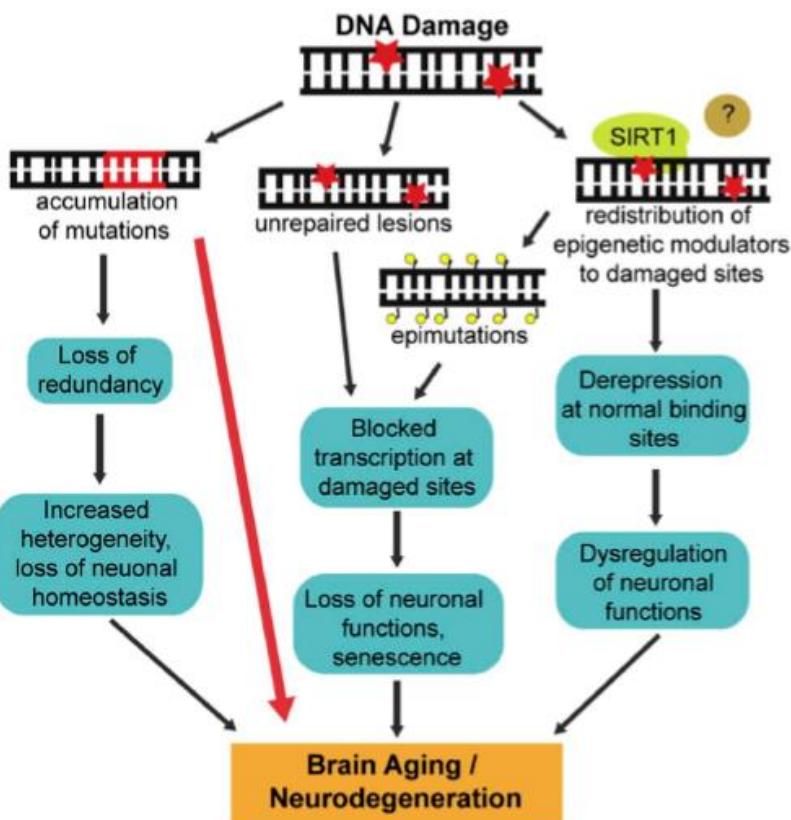
El exceso de la señalización de los receptores del glutamato, se traduce en un exceso de calcio intracelular y ese exceso de calcio intracelular provoca la activación de una serie de proteasas como puede llegar a ser calpaínas que van a producir un daño celular. Así, hay un incremento exagerado de la neurotransmisión excitatoria. También puede producir disfunción mitocondrial por **sobreexposición de calcio**, que llevaría a muerte celular de igual manera.



Daño en el DNA

Pueden ser otro proceso importante. Existen algunas enfermedades **muy raras que se deben a mutaciones en genes que codifican proteínas a mutaciones en genes que codifican para proteínas que están implicadas en la reparación del DNA** (ataxia telangiectasia, xeroderma pigmentosa...)

Tienen distintos fenotipos, siendo **enfermedades multisistémicas**. En la mayoría de ellas, **también hay fenotipos neurológicos**: microcefalias, neurodegeneración en determinadas áreas del SN...



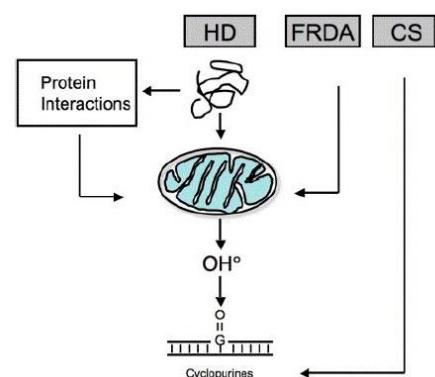
Esto sucede porque **como hay mucho daño en el DNA, se activa una apoptosis de neuronas**. Si la apoptosis se activa temprana en el desarrollo, **tendremos microcefalia**. Si ocurre más tarde, **tendrímos casos de neurodegeneración**. Los daños en el DNA también ocurren en otras enfermedades y por otras causas.

El daño **oxidativo en el DNA es el más frecuente, como consecuencia al estrés oxidativo**. La disfunción mitocondrial produce estrés oxidativo, siendo una de sus dianas el **DNA**. Estos daños en el DNA se van acumulando poco a poco.

Los daños en el DNA pueden suceder también por **distintas causas en distintas enfermedades**:

- **Mutaciones en un gen que está implicado en la reparación del DNA.**
- **Mutaciones en un gen que codifica una proteína mitocondrial. Exceso de estrés oxidativo.**
- **Mutaciones como en HTT, una proteína aberrante interacciona con otras proteínas, entre ellas con las mitocondrias. Se produce disfunción mitocondrial y con ello un daño oxidativo.**

Durante el envejecimiento, además, hay una **reducción en la eficiencia de los sistemas de reparación del DNA**. Así, esta falta estaría asociada a una menor fidelidad en la reparación del DNA.



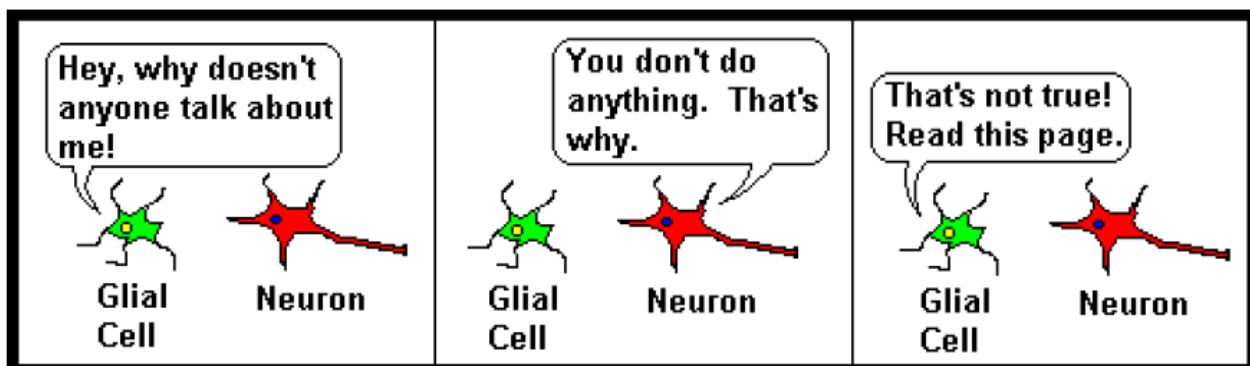
Interferencia en el transporte nucleo-citoplasmático

El transporte se encuentra regulado por toda una serie de proteínas que forma poros celulares. **En algunas enfermedades hay defectos por todo este transporte nucleo-citoplasmático.** Bastante atención.

Probablemente las terapias que funcionen sean terapias combinatorias

¿Proceso autónomo? Importancia de la glía en las enfermedades neurodegenerativas

Las células de glía pueden tener una serie de papeles fundamentales en la supervivencia y función de neuronas.



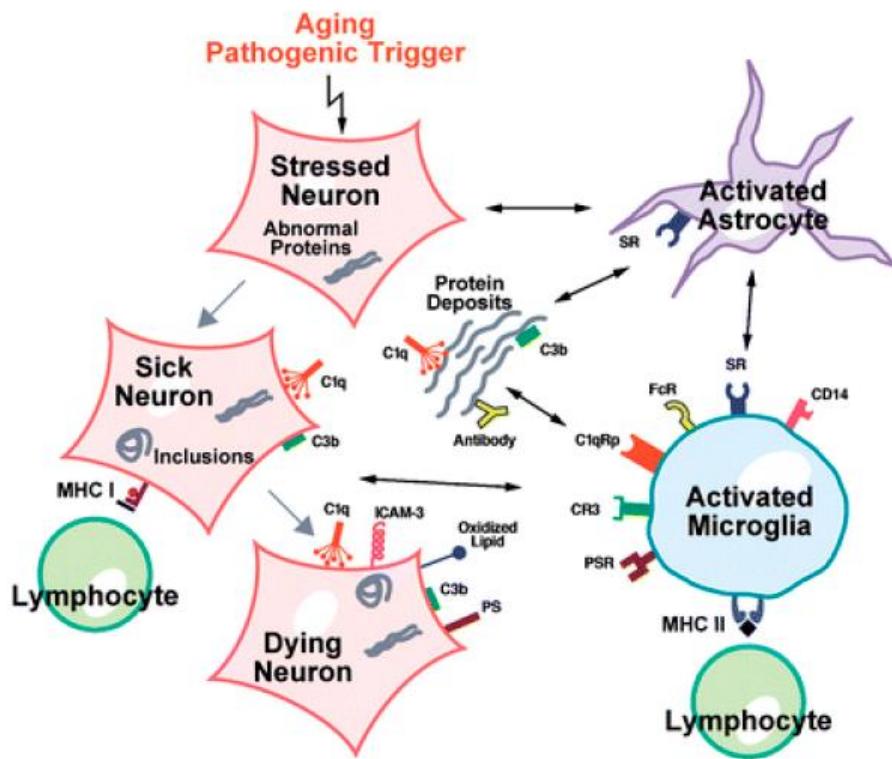
Los astrocitos pueden jugar un papel importante en procesos neurodegenerativos. Uno de los primeros resultados, fue cuando se empezaron a hacer modelos animales para modelizar ELA cuando se debe a mutaciones en la SOD1.

Usando un promotor ubicuo de la SOD1* con la mutación, se veía una degeneración de motoneuronas muy exagerada. Quisieron dirigirlo sólo a neuronas. Cogieron un promotor de neuronas y se hace el ratón correspondiente. Se hizo también con el promotor del GFAP típico de astrocitos.

Se encontraron que había poca degeneración de motoneuronas en los ratones con promotor neuronal. En el promotor astrocítico, había neurodegeneración, más que en el ratón que tenía la mutación en neuronas, sin embargo, los astrocitos no morían. Si los cruzabas, tenías todo el complemento de neurodegeneración (fenotipo igual al que se presenta usando el promotor ubicuo).

Los astrocitos con una mutación en la SOD1 se convierten en astrocitos neurotóxicos.

En distintas enfermedades neurodegenerativas hay una contribución de astrocitos y microglía. La microglía se activa por muchos factores, de manera artificial introduciendo LPS.

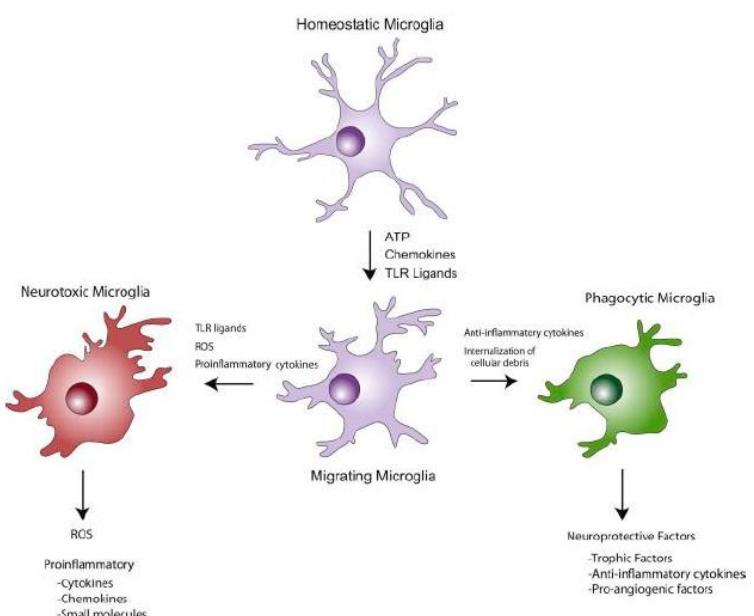


La microglía también se activa cuando hay **agregados de proteínas**, que se forman en **enfermedades neurodegenerativas**. Así, juegan un papel importante.

La activación de la microglía puede generar **dos estados de microglía**.

- **Microglía en reposo**
- **Microglía activada**
 - Dos tipos de microglía activada
 - **Fagocítica que produce factores neurotróficos.** Al fagocitar elimina residuos que pueden ser tóxicos, por ejemplo, agregados de proteínas, **produciendo factores neurotróficos y citoquinas antiinflamatorias.**
 - **Neurotóxicas.** ROS y citoquinas proinflamatorias. Es neurotóxica porque convierte a los astrocitos en **astrocitos neurotóxicos**.

Sería interesante aprender a controlar si la activación de la microglía lleva a la **neurotoxicidad o no**. En una enfermedad neurodegenerativa hay una mayor actividad de la microglía neurotóxica.



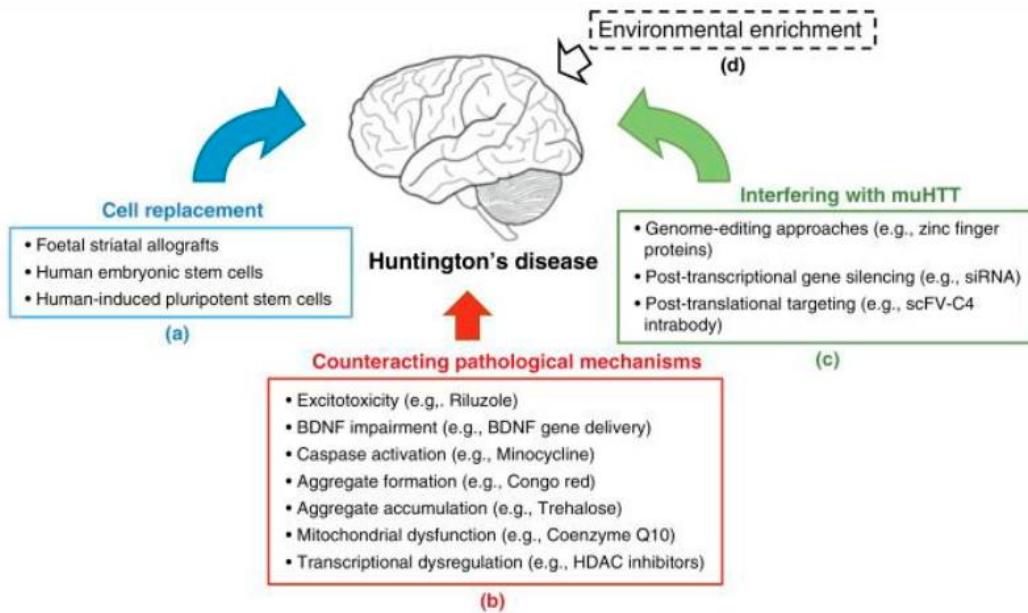
Los astrocitos reactivos también tienen una clasificación parecida:

- **Astrocitos en reposo**
- **Astrocitos activados.** Mayor cantidad de **GFAP**, un tipo de filamento intermedio, y ramificaciones más grandes.
 - **A1.** Son los que proporcionan un factor neurotóxico. Se forman en respuesta a **IL-1 α , TNF y C1q**, secretados por microglía. **TGF β y FGF impiden esta transformación.**
 - **A2.** Estimulan la producción de factores neurotróficos. Se producen en situaciones de isquemia.

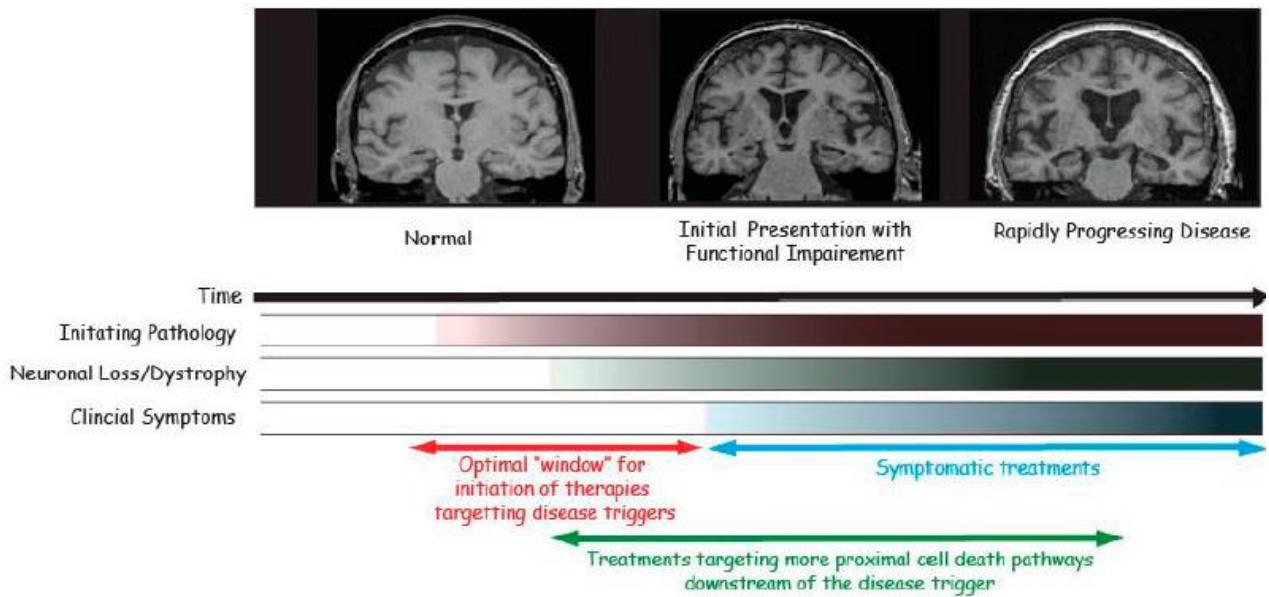
Perspectivas para la terapia de enfermedades neurodegenerativas

La situación es **complicada**. Enfermedad de HTT. ¿Qué tipo de aproximaciones terapéuticas?

- Eliminar la mutación con técnicas edición genética, iRNA...
- Liberarse de los oligómeros tóxicos
- Contratar la excitotoxicidad, activación de caspasas, formación de agregados, disfunción mitocondrial...
- Reemplazar neuronas



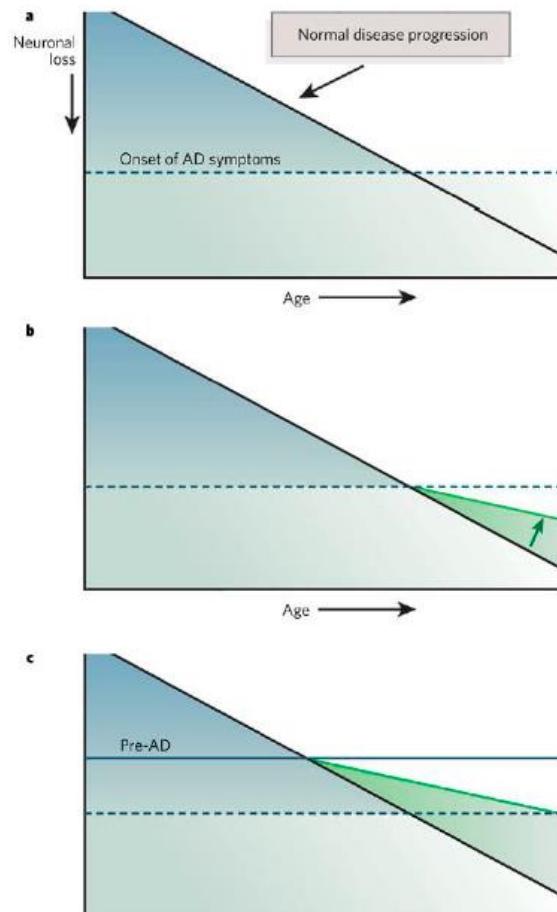
El mayor problema para el desarrollo de terapias neurodegenerativas es que quizás es complicado. **En una enfermedad neurodegenerativa, comienza la patología y se pierden sinapsis y neuronas.** Eso va, poco a poco hasta que se supera un umbral en el que aparecen los primeros síntomas de la enfermedad, cuando ya hace tiempo que ha comenzado.



La ventana óptima para las terapias dirigidas contra la enfermedad ocurre antes de que aparezcan los síntomas. **A partir de que se dispara el proceso patológico, son parcialmente irreversibles.**

Si el fármaco retrasa la progresión de la enfermedad, aumentamos mucho los años sin síntomas clínicos. Si aplicamos la misma terapia con el mismo efecto, **antes de que se produzcan los signos clínicos, tendríamos más calidad de vida.**

En el desarrollo de terapias, quizás sea más importante buscar sistemas de diagnóstico precoz, para poder implementar terapias que retrasen el desarrollo de la enfermedad y sus efectos.



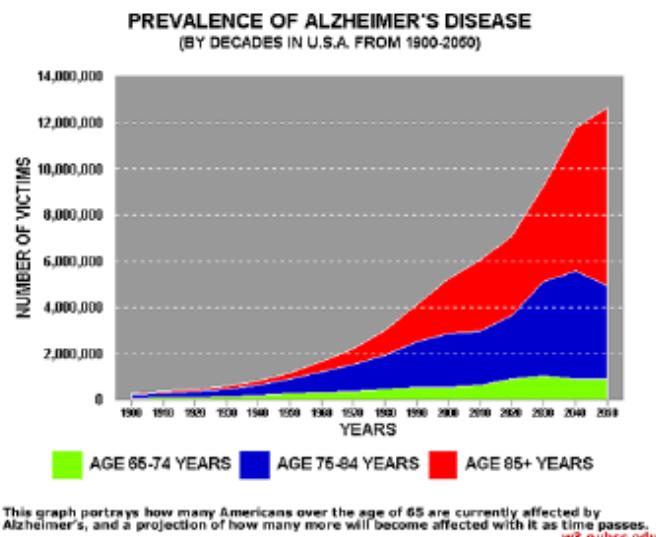
Bases Moleculares de la Patología II

Enfermedad de Alzheimer – 11-02-2019

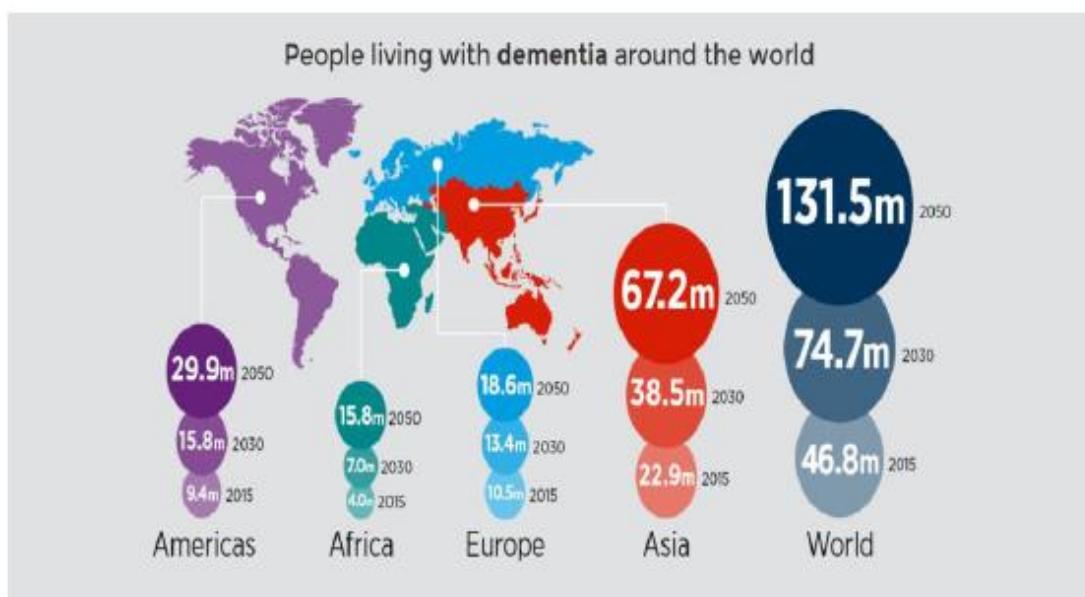
Existen distintos tipos de demencias, **siendo todas enfermedades neurodegenerativas que afectan a la corteza cerebral.**

Entre personas de 60-65, la prevalencia es del 1%. Por encima de los 90 años, la incidencia se dispara a un 40%. Según nos hacemos más viejos, **la prevalencia a demencia es mayor.**

The Prevalence of Dementia	
Age Group	International Prevalence Rate
60 – 64	1.3 %
65 – 69	2.2 %
70 – 74	3.8 %
75 – 79	6.5 %
80 – 84	11.6 %
85 – 89	20.1%
90 +	41.5%



Como consecuencia del envejecimiento de la población, hay algunas estimaciones llamativas. Ahora mismo hay 46,8 millones de personas con demencia; que podrían llegar a 130 millones en 2050. Es un grave problema social y sanitario.

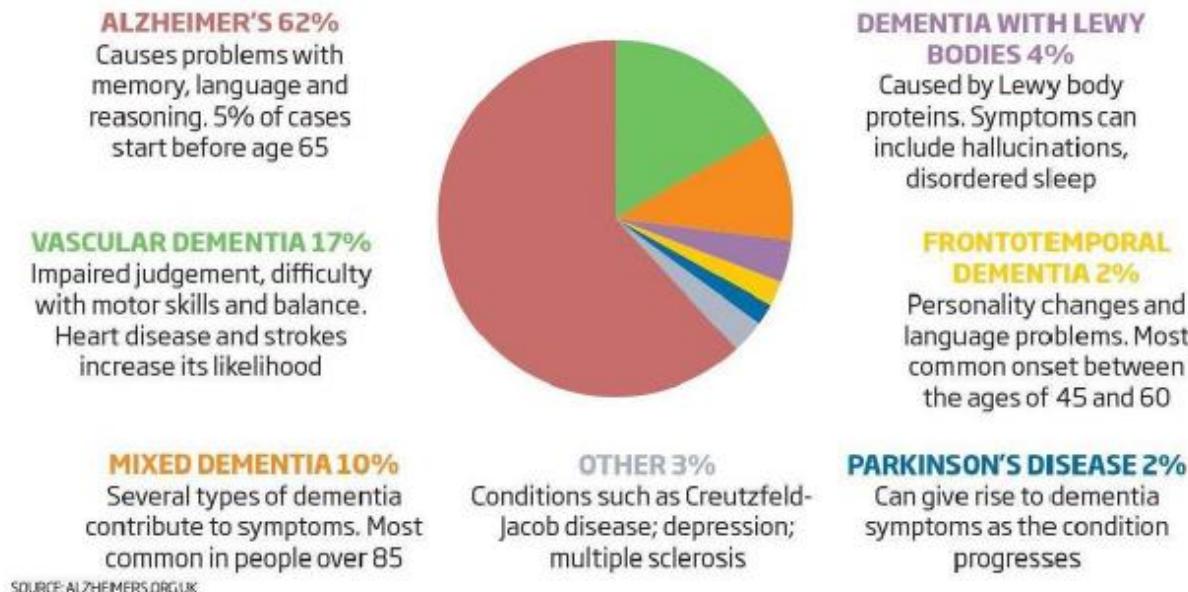


Las demencias, y entre ellas la enfermedad de Alzheimer, se caracterizan por una pérdida progresiva de las funciones cognitivas: **problemas para realizar tareas familiares, dificultades con las palabras, para solventar problemas...** En determinadas demencias predominarán unas más que otras dependiendo de los tipos de corteza que se ven afectadas.

Son enfermedades progresivas, es decir, se van expandiendo y al final los pacientes con demencia tienen todos los síntomas propios de la neurodegeneración cortical. Son así enfermedades con un gran impacto social.

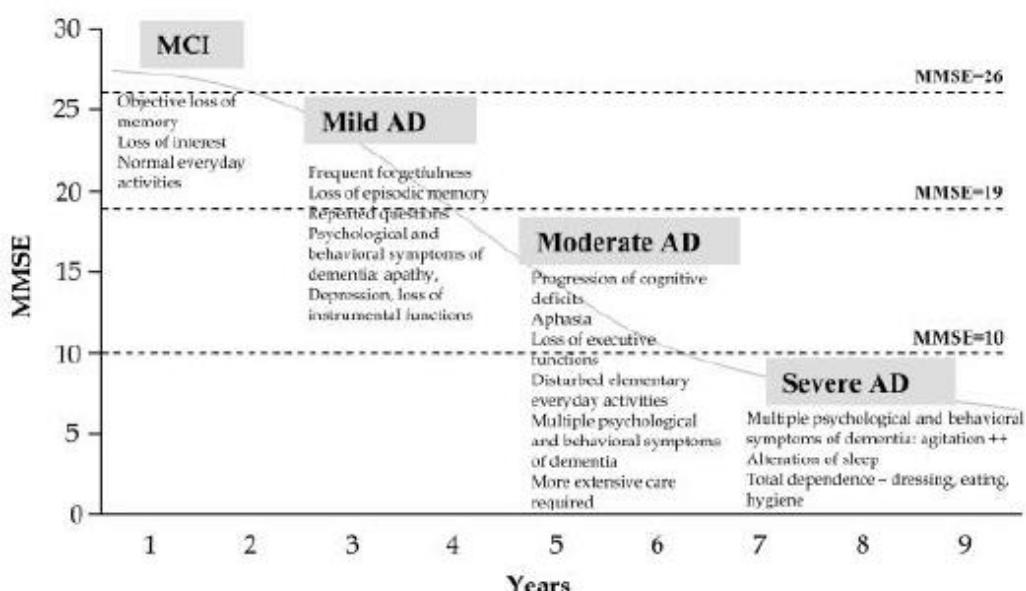
Hay varias demencias, la más frecuencia en un más de un 60% de los casos es Alzheimer. 17% demencias vasculares, su origen estaría en la vasculatura siendo secundaria la neurodegeneración. La demencia frontotemporal o la asociada a la enfermedad de Parkinson podrían ser otros ejemplos.

Dementia is not one thing. There are several routes to similar symptoms



Durante el desarrollo de la enfermedad, se habla de distintas fases:

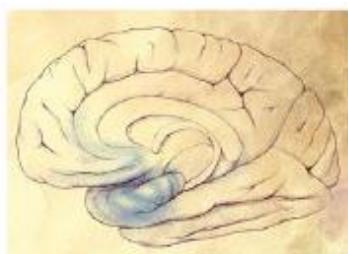
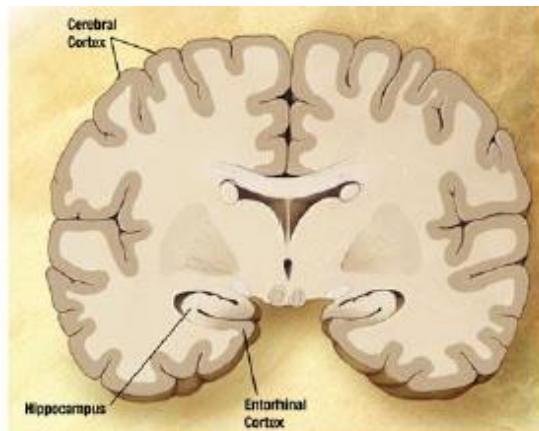
- **Deterioro cognitivo leve.** Se puede dar en otras personas mayores y que no necesariamente va a conducir a la demencia. Se caracteriza por una pérdida de memoria e interés en actividades del día a día.
- **Distintas escalas clínicas.** Se habla de enfermedad de Alzheimer leve, moderada y severa. Estas calificaciones están relacionadas con escalas como la MMSE.



Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer comienza con una **fase preclínica**. Se ha estimado que puede ser de 10-20 años de duración. Es una fase larga en donde hay un proceso de neurodegeneración en la que no aparecen los síntomas.

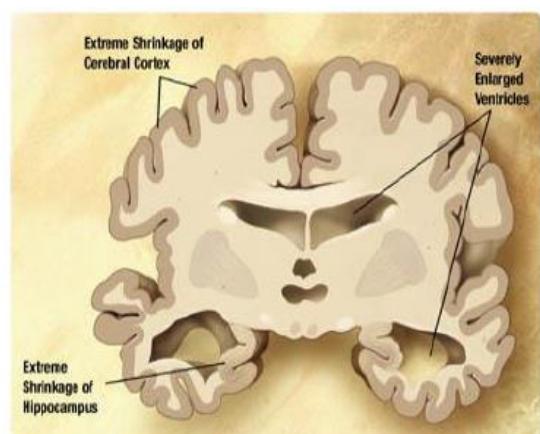
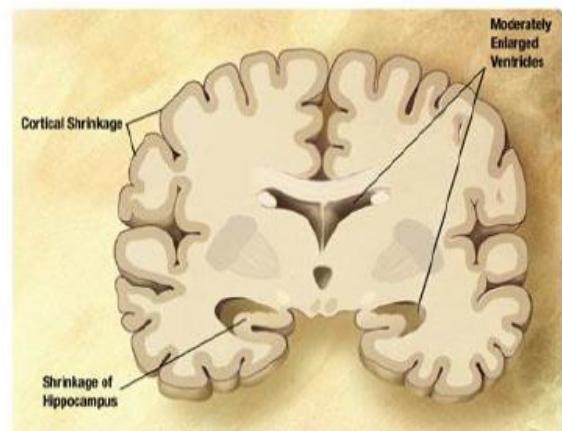
Los primeros síntomas que aparecen son la **pérdida de memoria**. El primer cambio objetivo es una **atrofia del hipocampo y la corteza entorhinal**.



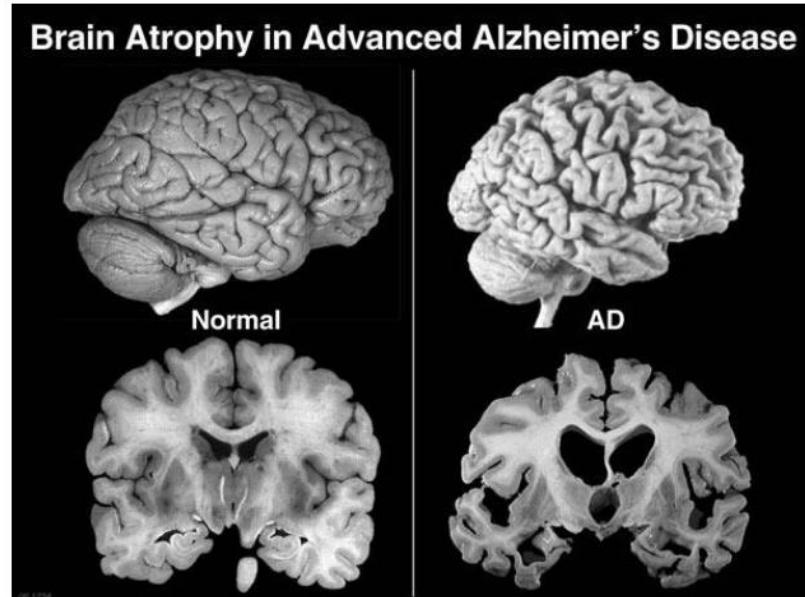
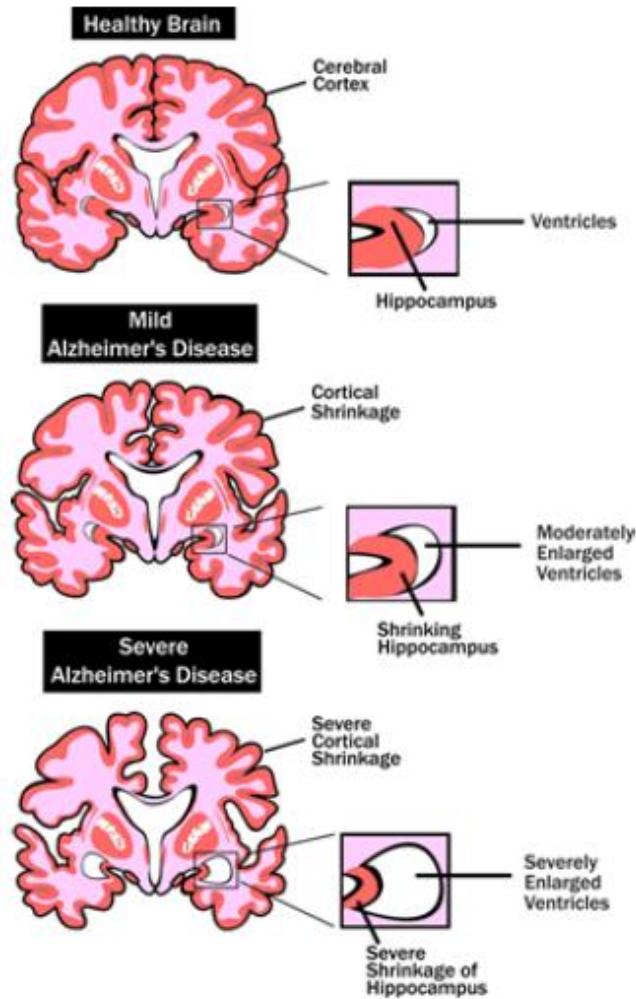
En la fase moderada de la enfermedad, **comienza a afectar a otras partes del cerebro**. La **atrofia del hipocampo se puede visualizar con técnicas de resonancia**. Los ventrículos estarían aumentados a costa de la reducción del hipocampo. Tendríamos signos de confusión, ansiedad incrementada y cambios de personalidad.

En el estadio moderado de la enfermedad, además, otros síntomas que se pueden ver son la **pérrida de memoria y la confusión, problemas con el reconocimiento de personas, dificultad con el idioma y los pensamientos, agitación y frases repetitivas**.

En la fase severa, la **enfermedad se ha expandido por toda la corteza cerebral**. Incluyen **crisis epilépticas, pérdida del control de los esfínteres, ventrículos muy grandes y sustancia gris reducida**. Se observa una gran atrofia con respecto a un cerebro normal.



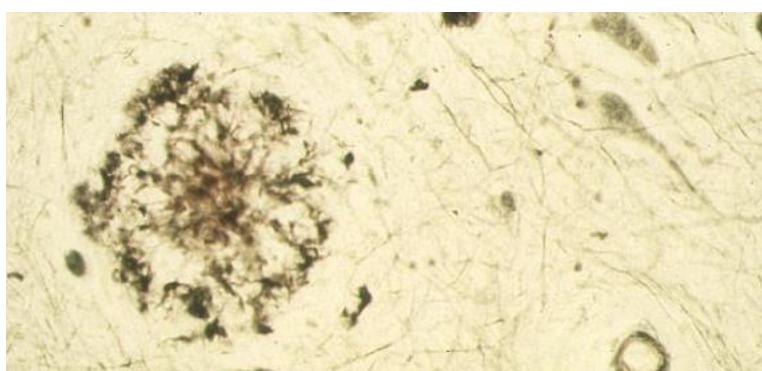
Dicha atrofia, marcada en los estadios avanzados de la enfermedad de Alzheimer se ve en los otros tipos de demencias. Resulta difícil hacer un diagnóstico preciso de si la enfermedad es una enfermedad de Alzheimer o no.



El diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, se hacía solo post-mortem. Esta enfermedad tiene unos marcadores **histopatológicos característicos**. Hoy en día, **existen sondas que nos permiten identificarlos por PET**.

Los marcadores histopatológicos de la enfermedad de Alzheimer son dos, siendo agregados de proteínas:

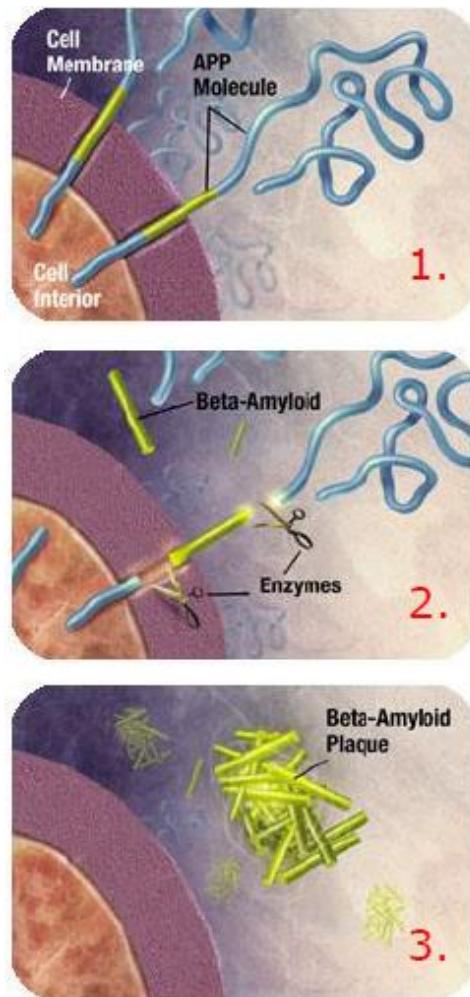
- **Extracelulares.** Placas de amiloide o placas seniles.
- **Intracelulares.** Ovillos neurofibrilares. Aparecen también en otras enfermedades.



Placas de amiloide

Formados por un pequeño péptido denominado **β-amiloide** que se agrega extracelularmente. Procede de la proteína APP (proteína precursora del amiloide). Se puede procesar **proteolíticamente** de diversas maneras, generándose el péptido **β-amiloide (A_β o βA)**.

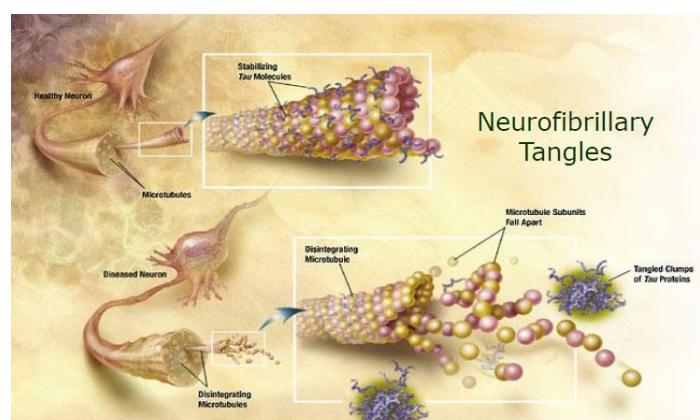
En la enfermedad de alzheimer, **muchos de estos agregados interfieren con el funcionamiento de las neuronas**. Esto, **afecta al hipocampo y a otras áreas de la corteza cerebral**.



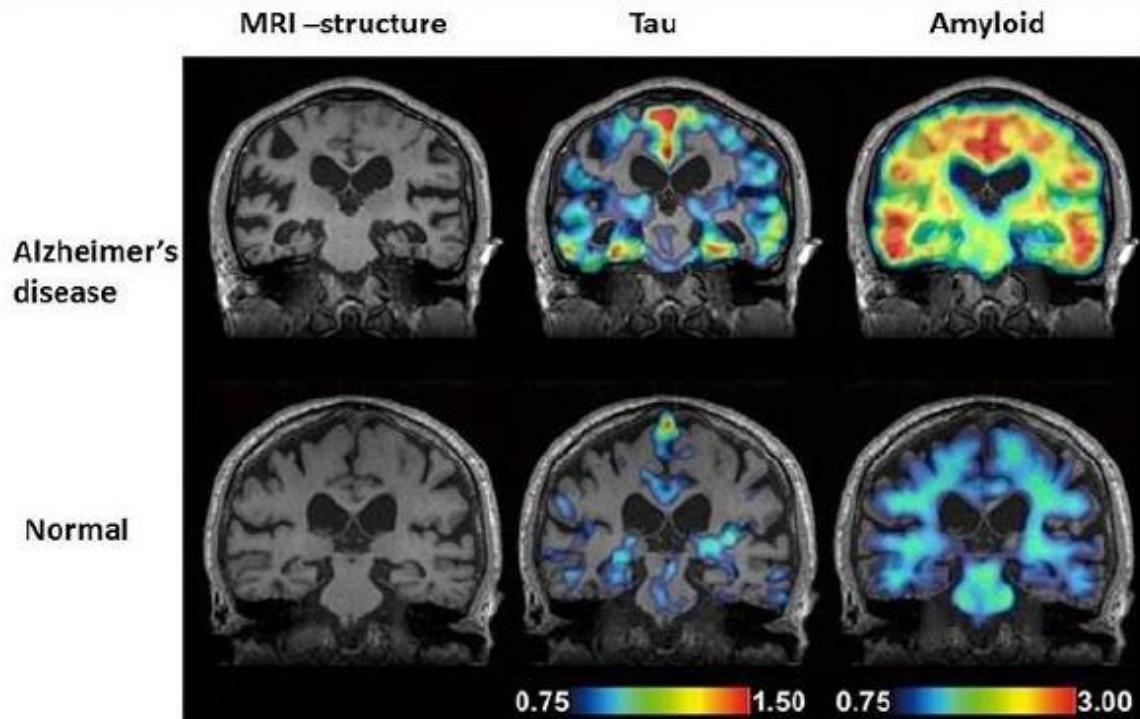
Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares están formados por la proteína tau, una proteína que en situación fisiológica es **estabilizadora de microtúbulos**. En la **enfermedad de Alzheimer**, se produce una **hiperfosforilación**, separándose de los microtúbulos, haciendo que se desintegren. Tau se agrega formando **filamentos helicoidales apareados (PHF, paired helical filaments)**, formando los **NFT (neurofibrillary tangles)**.

Cuando hablemos de la patogénesis molecular de la enfermedad, entenderemos por qué se forman estos ovillos neurofibrilares.



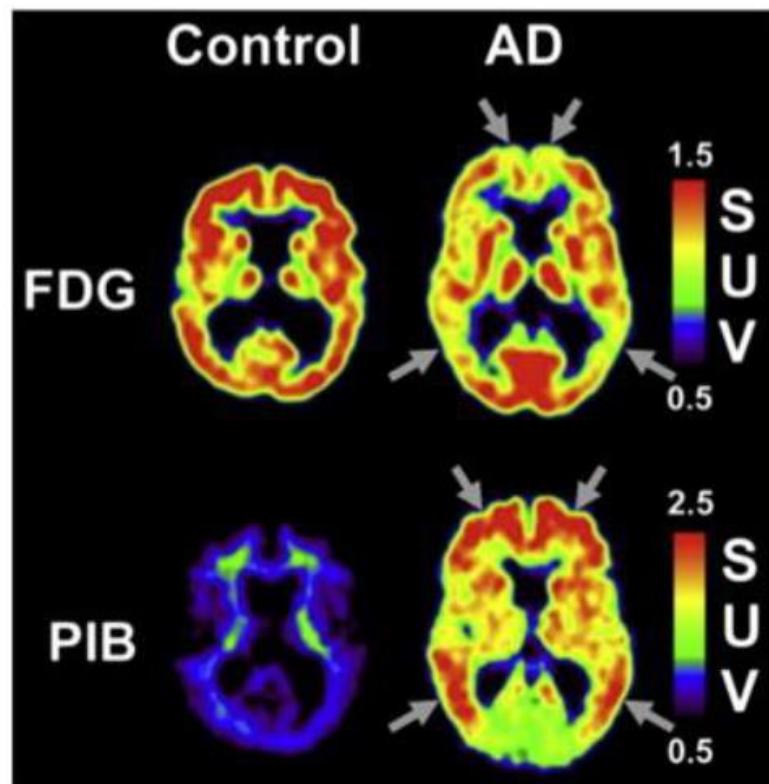
En la actualidad **dispones de sondas que se unen a placas de amiloide y los ovillos neurofibrilares**. Para un cerebro normal, no hay acumulación de proteínas tau apenas y un poco de placas de amiloide. En **un sujeto con Alzheimer, se forman mucho más estos ovillos neurofibrilares**.

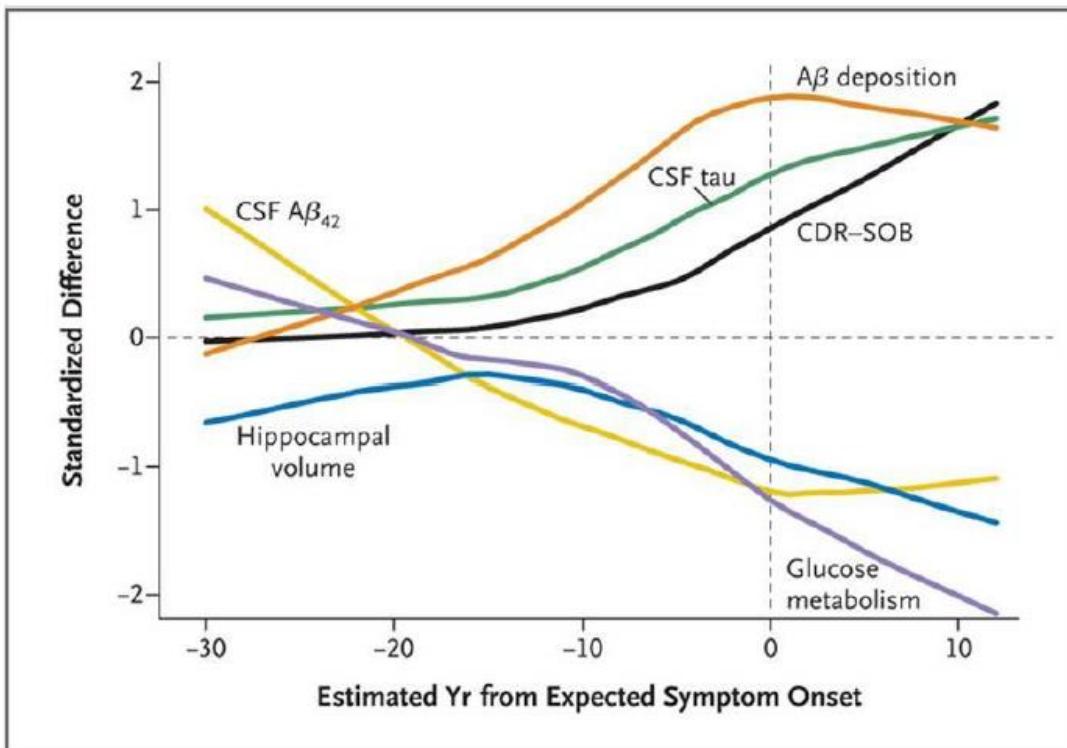


Biomarcadores en la Enfermedad de Alzheimer

Se ha intentado caracterizar la enfermedad usando **biomarcadores**. Una de las características de la enfermedad de Alzheimer es que hay un **hipometabolismo de glucosa asociado a la enfermedad**. El metabolismo de glucosa se puede ver con **fluorodesoxiglucosa con PET**. PIB es la sonda que se une a β -amiloide. Hay ciertas regiones donde aumenta PIB, mientras que en esas mismas disminuye el metabolismo de la glucosa.

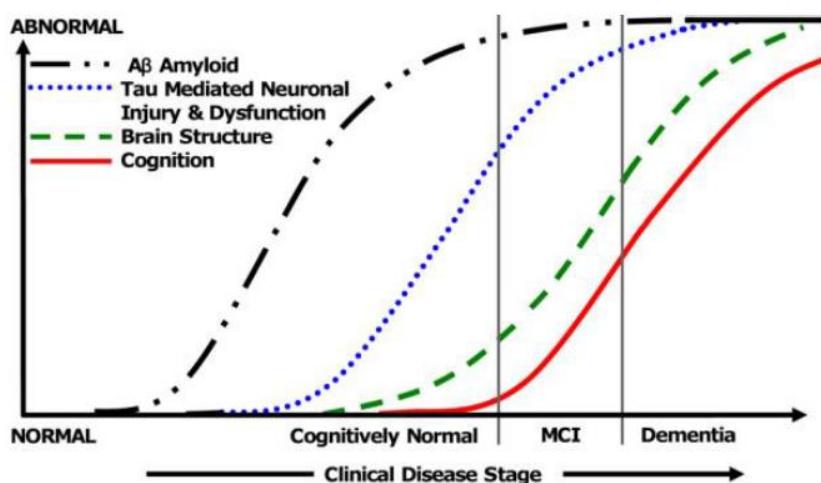
Se han hecho muchos estudios de posibles biomarcadores. **Ahora tendríamos una idea clara de cómo evolucionan a lo largo del progreso de la enfermedad**.





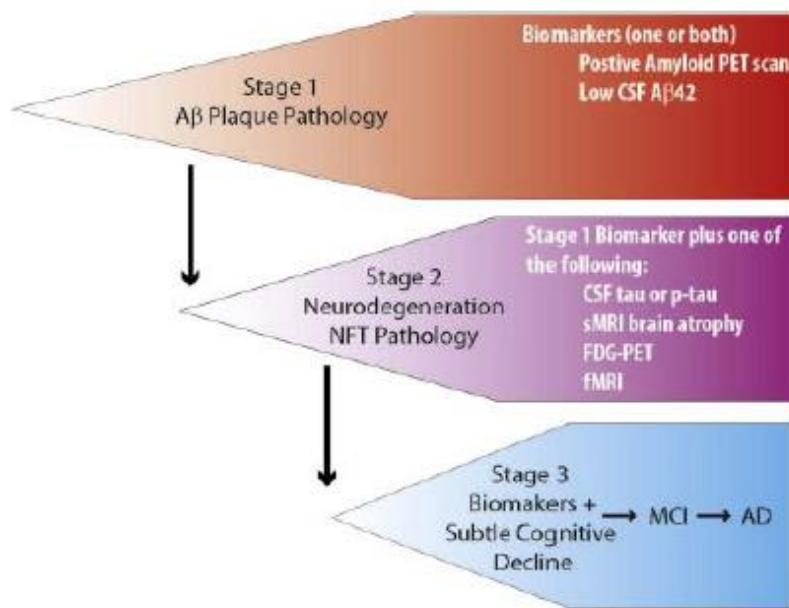
- **Niveles del A β .** En líquido cefalorraquídeo comienza a disminuir. Cada vez tiene menos péptido β -amiloide, porque la cantidad de péptido soluble es menor (se está agregando)
- **Consumo de glucosa.** Disminuye cuando se ensaya mediante PET.
- **Depósito de agregados de β -amiloide.** Aumenta al mismo ritmo que disminuye en CSF.
- **Volumen de hipocampo y pruebas cognitivas.** No se alteran en las fases primarias, sí más tarde.
- **Tau.** Comienza a aumentar en CSF por medio de **muerte neuronal o además, eliminación al espacio extracelular cuando comienza a ser liberada por un mecanismo activo**. Cuando comienza a aumentar, se ve que el **metabolismo de la glucosa cae en picado y el volumen del hipocampo comienza a disminuir y empezamos a notar signos clínicos (pérdida de memoria)**.

Cuando se alcanzan unos niveles determinados de biomarcadores, hay **signos clínicos de la enfermedad**. Hay muchos marcadores moleculares que aparecen mucho antes que los signos clínicos.



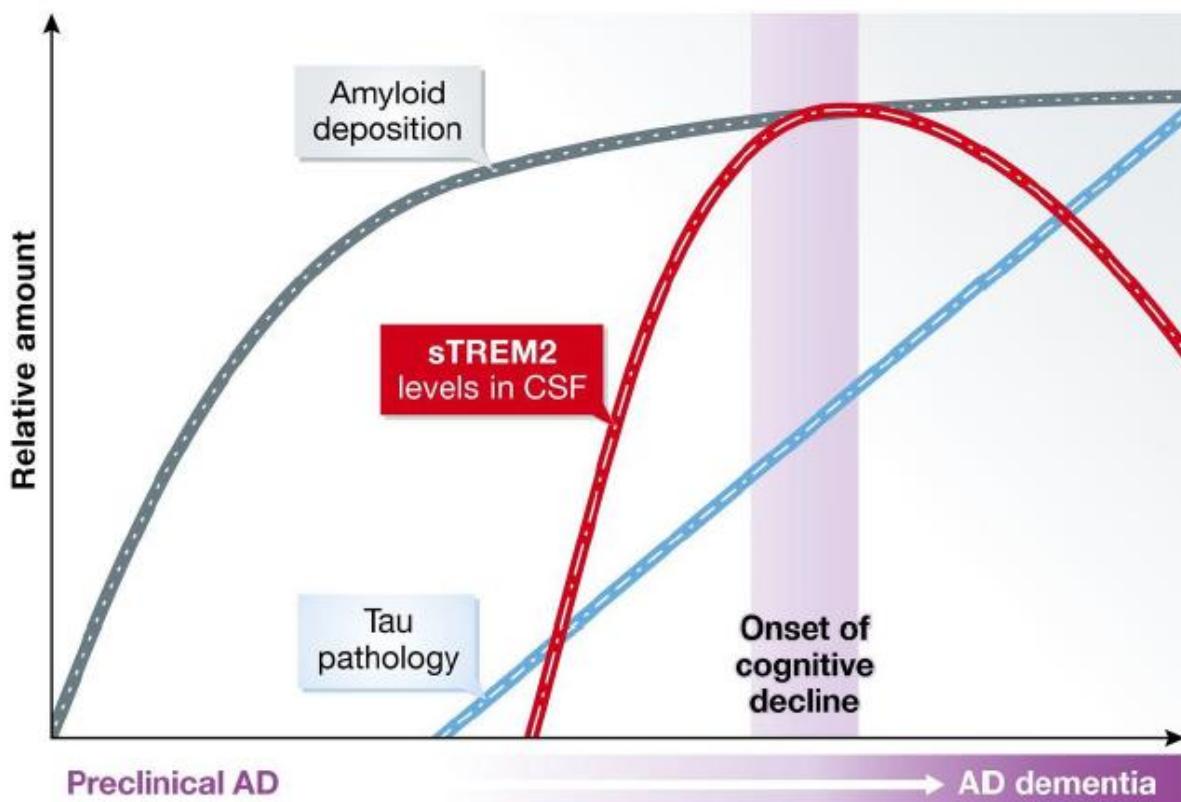
Esto nos ha permitido distinguir tres grandes fases en la enfermedad de Alzheimer.

- **Fase 1.** Caracterizada por la formación de β -amiloide. **Por PET se ven los mismos y además hay niveles bajos del péptido β -amiloide en el CSF.**
- **Fase 2.** Caracterizada **por neurodegeneración**. Atrofia cerebral, disminución del consumo de FDG y fMRI, y aparición de CSF-tau
- **Fase 3. Signos clínicos de la enfermedad.**

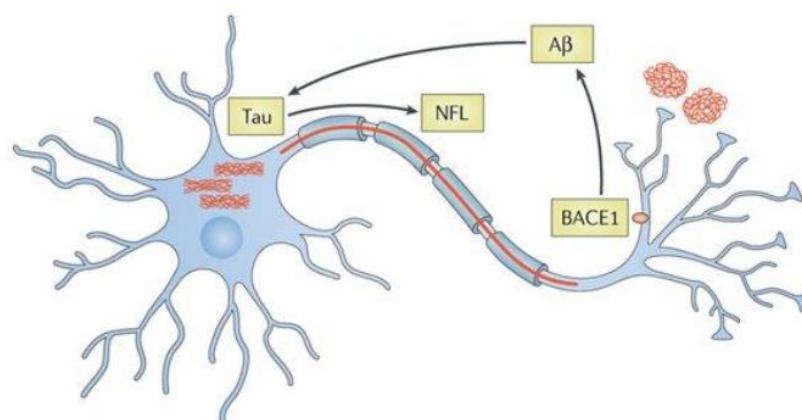


Se trabaja en **biomarcadores en el plasma sanguíneo**. Los ya presentes, **son caros de determinar**, siendo esto por lo que se buscan **biomarcadores en plasma**, fáciles de conseguir.

Nuevos biomarcadores

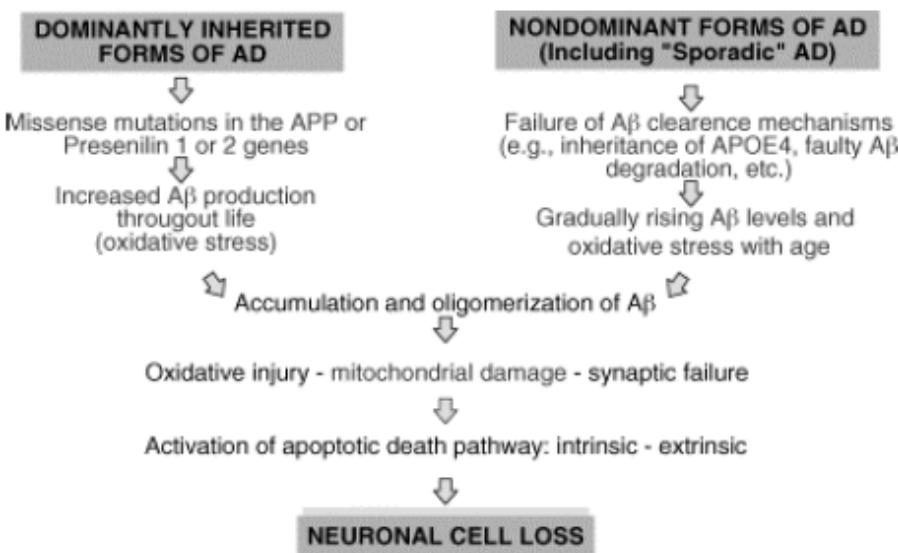


- **Niveles de la proteína sTREM2.** La proteína **TREM2** es una proteína de la microglía, de membrana. Juega un **papel importante en la enfermedad de Alzheimer**. Hay un **pico de acumulación que justo precede el desarrollo de los síntomas clínicos de la enfermedad**. Está muy asociado con el comienzo de la neurodegeneración significativa. Son **niveles en CSF**.
- **Proteínas NFL.** Se detecta en plasma sanguíneo. Es una **proteína de neurofilamentos**, filamentos intermedios. Están **concentrados en los axones mielinizados**. Como consecuencia de la degeneración de **axones mielinizados, se libera**. **No es, sin embargo, un marcador específico de la enfermedad.** Los niveles de tau y β A son muy bajos y no detectables, pero los de esta proteína, que es más estable en plasma, se la puede medir mejor.



Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano e inicio tardío

La enfermedad de inicio temprano se caracteriza por comenzar a los 50-60 y la de inicio tardío aparece después de los 70-80. La enfermedad de inicio temprano es **rara, siendo un 5% de los casos de la enfermedad de Alzheimer y es hereditaria, asociada a una serie de mutaciones dominantes.** El 95% es late-onset, siendo esporádica.

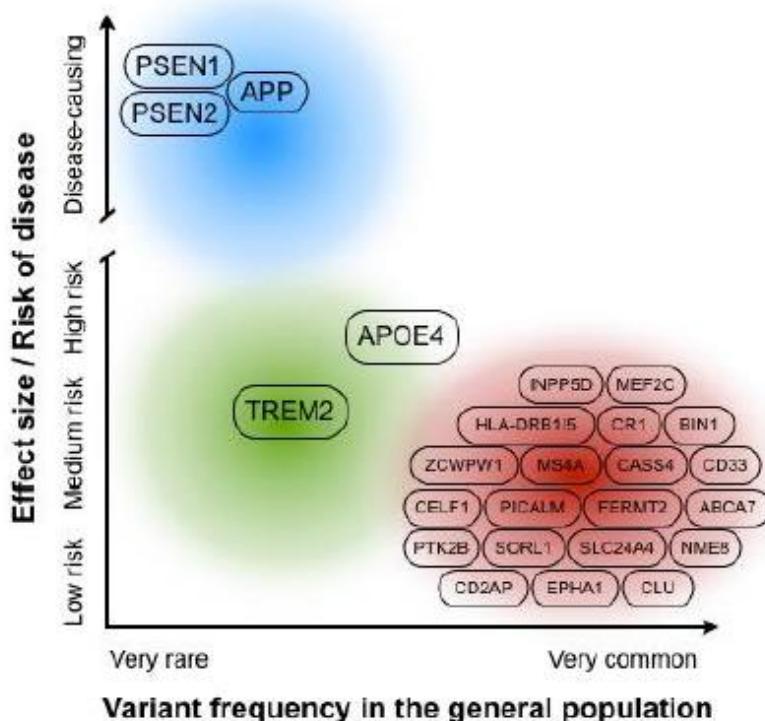


Si hacemos un estudio genético de la enfermedad de Alzheimer, existen mutaciones en tres genes que pueden determinar **enfermedad de Alzheimer de inicio temprano:**

- APP
- Presenilinas 1 y 2

Mutaciones dominantes en estos tres genes causan la enfermedad. Dependiendo de la mutación, es más o menos temprano. Existen además polimorfismos que elevan mucho el riesgo de producir enfermedad de Alzheimer, en el gen de la ApoE4 y de TREM2.

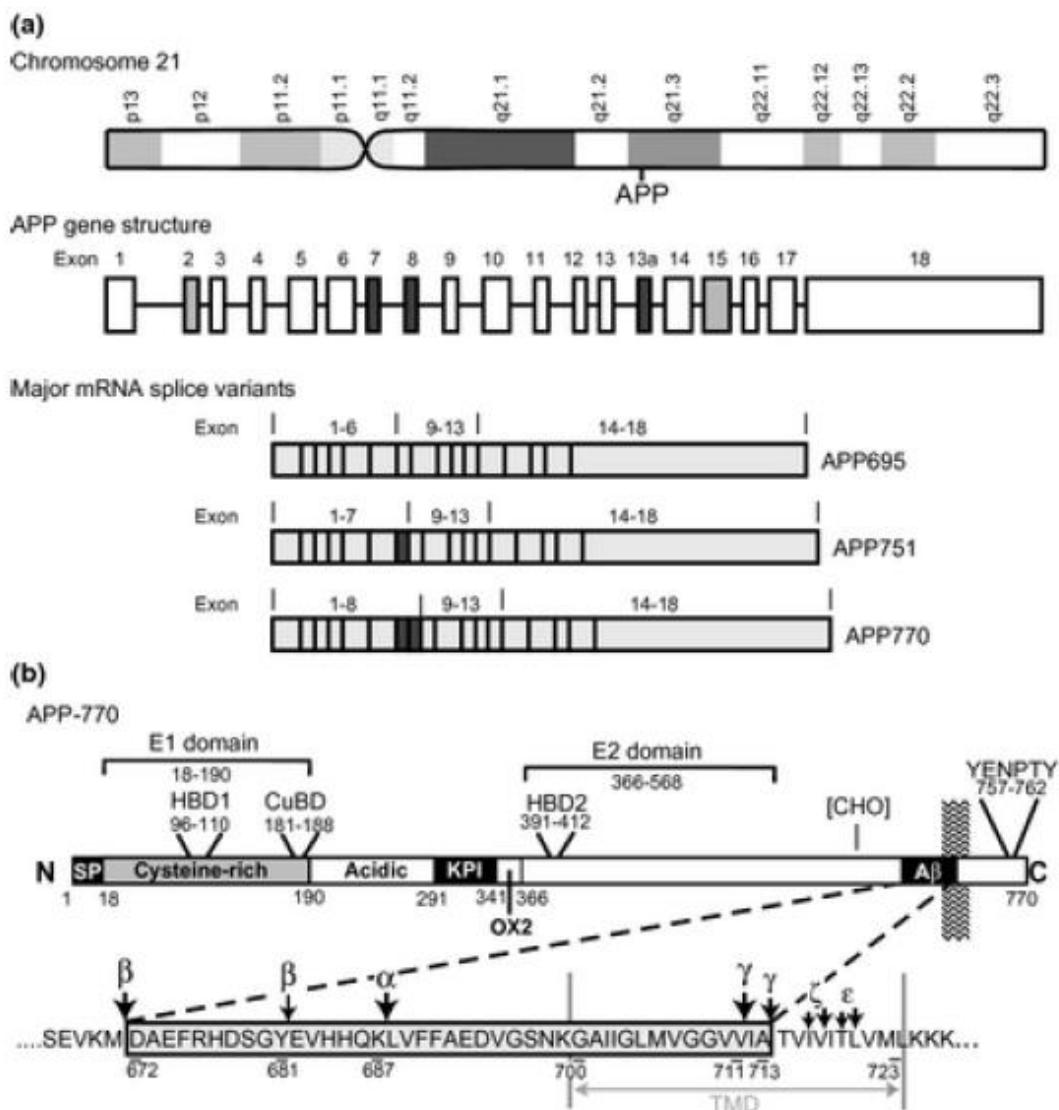
Se han visto polimorfismos en un montón de genes que confieren un riesgo más bajo de desarrollar la enfermedad.



Gen APP

Está en el cromosoma 21. Es un gen complicado, con muchos splicing alternativos, codificando una familia de proteínas. Existen mutaciones a lo largo del gen asociadas con la enfermedad. Un dato importante es que está en el cromosoma 21.

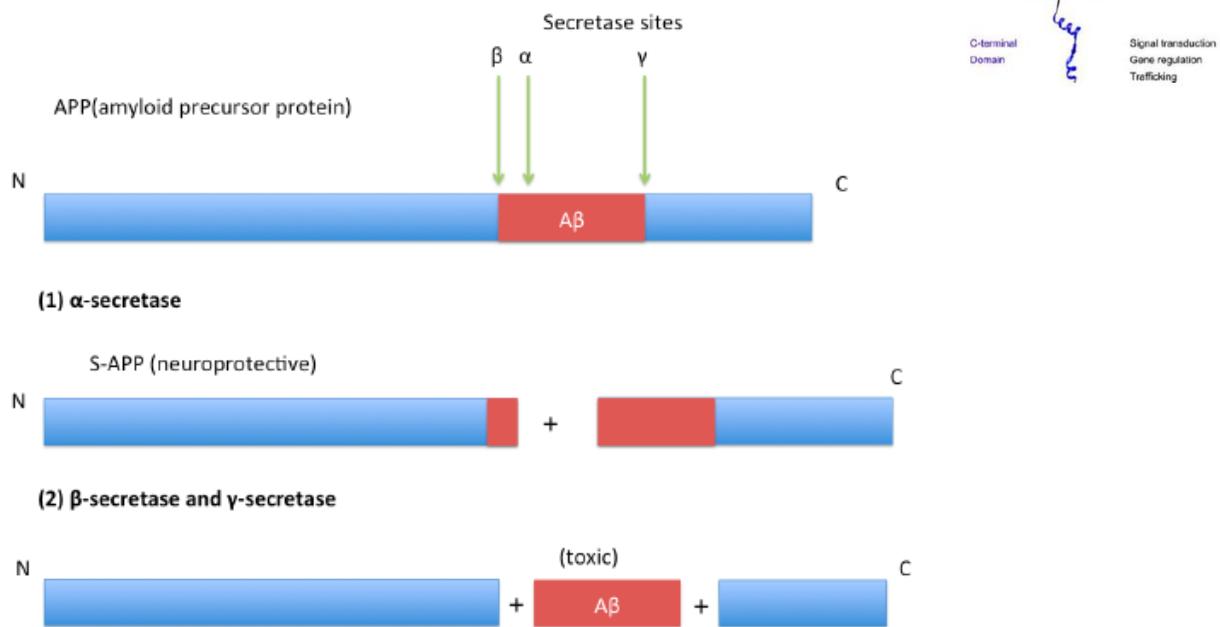
La trisomía del cromosoma 21 produce **síndrome de Down**. Se ha visto que las personas con **síndrome de Down tienen un riesgo elevado de desarrollar enfermedad de Alzheimer temprana**. Se ha sugerido que eso podría estar relacionado por una dosis extra de APP. Sin embargo, **no es causa directa de causa de enfermedad de Alzheimer**.



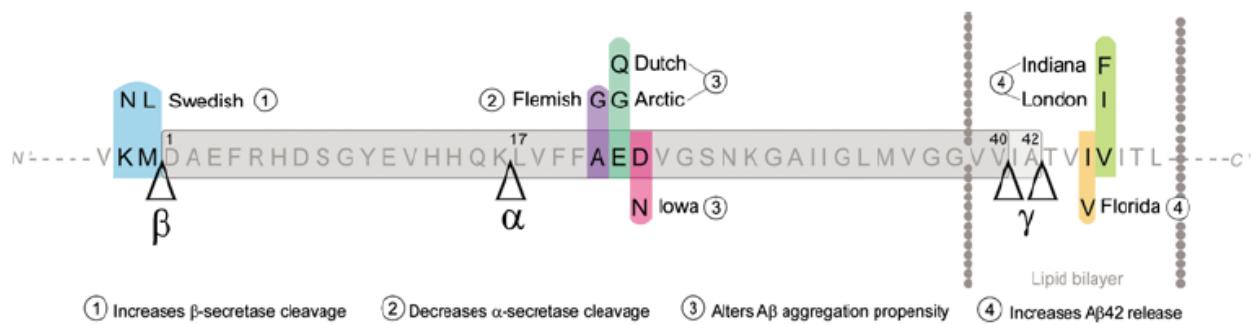
La proteína APP es una proteína transmembrana con un dominio C-terminal y una serie de dominios extracelulares de interacción con otras proteínas.

Esta proteína sufre dos tipos de procesamientos proteolíticos alternativos:

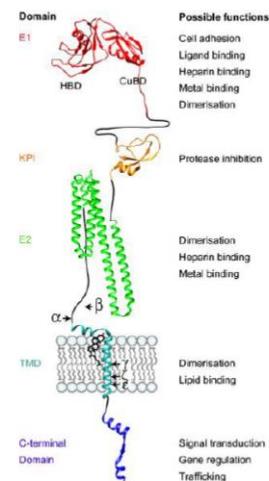
- α -Secretasa. Genera un fragmento extracelular, que se secreta y un fragmento mixto que se queda dentro de la célula
- β - y γ -secretasa generan un fragmento N-terminal más pequeño y el péptido β -amiloide.



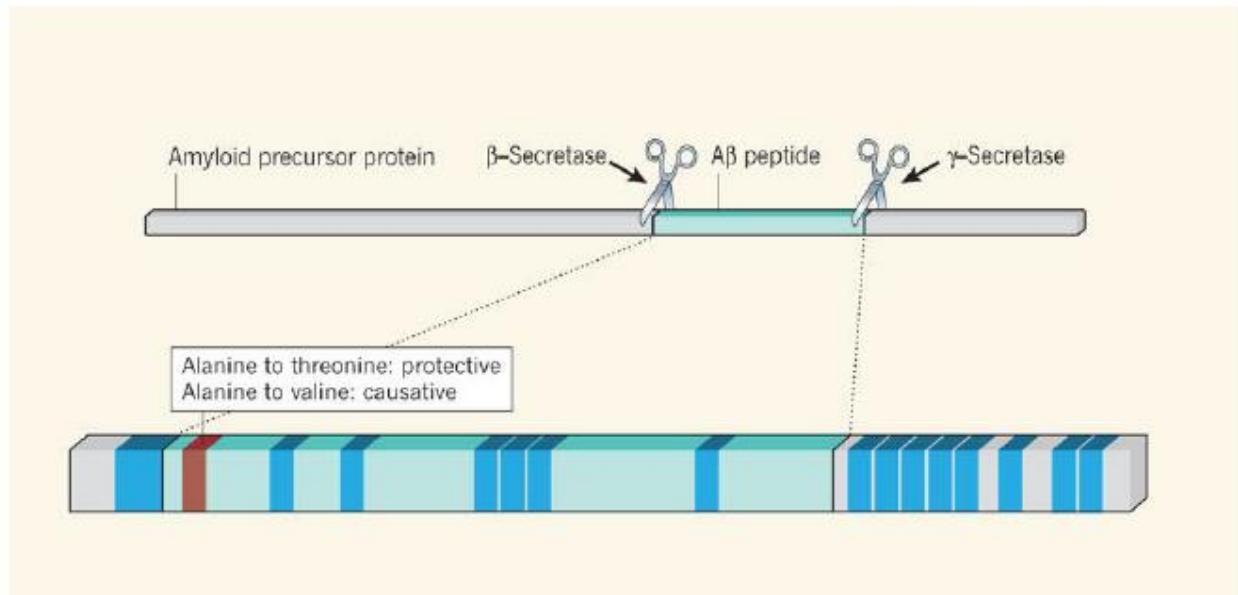
Las mutaciones dominantes en la enfermedad de Alzheimer son de **distintos tipos**:



- Alrededor del sitio de corte de la β -secretasa. Incrementan el corte de la β -secretasa.
- Alrededor del sitio de corte de la α -secretasa. Disminuyen el corte por la α -secretasa.
- No afectan al procesamiento. Mutaciones que **facilitan la posterior agregación del péptido β -amiloide**.
- Alrededor del sitio de corte de la γ -secretasa, aumentándolo. Puede generar péptidos de 40-44 aminoácidos, el más frecuente el de 42. Estas mutaciones, favorecen la formación del péptido de 42 aas. Este es el que agrega bastante mejor que el péptido de 40.



Un polimorfismo se ha visto asociado a 0 casos de enfermedad de Alzheimer (es decir, es protector frente a la enfermedad de Alzheimer). El mismo residuo que causa la enfermedad, si cambia a **threonina, disminuye mucho la afinidad por la β -secretasa**.



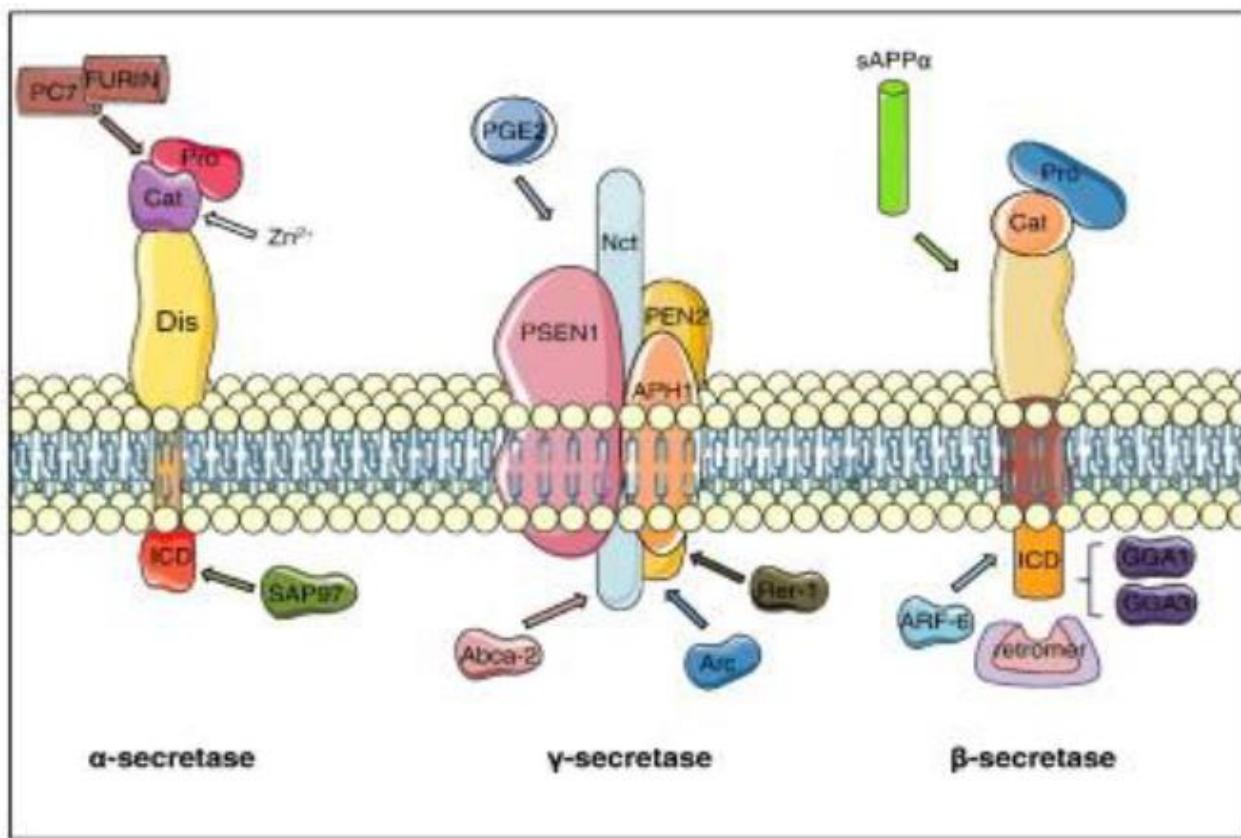
Bases Moleculares de la Patología II

Enfermedad de Alzheimer – 12-02-2019

Procesamiento y formación del péptido β -amiloide

Hay mutaciones en el gen APP que **modifican el procesamiento que tiene por la α -secretasa y la β y γ secretasa**. Los cortes realizados por la α -secretasa son **neuroprotectores**, mientras que los cortes realizados por la β y la γ secretasa forman **agregados neurotóxicos**.

Los tres enzimas están bien caracterizadas. La β -secretasa es denominada **BACE en la literatura**. La γ secretasa, por otro lado, está compuesta de varias subunidades. Una de estas subunidades es la **presenilina**.

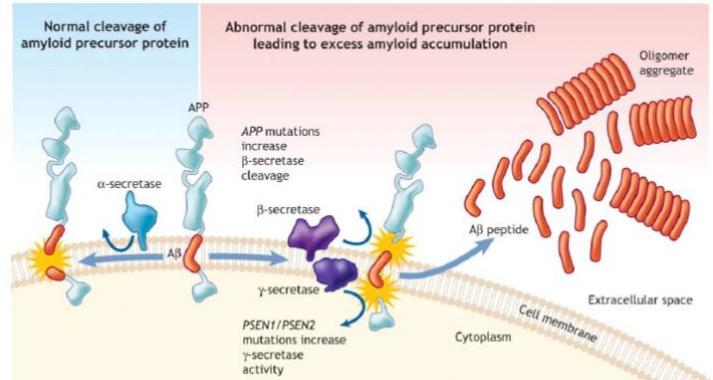
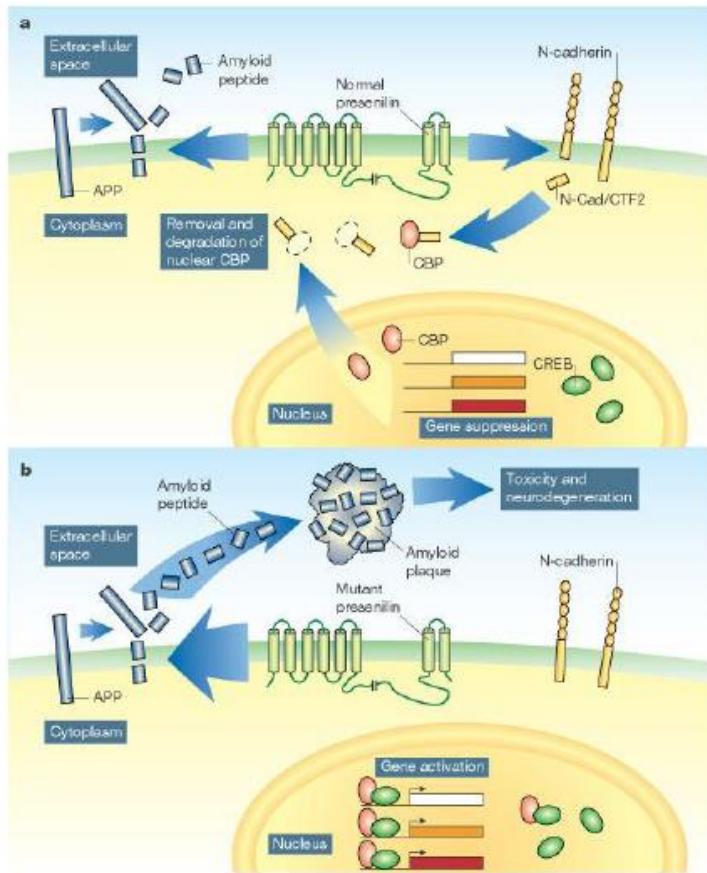


Las **mutaciones en presenilinas modifican la afinidad de la gamma secretasa hacia APP**. En condiciones fisiológicas, la γ -secretasa tiene una serie de sustratos a los que procesa que tienen relevancia en señalización celular y **procesa una pequeña cantidad de APP**. Este péptido es normalmente degradado y no da lugar a agregados.

Las **mutaciones en las presenilinas cambian la afinidad de la γ -secretasa** y se ocupa menos de sus sustratos normales **favoreciendo el procesamiento de la APP**, generándose **mucho más péptido beta amiloide formando oligómeros y agregados**.

Resumiendo, ya sea por mutaciones en APP o en la gamma secretasa, en la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano aparece un mayor procesamiento de APP por beta y gamma secretasa y eso da mayor número de agregados.

Esto sería la “hipótesis del beta amiloide”. Si ese es el origen de la enfermedad, también sería el origen de la enfermedad en los casos esporádicos.



Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

En la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, tiene una serie de factores de riesgo:

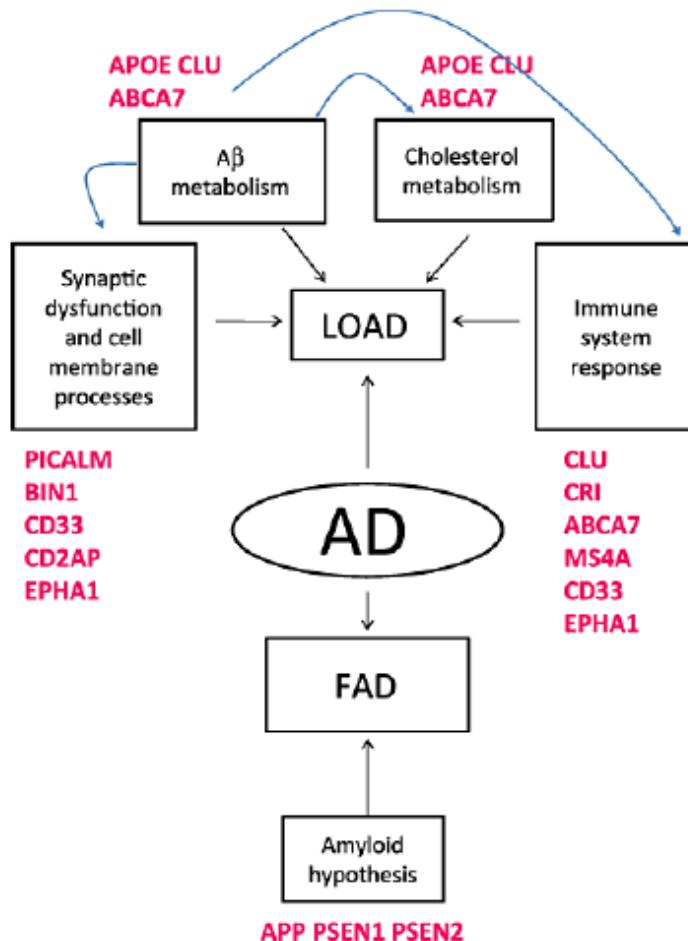
- Edad
- Genotipo del gen ApoE4
- Polimorfismos en el gen TREM2
- Polimorfismos en otros genes
- Historial familiar de demencia, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, diabetes, traumatismo craneal, estrés psicológico, hipertensión, fumar.

Hay, sin embargo, **fatores neuroprotectores**.

- Ejercicio y actividad física
- Ejercicio de la capacidad intelectual y de las habilidades cognitivas
- Dietas con alto contenido en antioxidantes
- Vitaminas suplementarias
- Estatinas
- Antiinflamatorios no esteroideos

En la enfermedad de Alzheimer familiar se planteó la hipótesis de amiloide porque las mutaciones confluyen hacia la producción de una mayor cantidad de péptido β -amiloide. En la de inicio tardío, **la cuestión es más heterogénea, cuando miramos los genes que dan factores de riesgo genético, vemos que implican distintos procesos**

- Algunos genes, como la **ApoE** o la **clusterina** están relacionados con el **metabolismo del beta-amiloide**, pero estos mismos genes también están implicados en el metabolismo del colesterol.
- Hay muchos genes implicados en la función o disfunción de las sinapsis y otros muchos que estén relacionados con la respuesta inmune innata, entendiéndolo como la microglía dentro del SNC

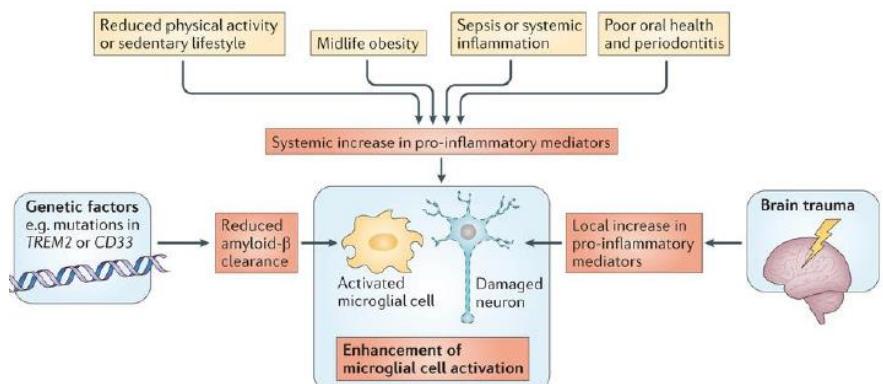


Así, hay genes relacionados con otros procesos que confieren un riesgo, **de manera que el papel del péptido β-amiloide no es tan central**.

Factores en la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

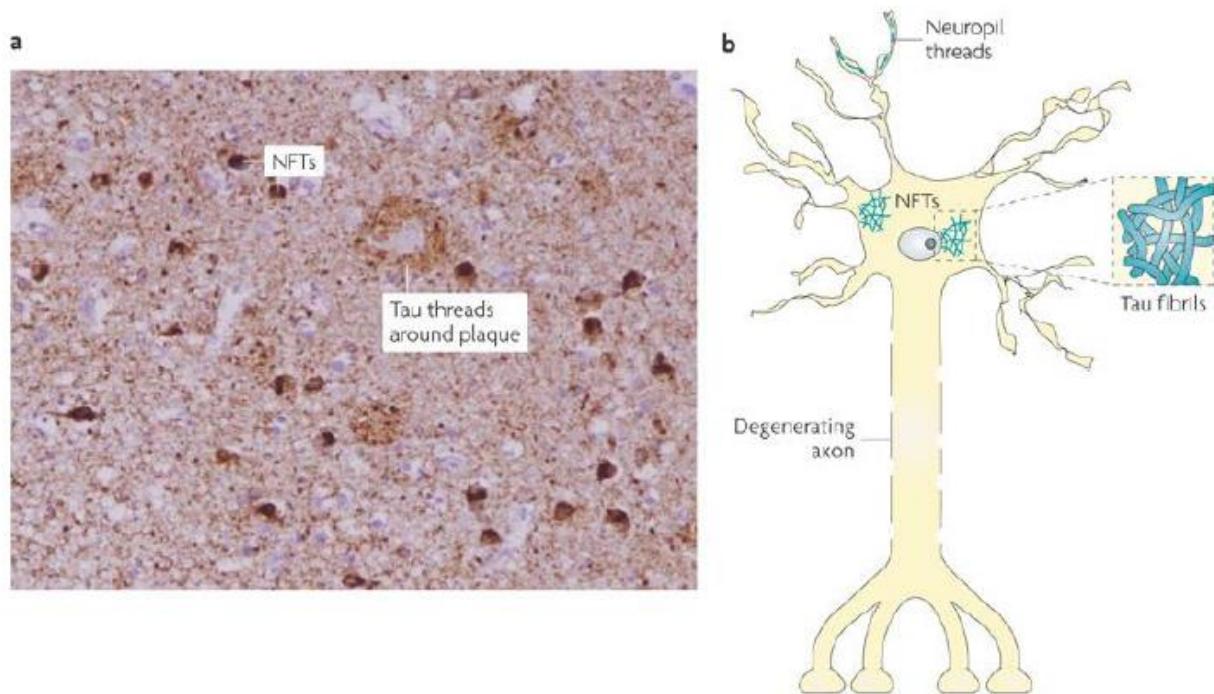
En el desarrollo de la LOAD, es muy importante la **activación de la microglía**. Muchos de los factores de riesgo dan lugar a más mediadores proinflamatorios, con ciertos **factores genéticos de riesgo que conducen a una microglía activada** (TREM2 o CD33). Como curiosidad, algunas demencias como la **demencia pugilística**, se produce en boxeadores como consecuencia de tantos golpes en la cabeza, produciéndose lesiones vasculares y algunos síntomas parecidos a los de la enfermedad de Alzheimer.

Otros factores de riesgo, como **obesidad, síndrome metabólico y vida sedentaria** también están asociados a incrementos sistémicos de mediadores pro-inflamatorios



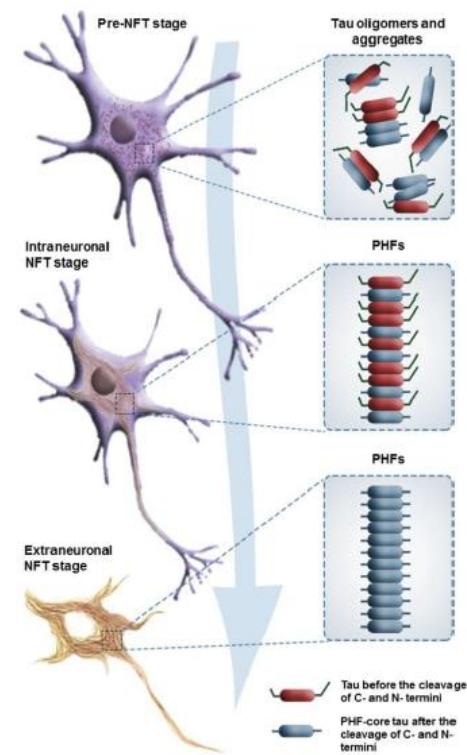
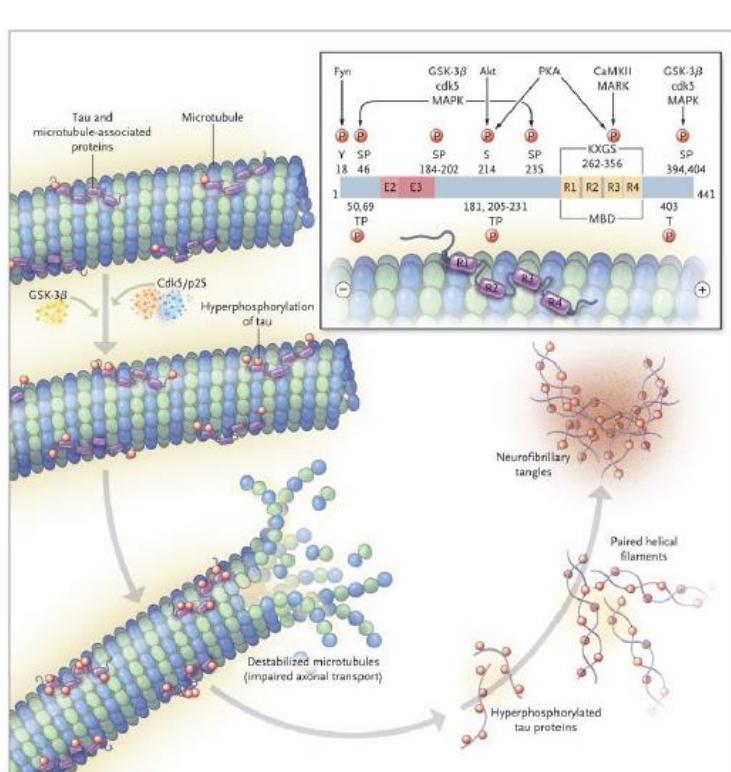
Ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer

Los **ovillos neurofibrilares** son ovillos de la proteína tau que aparecen dentro de las neuronas. Estos ovillos neurofibrilares **aparecerán en la enfermedad de Alzheimer y en otras taupatías.**



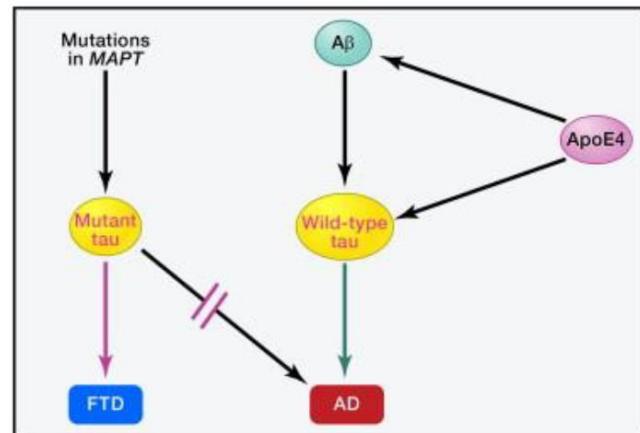
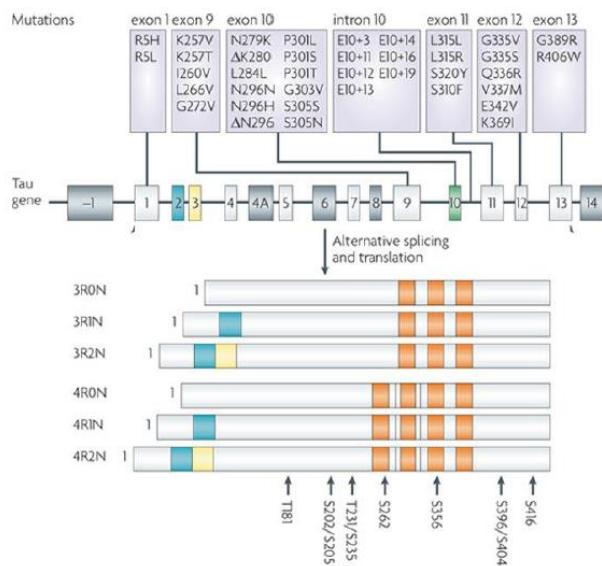
La **proteína tau** está asociada a **microtúbulos**, estabilizándolos. Estos son fundamentales en el citoesqueleto, pues es por donde va todo el transporte axonal. En las **neuronas**, el **transporte axonal y dendrítico es muy importante**.

En estas patologías, **se produce una hiperfosforilación de tau** y se desestabilizan los microtúbulos porque debido a la hiperfosforilación, esta se disocia de los microtúbulos, empezando a agregar en fibrillas que acaban formando ovillos neurofibrilares.



En la **enfermedad de Alzheimer** esto está mediado por **hiperfosforilación de tau**. No se han encontrado mutaciones asociadas a un mayor riesgo en la enfermedad de alzheimer, pero si a otra enfermedad, la **demencia frontotemporal con parkinsonismo**.

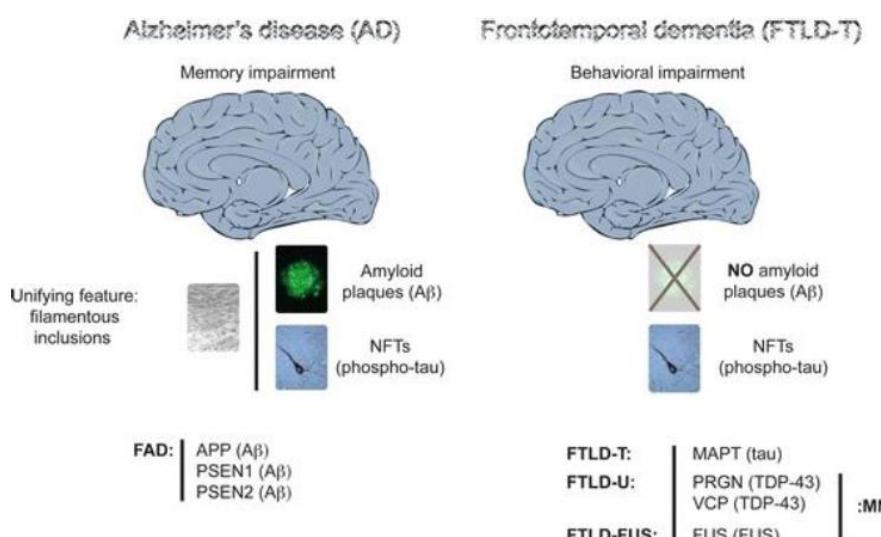
Se han descrito un gran número de mutaciones, la mayoría en **exones y otras en intrones** que dan lugar a splicings alternativos de la proteína tau. Uno de ellos provoca la FTDP17, la **demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17**.

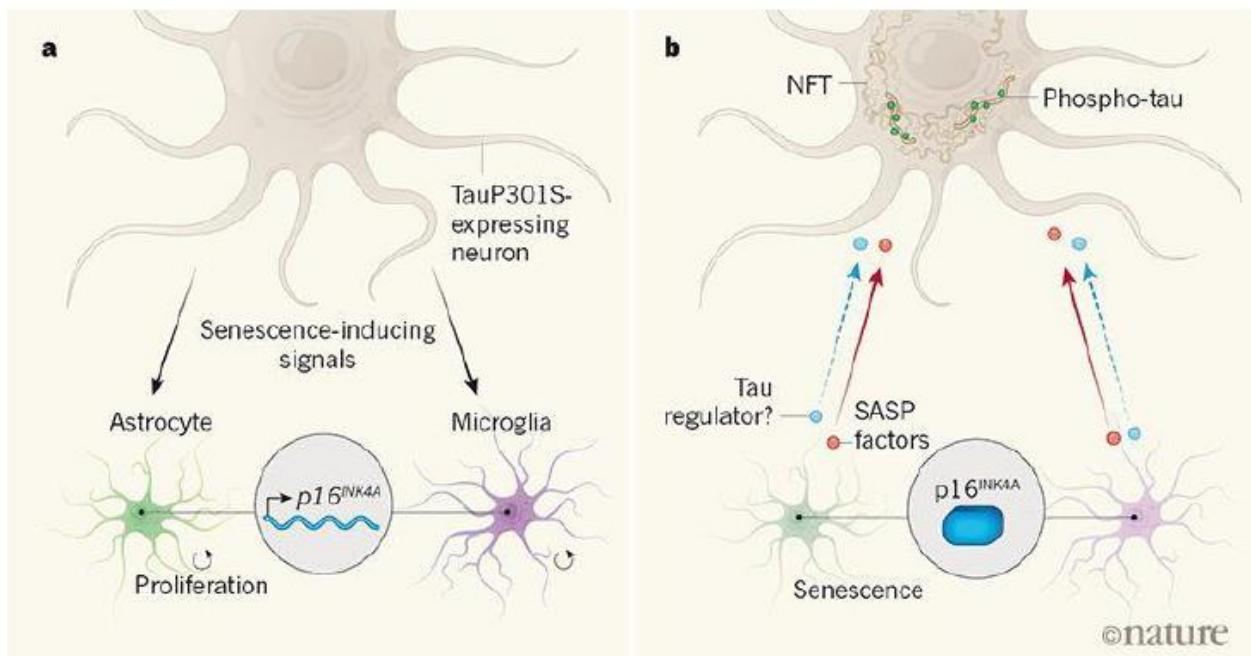


La hiperfosforilación en Alzheimer se ha postulado que es provocada por la activación de quinasas en respuesta a la acumulación del **péptido βA**.

Existen ciertas diferencias entre la FTDP y la enfermedad de Alzheimer a nivel molecular y sintomatológico:

- En FTLD (degeneración del lóbulo frontotemporal) **no hay péptido βA**, mientras que sí se observan **NFT**. En ella, se dan **trastornos de la conducta**, afectándose más el **área frontal de la corteza cerebral**. Es una enfermedad **heterogénea**, provocada por mutaciones en distintos genes. Algunas, **están asociadas a la degeneración de motoneuronas**.
- En el Alzheimer, **hay tanto péptido βA como NFT**. Se afecta principalmente en un primer momento la memoria, por la afectación del hipocampo. Las mutaciones asociadas a ella son las ya mencionadas en APP, PSEN1 y 2.

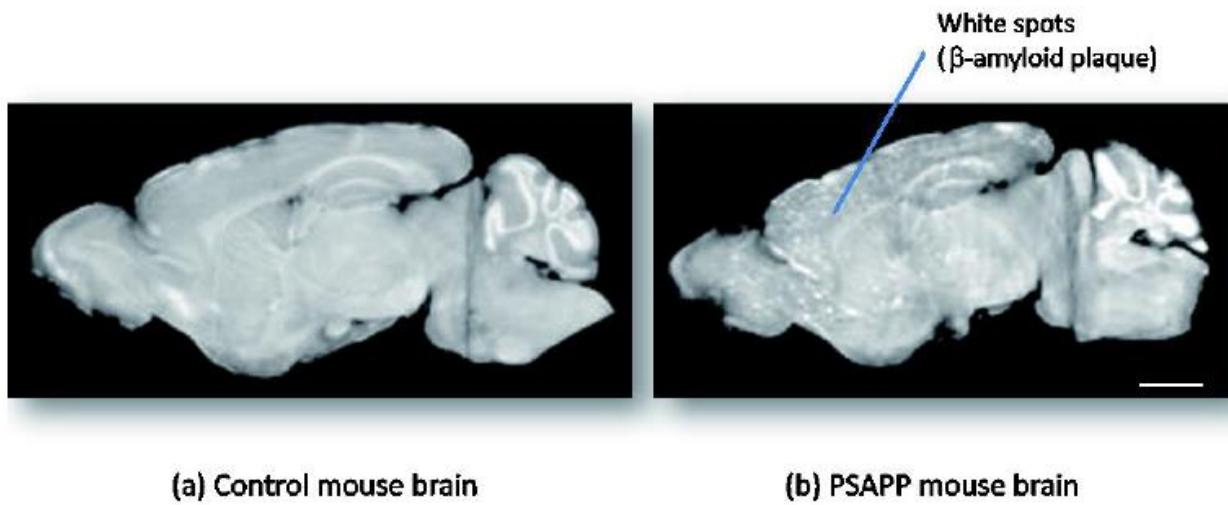




Modelos experimentales en la Enfermedad de Alzheimer

Los **modelos genéticos** se basan en la introducción de las mutaciones en APP y PSEN1/2 que son las causantes del **alzheimer de inicio temprano**.

Obtener ratones transgénicos con mutaciones que provocasen patología ha sido difícil, **debido a que la introducción de una sola de las mutaciones que en humano provoca patología, no la provoca en ratón**. Para conseguir modelos murinos que reprodujesen la enfermedad, **fue necesario introducir más de una de las mutaciones en APP**, produciéndose así acumulación del **péptido β A**.

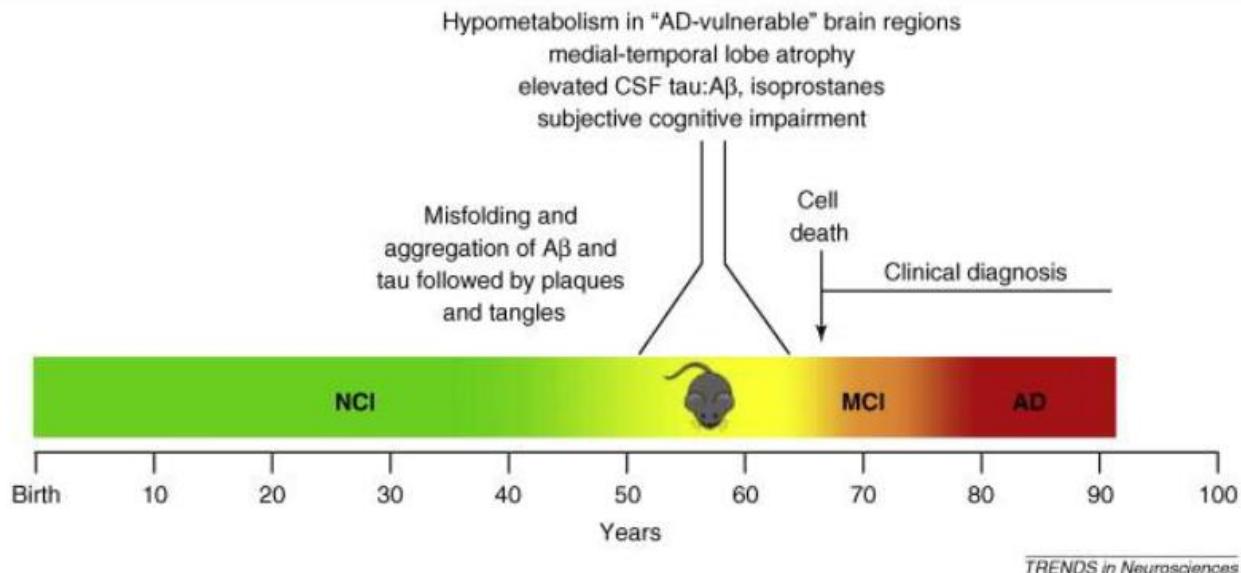


Otras aproximaciones han sido la **introducción de la presenilina mutada y de mutaciones en APP, con una gran acumulación del péptido β A**. Sin embargo, el **ratón no debe ser un buen modelo**, debido a que en humanos una sola mutación es suficiente para el desarrollo de la enfermedad mientras que en ratones es necesaria más de una.

Por otro lado, los cerebros de estos ratones **presentan muchas placas de β A y algo de disfunción neuronal y sináptica**. Sin embargo, cuando se hace un análisis con detalle, **no se observa la**

formación de ovillos neurofibrilares, aunque en algunos de ellos sí que llega a haber hiperosforilación de la proteína tau.

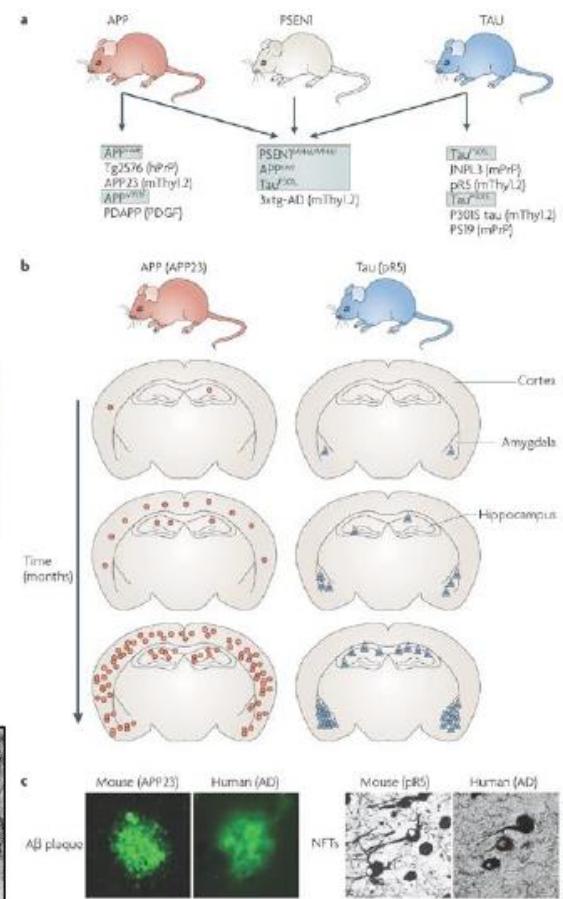
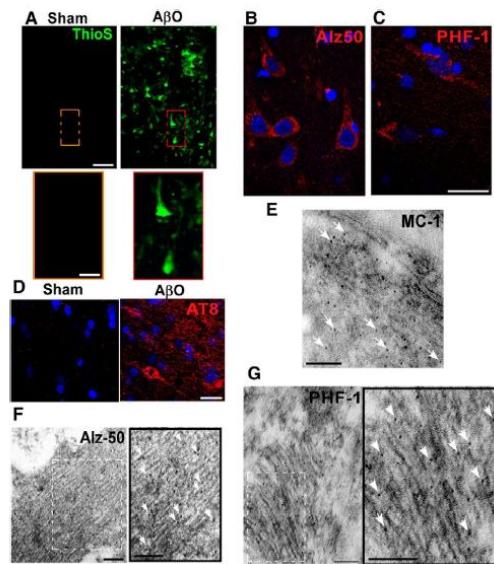
Así, los ratones quizá serían un buen modelo para un estadio muy inicial, en una primera etapa presintomática. En estos, **ciertos fármacos podrían tener un efecto beneficioso y protector**. Esto hace pensar que quizá la manera de **enfocar el estudio del Alzheimer es hacia el diagnóstico precoz**, debido a que posiblemente los tratamientos que en humanos no tienen efecto, no lo tengan porque se usan en pacientes con la enfermedad avanzada (un estado que no se parece al que tienen los ratones cuando se prueban fármacos en ellos).



Para mejorar los modelos, **se han desarrollado modelos murinos con mutaciones en tau**. Estos modelos tienen **ovillos neurofibrilares**. Cruzando ratones con acumulación de péptido β A y formación de NFT, se obtiene un ratón en donde **no solo hay placas de β A sino también ovillos neurofibrilares**.

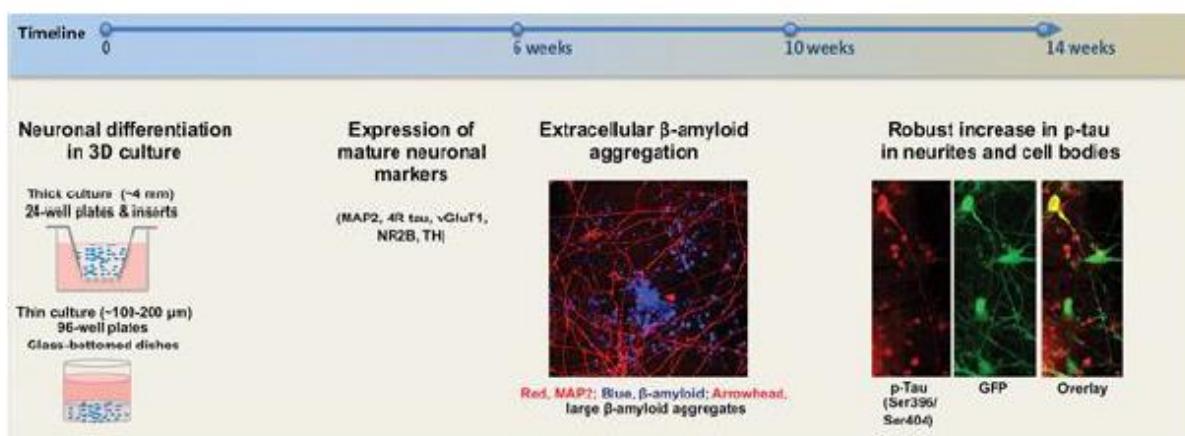
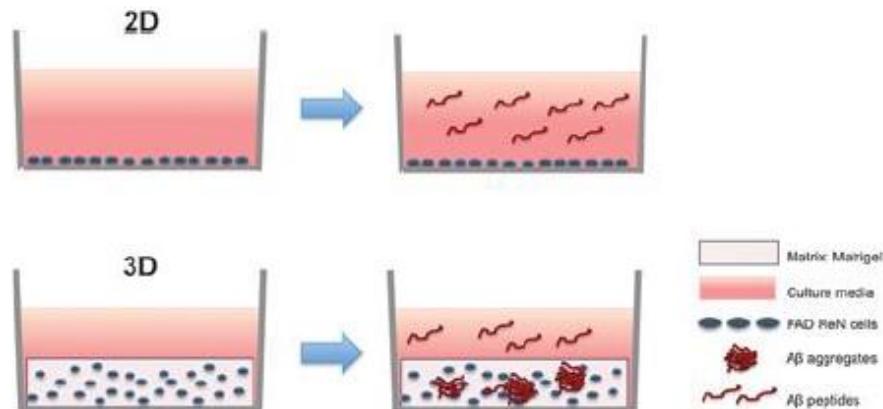
Otros modelos han sido el uso de **primates no humanos**. Existen experimentos que sugieren que la **hipótesis β -amiloide podría ser la que produce el desarrollo de la enfermedad**.

En estos experimentos, hechos en macacos, **se insuflan oligómeros de péptido β A en la corteza cerebral del mismo**. Estos, agregan y forman placas de β A. A continuación, se observaba que esta agregación en placas también parecía **inducir la formación de ovillos neurofibrilares**.



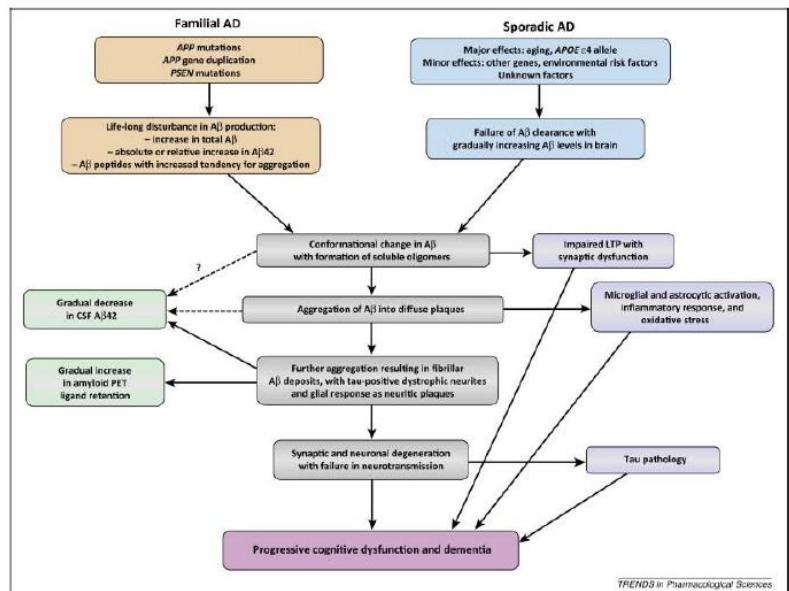
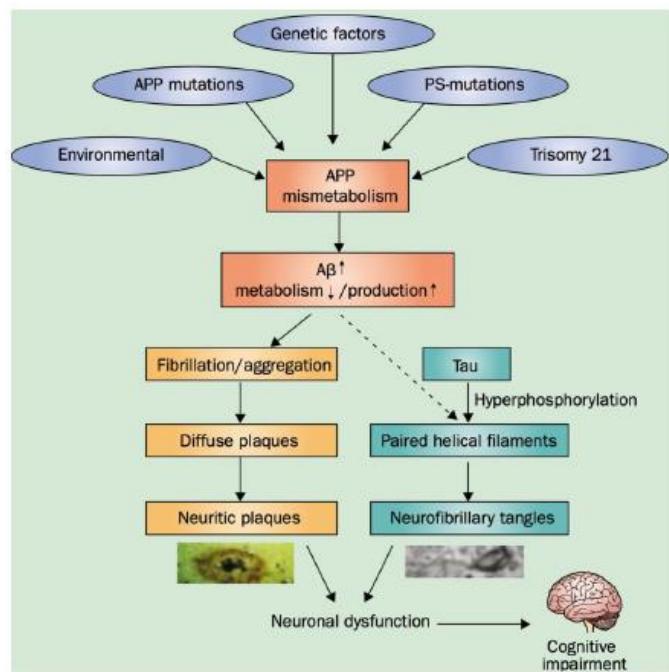
Actualmente, se está trabajando mucho en **modelos celulares de la enfermedad de Alzheimer**. Se ha observado que los modelos en **monocapa**, producen mucho péptido β A, sin embargo, este se **diluye en el medio de cultivo**.

Es por ello que la situación mejora si se hacen **modelos tridimensionales**, en una matriz de colágeno u otro material similar. Así, se observa una gran hiperfosforilación de tau y en ocasiones un poco de agregación, siendo el grado de hiperfosforilación de tau mayor que en ratones.



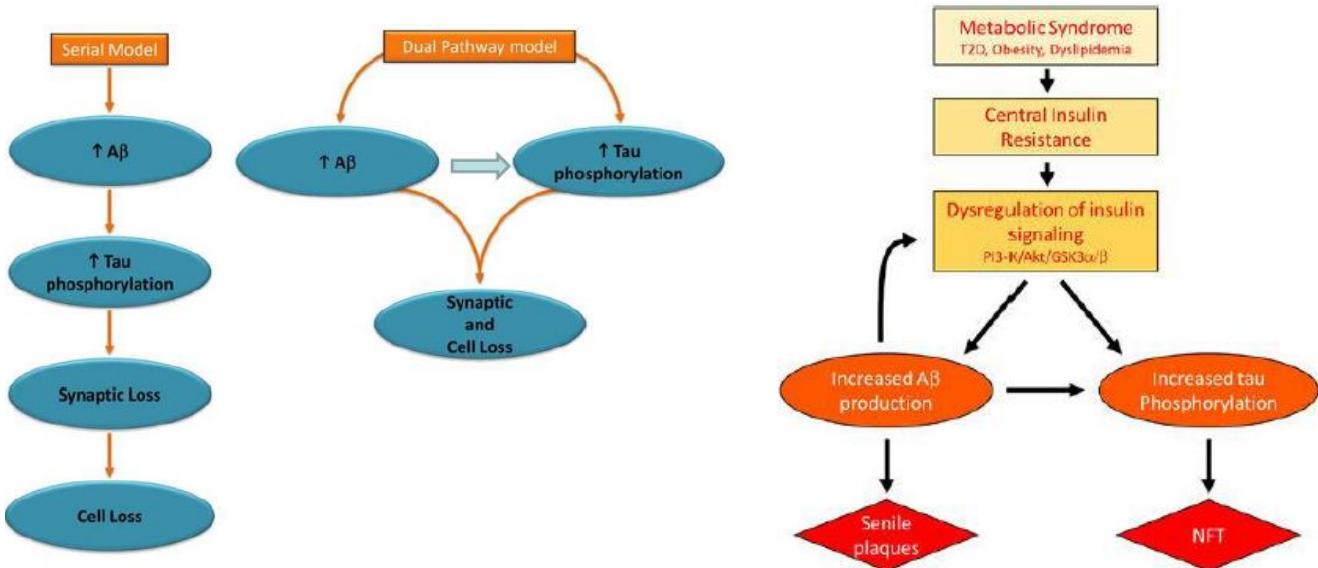
Mecanismos moleculares de neurodegeneración en Enfermedad de Alzheimer

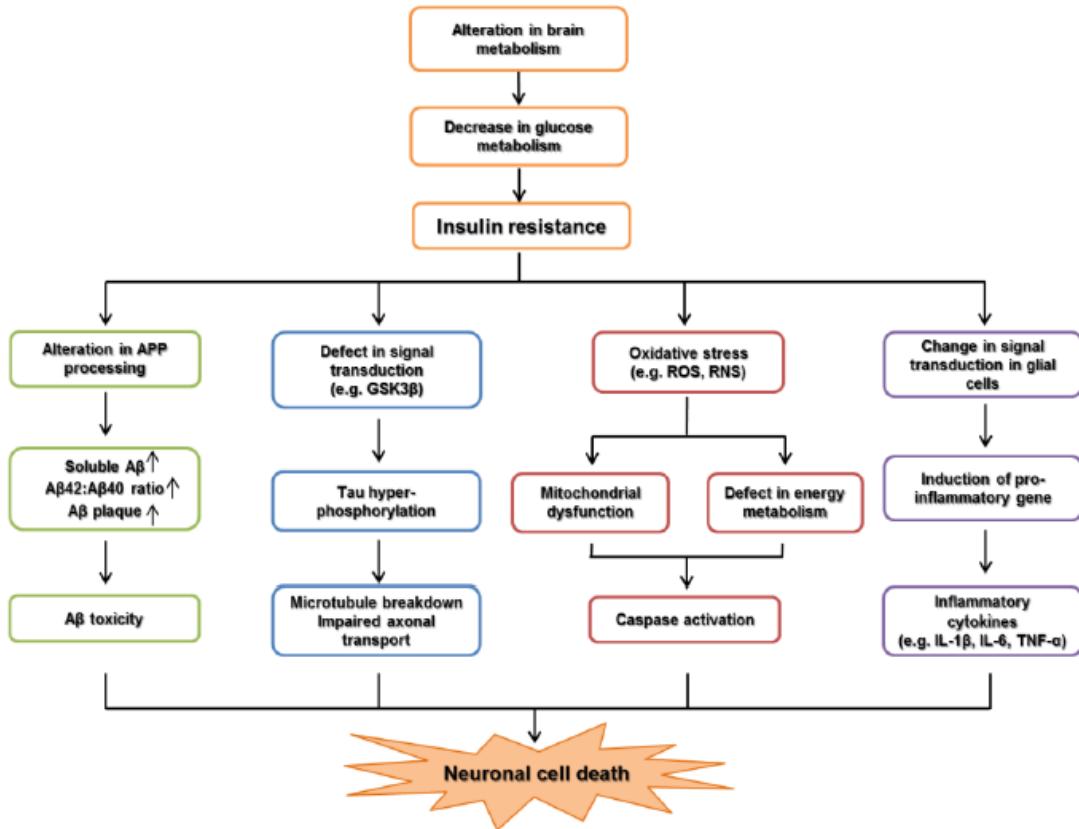
Inicialmente, prevaleció la llamada **hipótesis del β A**. En ella, los síntomas de la enfermedad se producen en cascada, produciéndose agregados de péptido β A y una posterior agregación de los mismos, que produciría una **hiperfosforilación de tau** y la formación de NFT.



Sin embargo, pronto se propusieron **dos visiones contrapuestas: el modelo en cascada y el modelo de dos vías**. Entender cual de los dos modelos sería el predominante en la enfermedad de Alzheimer podría ser importante, debido a que el entendimiento llevaría a un enfoque distinto del tratamiento.

Los datos de los que se disponen apoyan al **modelo de dos vías**. Por ejemplo, esto ocurre con el aumento del riesgo de enfermedad de Alzheimer con la aparición del síndrome metabólico. Este, lleva a una **desregulación de la señalización por insulina**, siendo capaz de inducir más péptido β A e **hiperfosforilación de tau**. Dicha formación de péptido β A, lleva aún a una **mayor desregulación y con ello, a una mayor fosforilación de tau**.



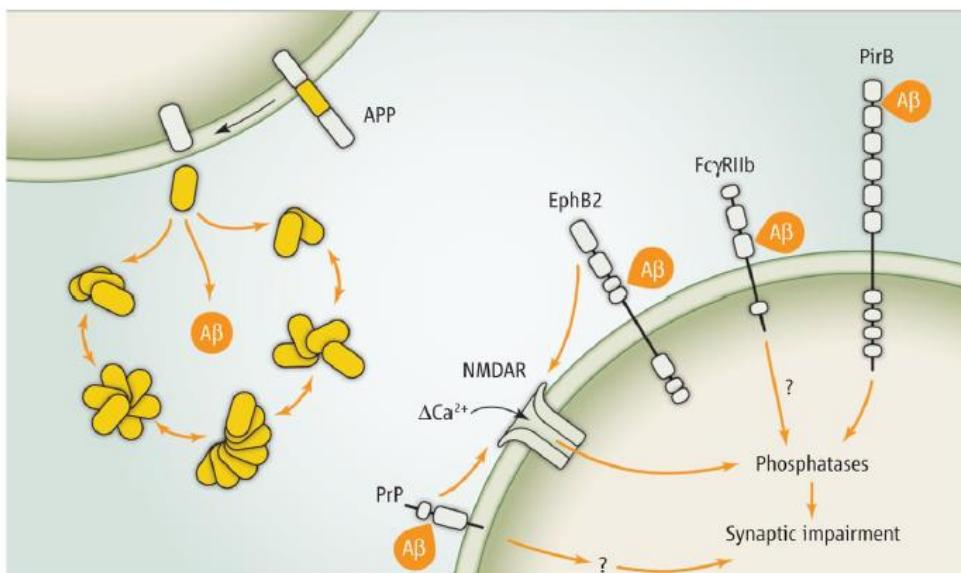


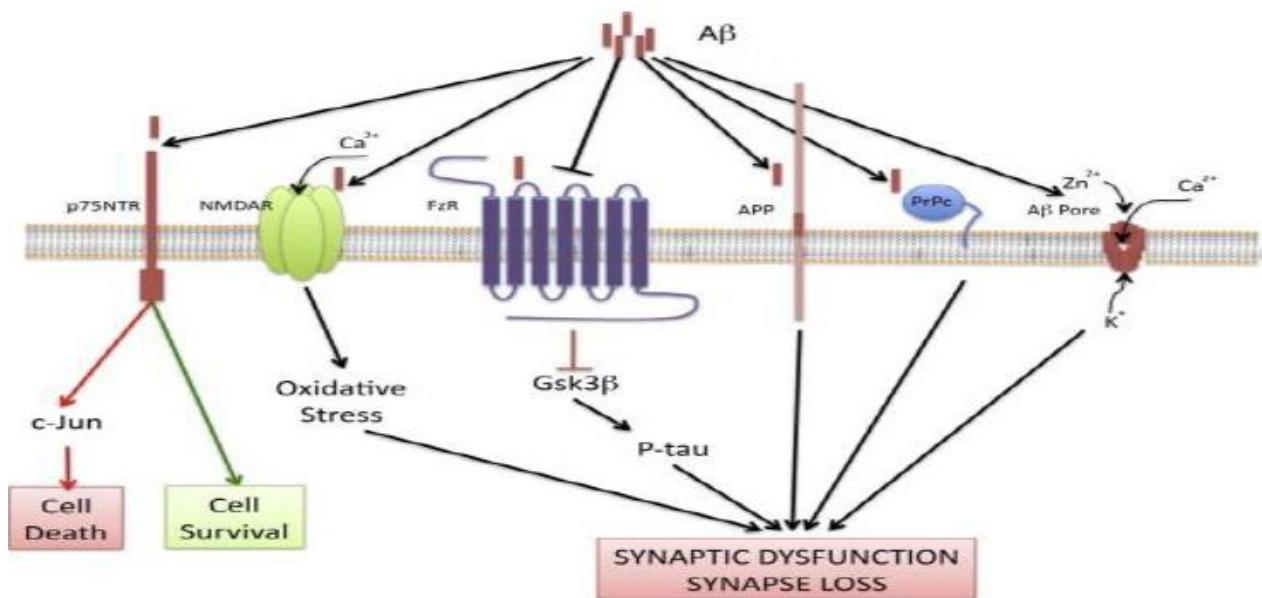
Toxicidad de los agregados

Toxicidad de los agregados de βA

El péptido βA resulta tóxico por varias razones:

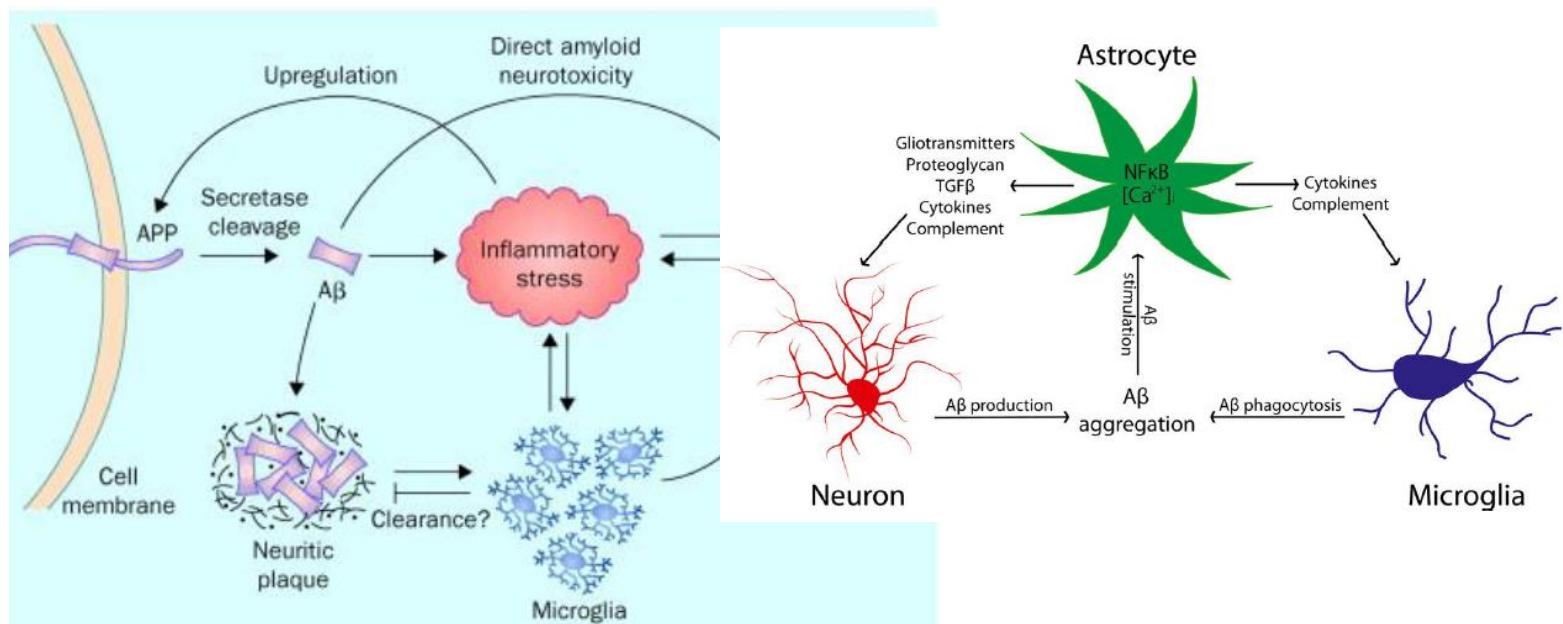
- **Acumulación en las hendiduras sinápticas.** Su acumulación produce la interacción con un gran número de **proteínas de membrana**, desregulando una gran cantidad de ellas y modificando su señalización. Entre ellas está el **receptor de glutamato de tipo NMDA**, incrementando la excitotoxicidad y con ello la muerte neuronal. Es por ello que como terapia, algunos **bloqueantes del receptor NMDA tienen un efecto modesto**.

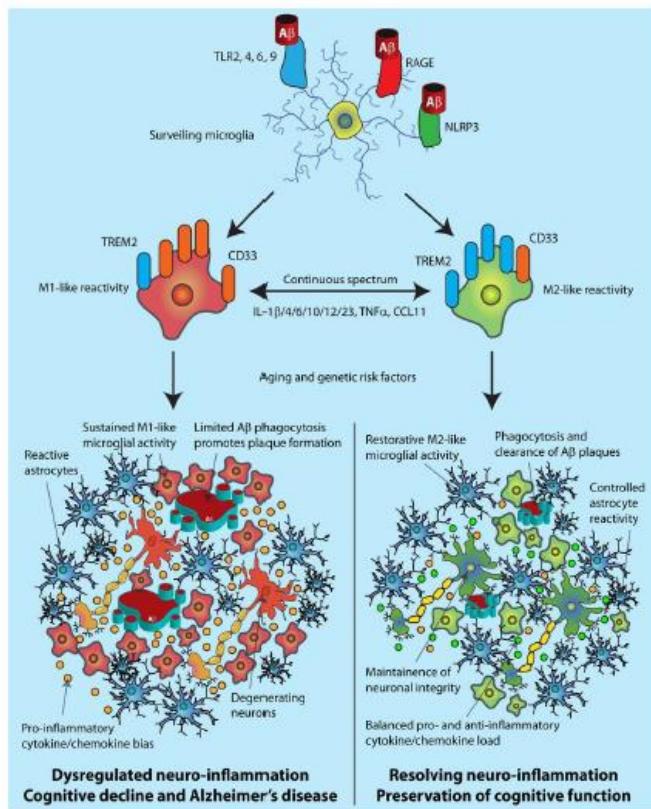
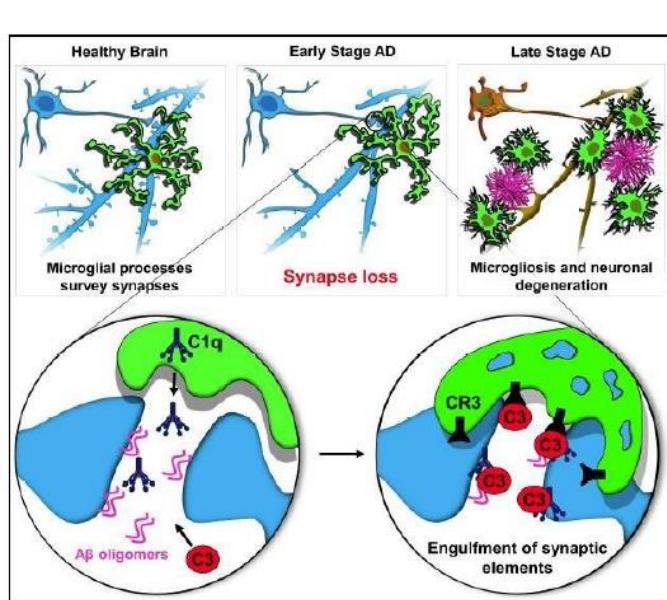




- **Efectos en la microglía.** La acumulación de βA da lugar a **efectos indirectos en la microglía**, produciéndose neurotoxicidad por activación de la misma y probablemente por la activación de astrocitos A1.

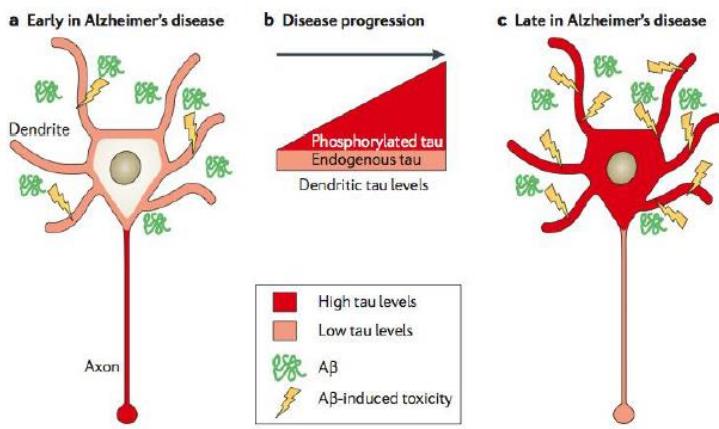
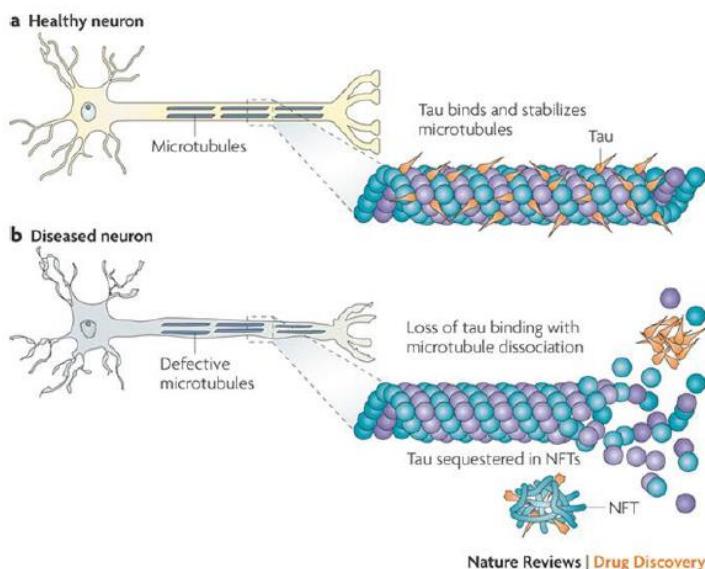
Una gran cantidad de **microglía de tipo M1 neurotóxica** produce una gran inflamación mediada por **citoquinas proinflamatorias**, no fagocitando el **péptido β-amiloide**. Una de las posibles herramientas terapéuticas podría ser la conversión de microglía de tipo M1 a microglía de tipo M2, **más fagocítica**, consiguiendo eliminar estos agregados con una mayor eficacia.



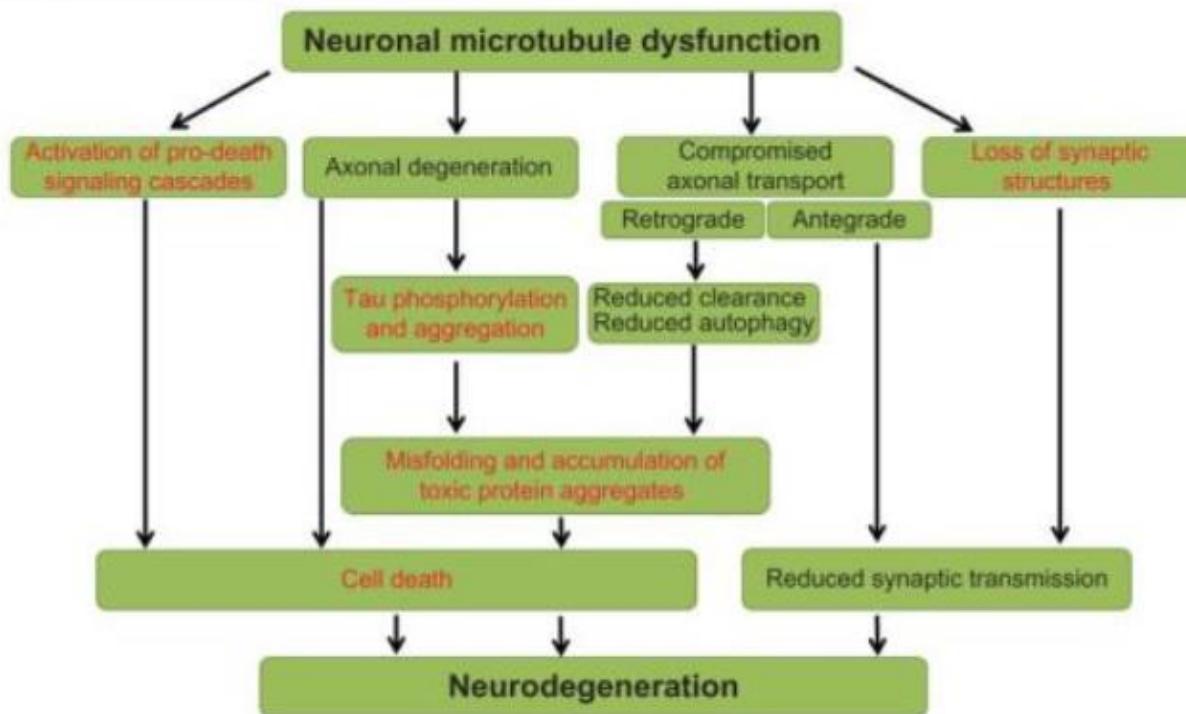
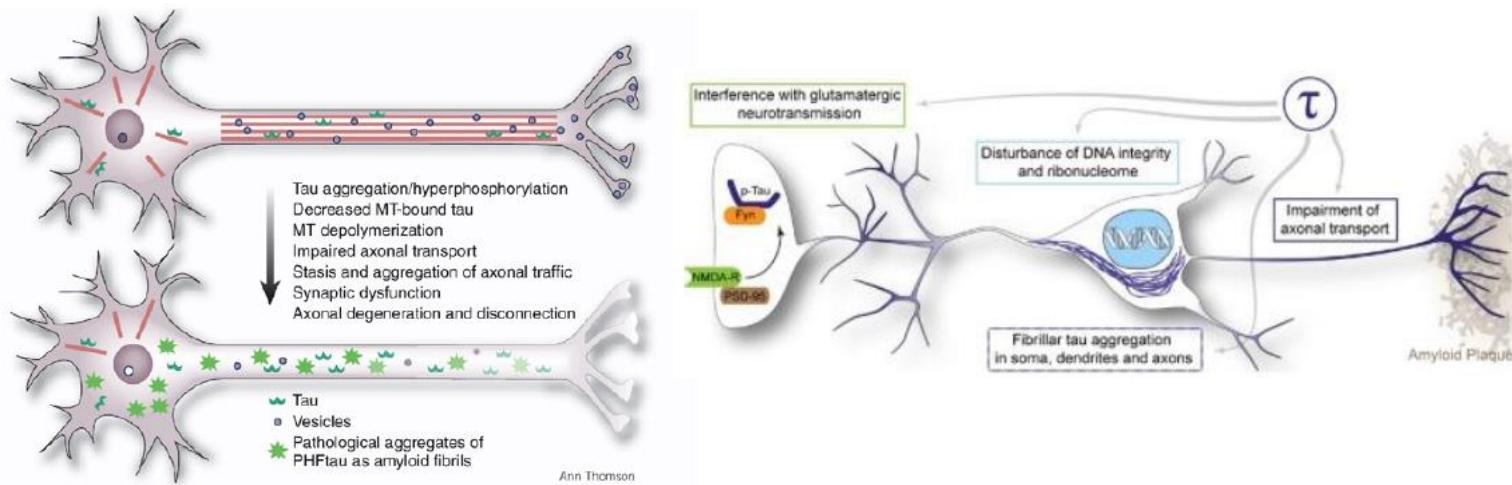


Toxicidad de los ovillos neurofibrilares

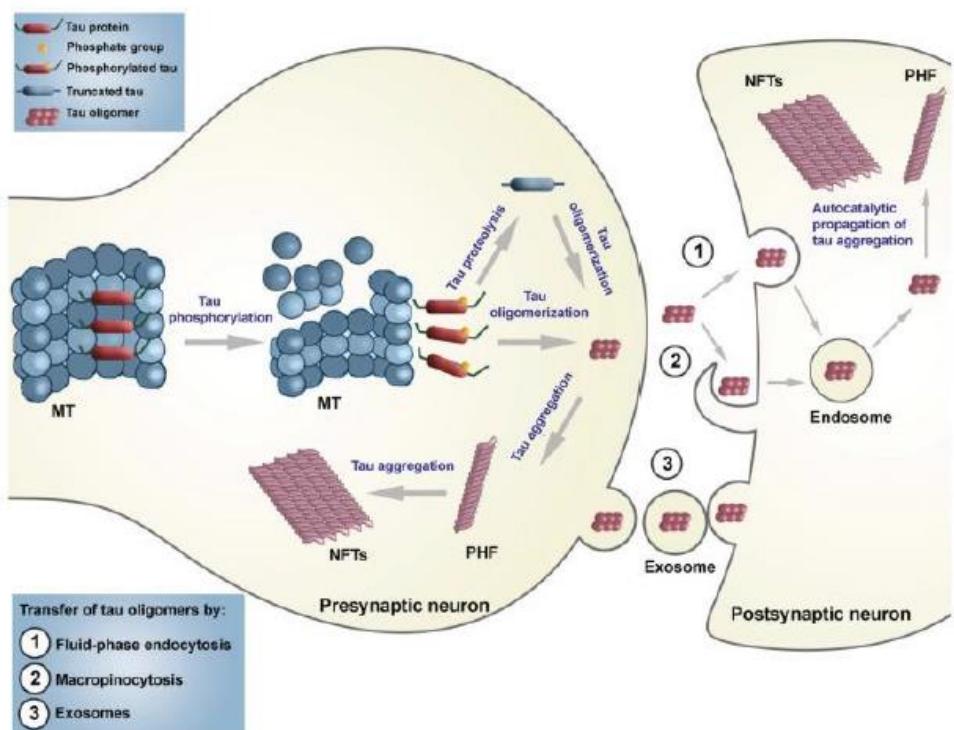
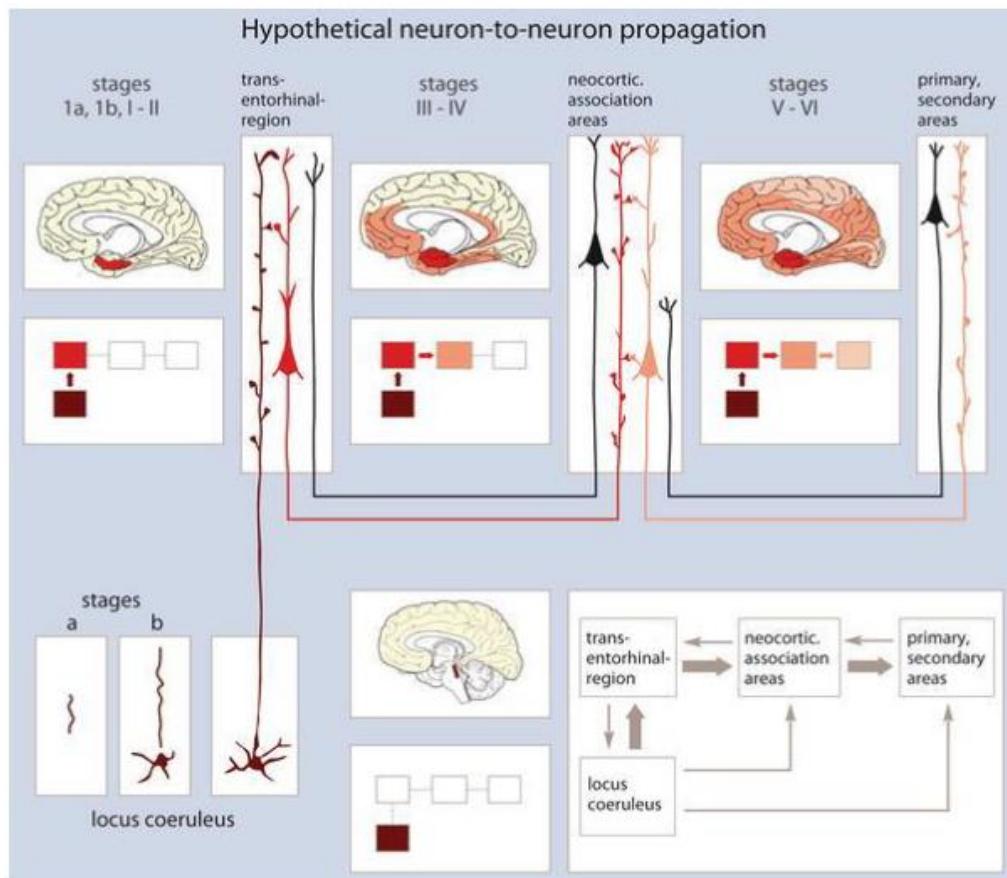
La toxicidad de los ovillos neurofibrilares está provocada por una desorganización de los **microtúbulos** que conlleva a la formación de agregados. Esta desorganización va a bloquear el transporte axonal, llevando a una **disfunción neuronal**. Por otro lado, los oligómeros de tau interaccionarán con algunos orgánulos pudiendo causar distintos tipos de alteraciones.



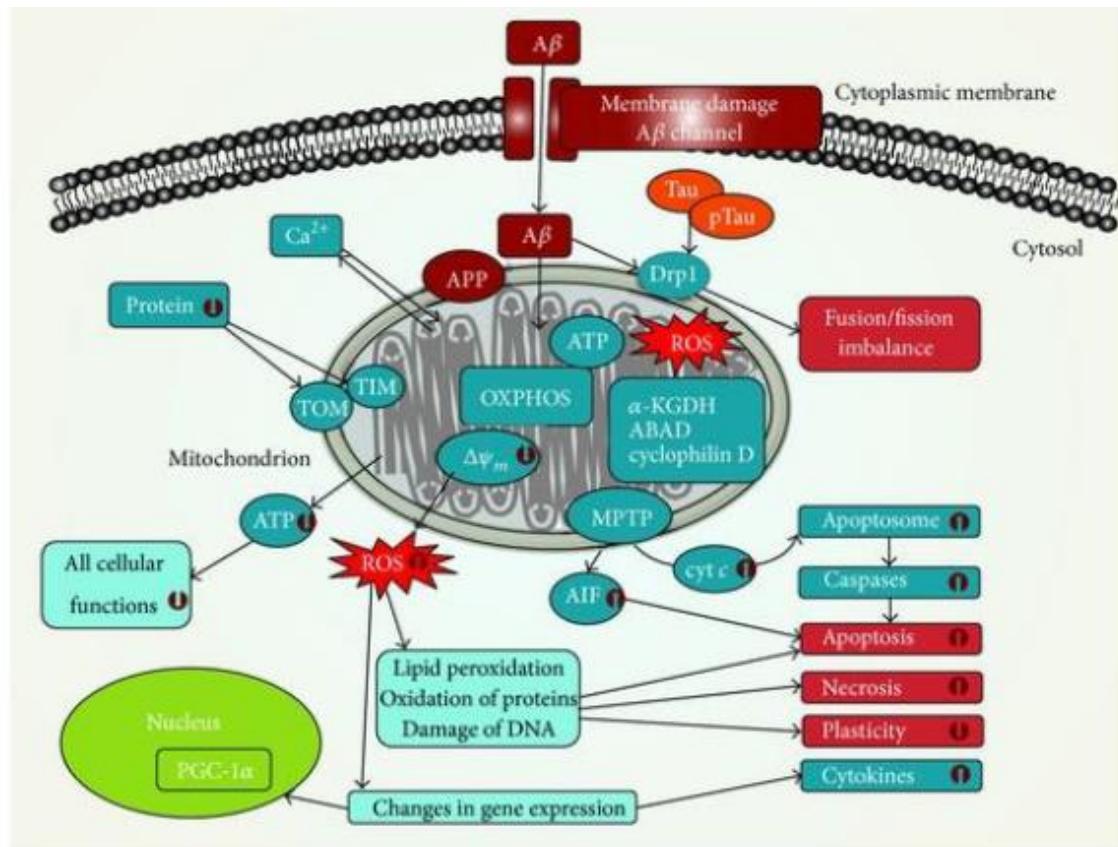
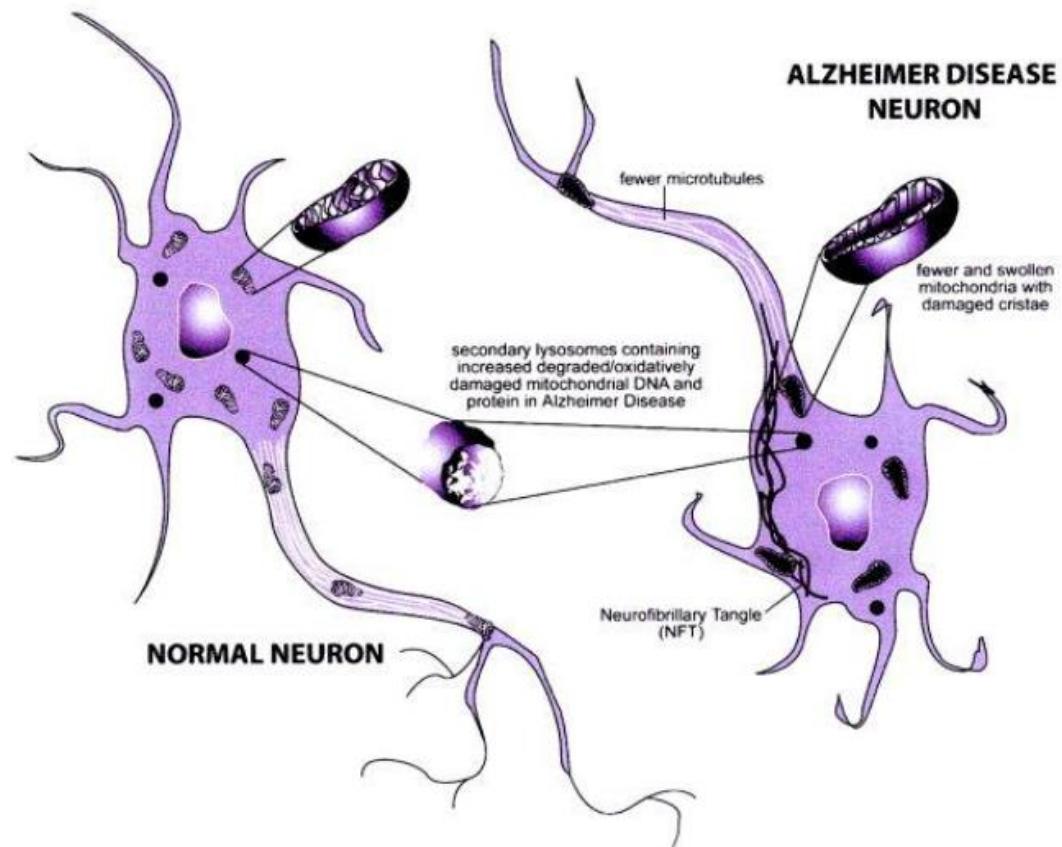
Por ejemplo, la entrada de oligómeros dentro del núcleo puede alterar procesos nucleares y otros procesos de interacción con la red de mitocondrias puede acabar generando disfunción mitocondrial.



Si se evalúa el patrón de acumulación de los NFT, estos van **apareciendo en la corteza entorhinal y van llegando a todas las regiones de la corteza** siguiendo un **patrón de conexiones sinápticas**. Algunos experimentos apuntarían a que la transmisión sería de unas neuronas a otras por **mecanismos no conocidos totalmente**. Así, parecería que los oligómeros transmitidos, favorecerían la agregación de tau de unas neuronas a otras.

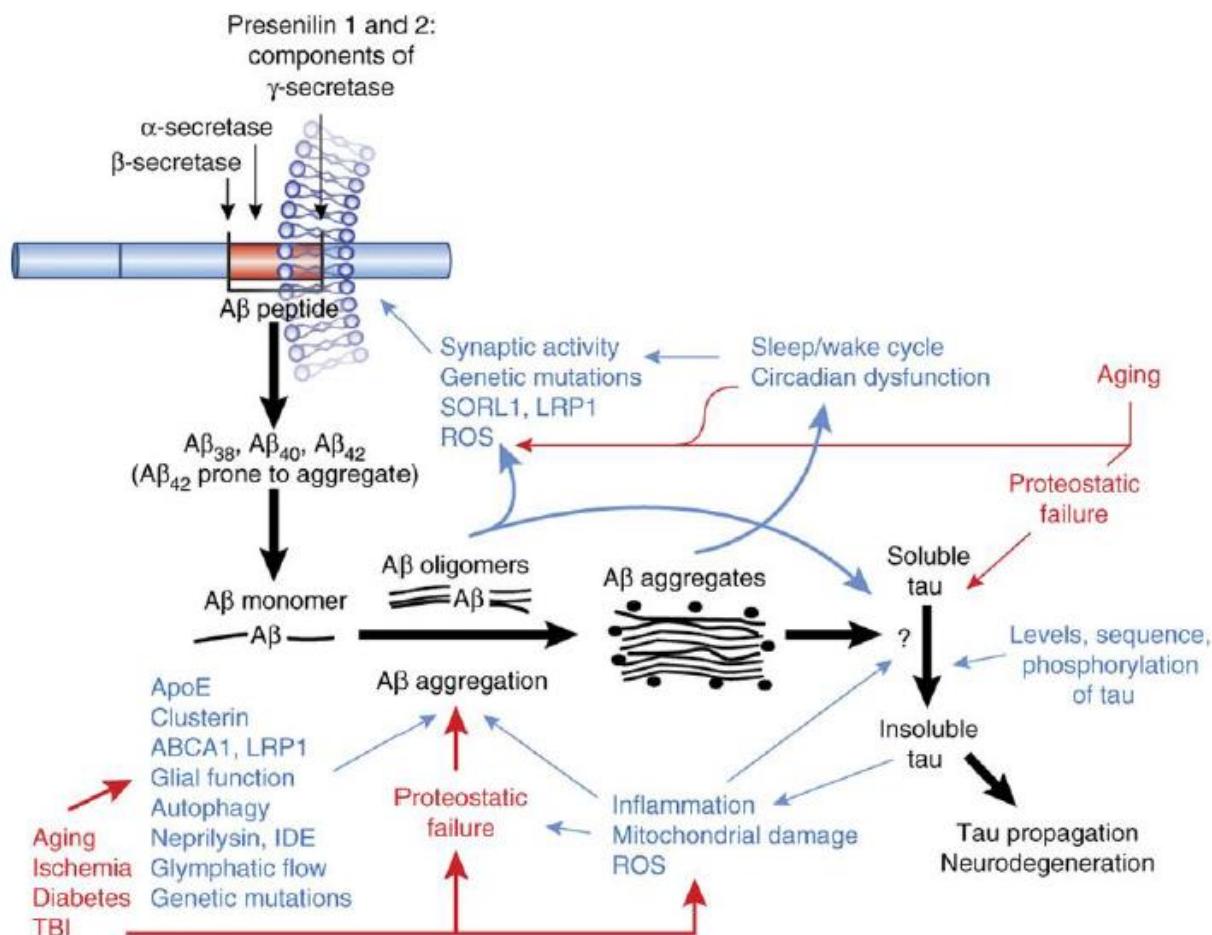
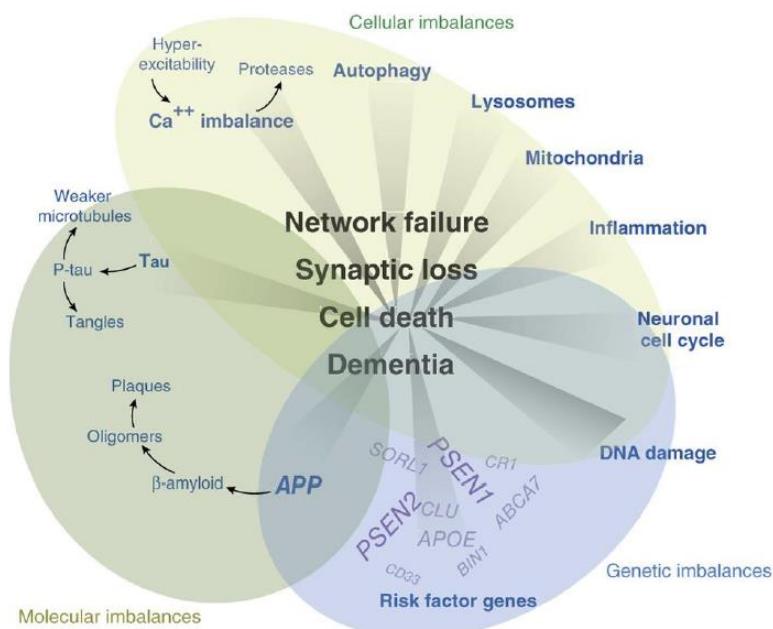


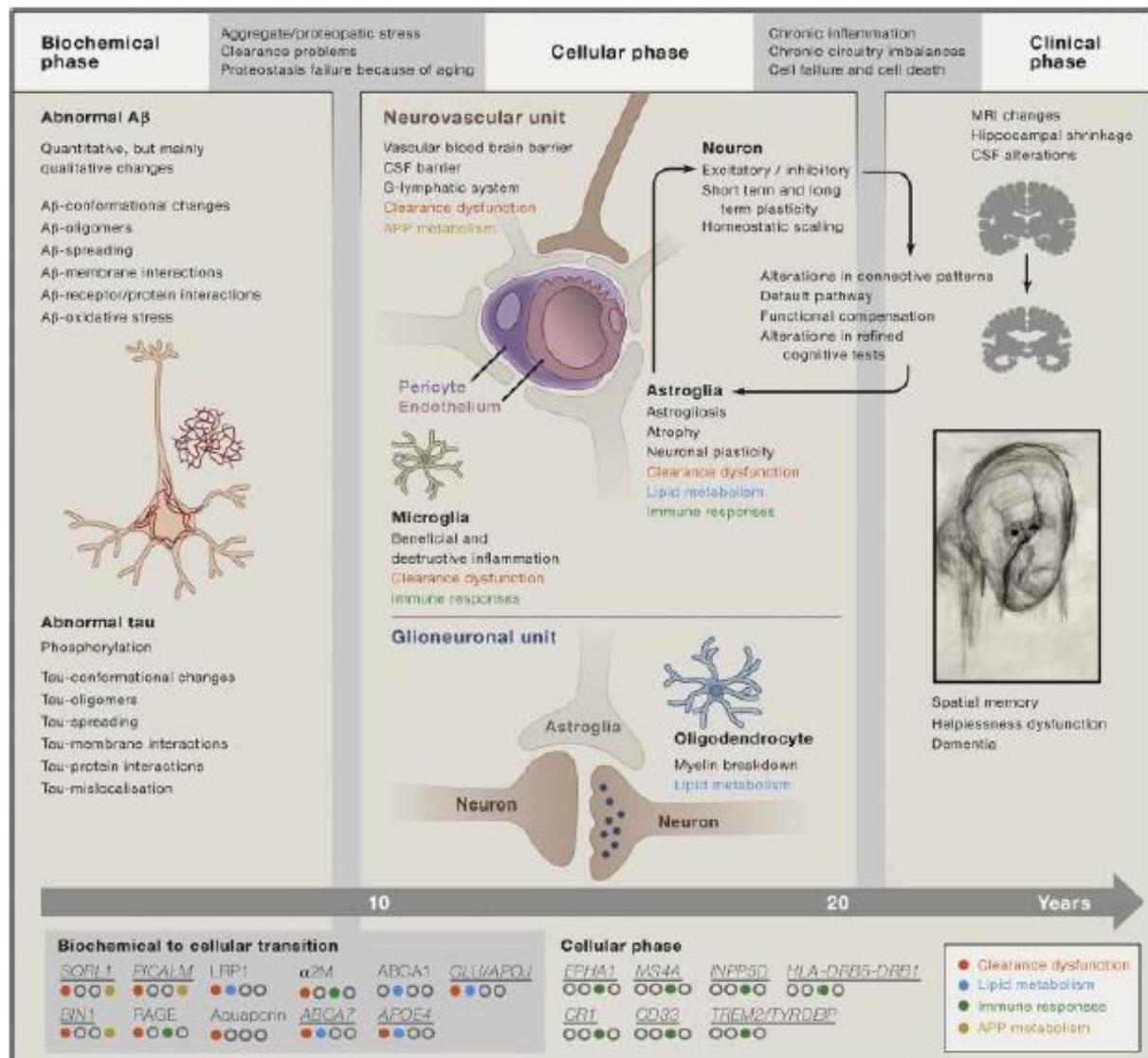
Daño mitocondrial por péptidos β A y NFT



Visión integrada de la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad, **una visión integrada de la enfermedad de Alzheimer es difícil**. En general, sabemos muchos detalles de la misma, y las consecuencias de los procesos individuales, pero la interconexión de los mismos y la influencia de unos y otros en el conjunto de la enfermedad no está tan elucidada.





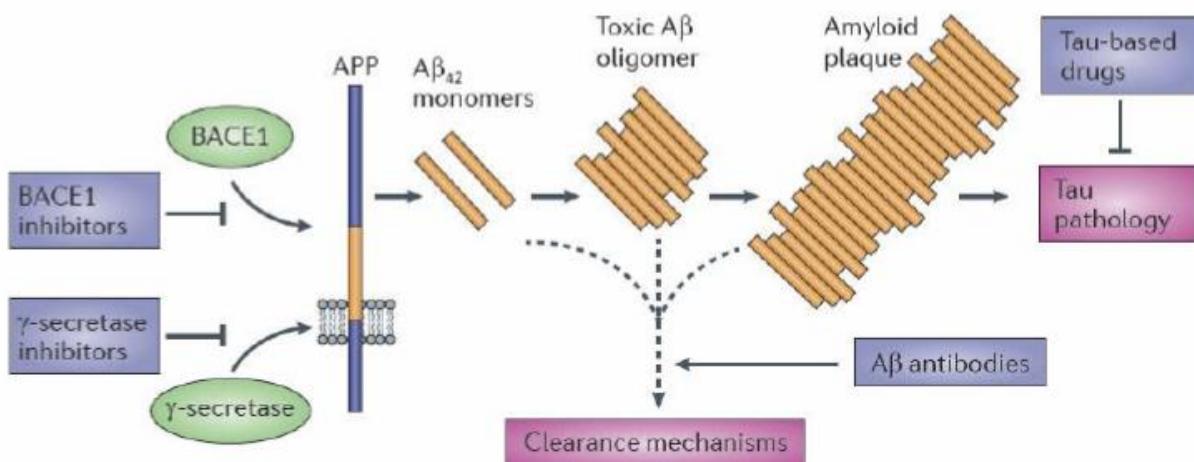
Perspectivas dentro de la enfermedad de Alzheimer

Las opciones de tratamiento actual son:

- **Inhibidores de colinesterasas.** Se trata de un **tratamiento sintomático, aumentando la acetilcolina**. Funcionan debido a que las sinapsis colinérgicas son **importantes para el mantenimiento de la memoria**. Si aumentamos los niveles de acetilcolina, **aumenta la retención de la misma**. Como inconveniente tienen su **hepatotoxicidad**.
- **Antagonistas del receptor de glutamato tipo NMDA**, como la memantina. **Bloquea la excitotoxicidad**, con lo que **enlentece la progresión de la enfermedad**.
- **Antidepresivos y antipsicóticos**. Se usan para tratar los trastornos conductuales en fases más avanzadas de la enfermedad.

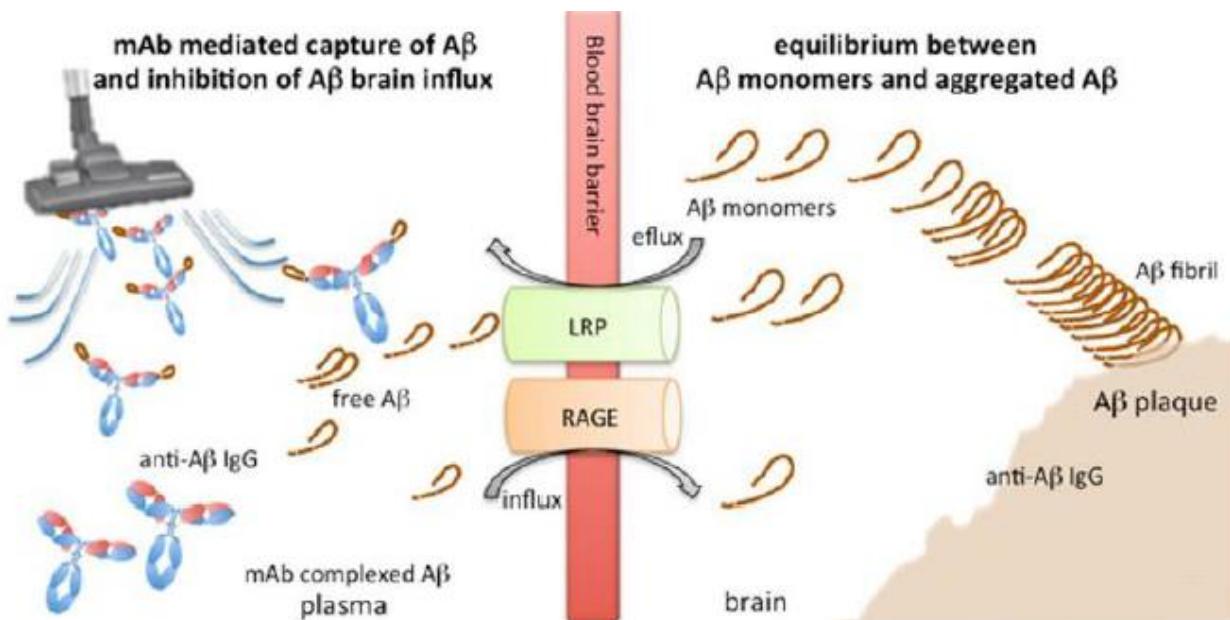
Treatment Options for Alzheimer's Disease				
Drug	Starting Dose	Target Dose	Recommended Titration	"Unique" Issues Pathway
Cholinesterase Inhibitors				
Tacrine	10 mg qid	30 to 40 mg qid	Four months	Hepatic, hepatotoxic, qid dose
Donepezil	5 mg qd	10 mg qd	One month	Questionable drug interactions
Rivastigmine	1.5 mg bid	6 mg bid	Four months	Signs of nausea and vomiting limit ability to increase dose
Galantamine	4 mg bid	12 to 16 mg bid	Four months	Contraindicated in patients with hepatic or renal disease
NMDA Receptor Antagonist				
Memantine	5 mg qd	10 mg qd	Four weeks	Only agent approved for treatment of moderate to severe Alzheimer's disease
Adjunct Therapy*				
Antidepressants (e.g., SSRIs and mirtazapine)				
Antipsychotics (e.g., risperidone, olanzapine, quetiapine) for the treatment of behavioral symptoms				
* These agents are typically used off label. Treatment should be started at half the recommended dose and titrated slowly. qid: four times per day; qd: once daily; bid: twice per day; NMDA: N-methyl-D-aspartate				

Se ha trabajado mucho buscando **inhibidores de BACE1 (β -secretasa)** y de la γ -secretasa para disminuir la acumulación de péptido β A. Se comienza a trabajar también con **anticuerpos y vacunas**, que inhiban la oligomerización de la proteína tau.



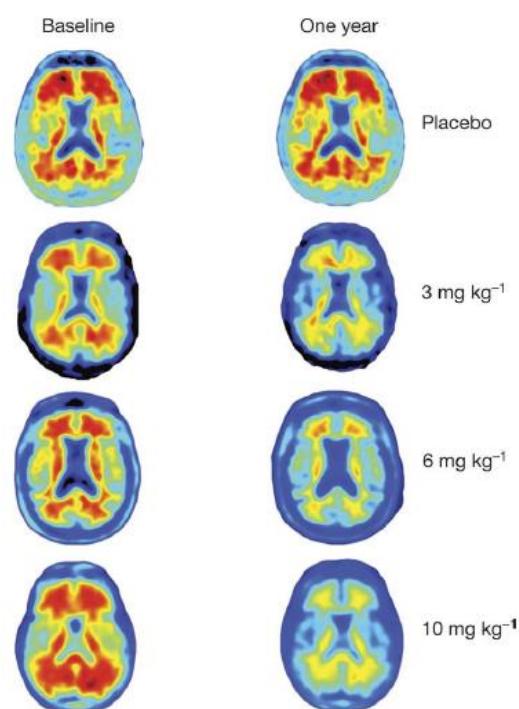
Por otro lado, también se están desarrollando **anticuerpos contra el β A**, de manera que estos vayan **aclarando el péptido β A del torrente sanguíneo y desplazando así por equilibrio el agregado**.

Estos anticuerpos son muy eficientes en el aclaramiento de los **péptidos β A** en ratones. Con respecto a las pruebas clínicas en pacientes, **con algunos se ha visto que se produce una reducción en la agregación del mismo, pero sin embargo, no se ha observado ninguna mejoría en el estado clínico de los pacientes**.



Una teoría que podría explicar esta falta de mejoría sería la precocidad con la que se forman los agregados de **péptido β A**, **desde veinte años antes de que aparezcan los síntomas clínicos**. Así, en los pacientes, el proceso patológico ya está desencadenado y en buena medida es prácticamente irreversible.

Existen ensayos clínicos en familias portadoras de mutaciones de presenilina que desarrollan **enfermedad de Alzheimer de inicio temprano**. Actualmente, esta se está sometiendo a un **tratamiento con anticuerpos**, y con el tiempo se sabrá la eficacia del tratamiento.



Bases Molecular de la Patología II

Enfermedad de Alzheimer – 13-02-2019

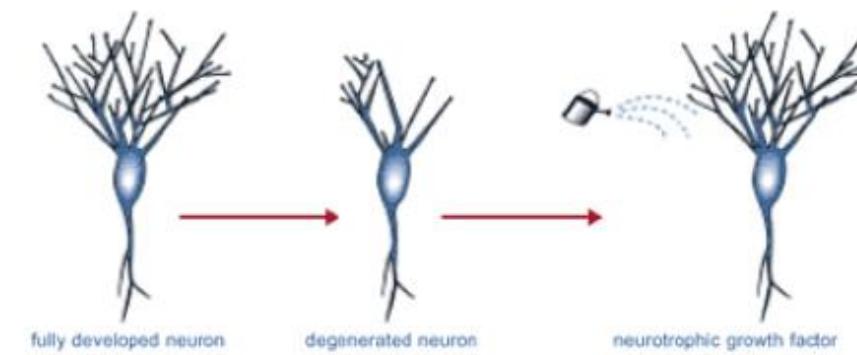
Dianas terapéuticas

Se está trabajando en agentes con otras estrategias

- Recuperación de la función mitocondrial y/o regulación de la mitofagia
- Contra la agregación de la proteína tau
- Agentes antiinflamatorios, a nivel de regulación de la microglía. Conversión de la microglía neurotóxica en fagocítica y neurotrófica.
- Factores neurotróficos que aumenten la supervivencia de las neuronas.

Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos tienen la capacidad de revertir la atrofia y estimular la supervivencia de las neuronas. Se está trabajando en este tipo de factores en otras enfermedades neurodegenerativas, también.



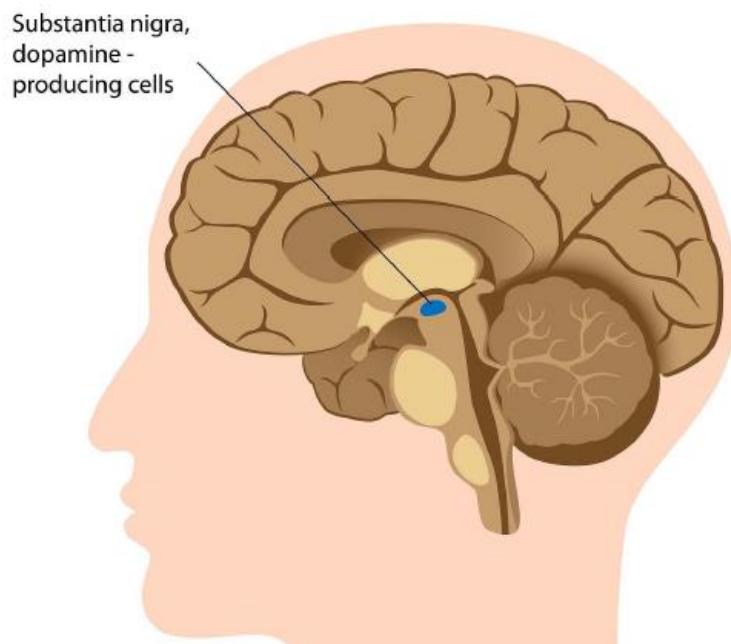
Algunos de los fármacos útiles en la enfermedad de Alzheimer produce factores neurotróficos (como los antidepresivos), al igual que el ejercicio físico. El problema de los factores neurotróficos es que no pasan la barrera hematoencefálica.

Se podría hacer terapia introduciendo células que produzcan estos factores, por ejemplo.

- Neurotrophic factors do not cross the BBB.
IGF 1 is a significant exception.
- They cannot be used intravenously. Application of neurotrophic factors requires:
 - Intracranial o intrathecal injection.
 - Gene therapy with vectors bearing genes encoding for neurotrophic factors.
 - Cell therapy with cells secreting neurotrophic factors.
- Another alternative approach would be the discovery of neurotrophic-like drugs able to cross the BBB.

Enfermedad de Parkinson

Es un **trastorno del movimiento que afecta sobre todo a las neuronas de la sustancia nigra, en especial a las dopaminérgicas**. La enfermedad de Parkinson es una **parálisis con agitación**.



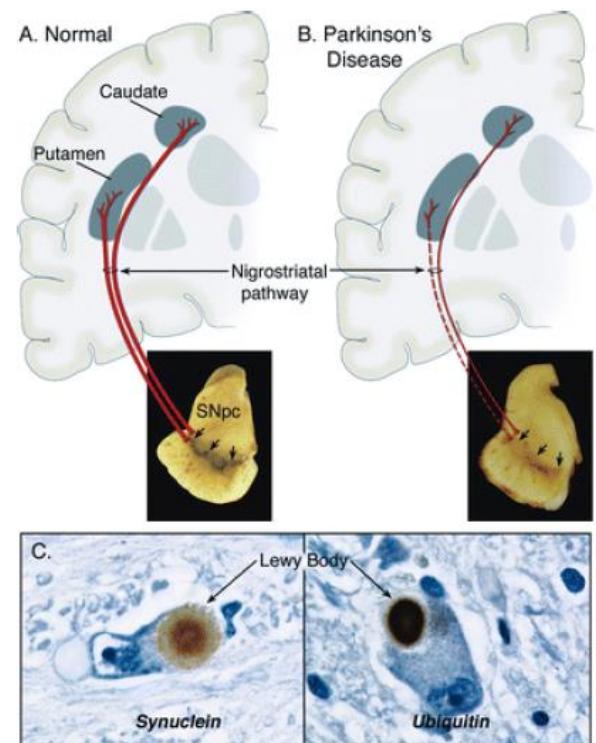
Los signos clínicos del Parkinsonismo son:

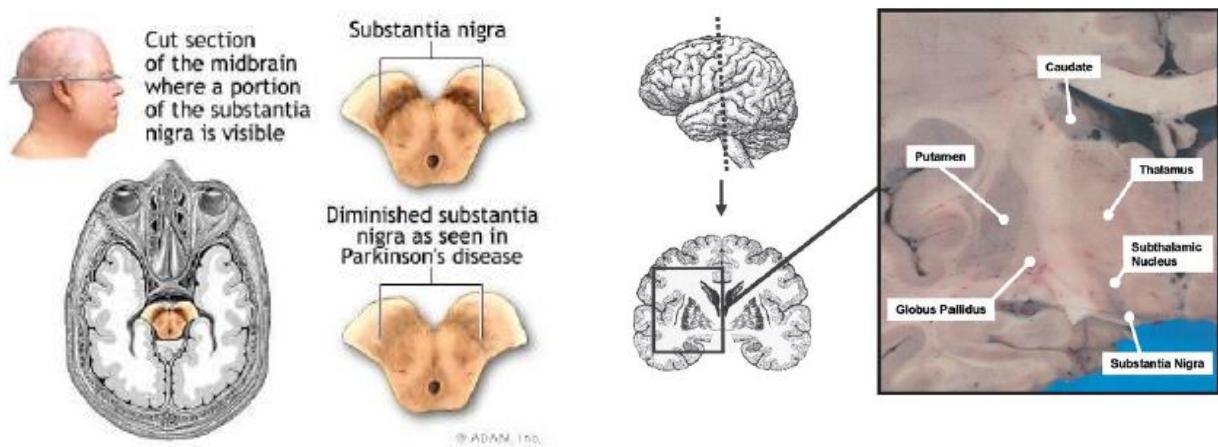
- **Tremor en reposo**
- **Bradicinesia** (es decir, una lentitud generalizada de los movimientos)
- **Rigidez muscular**

Pueden aparecer otros síntomas clínicos:

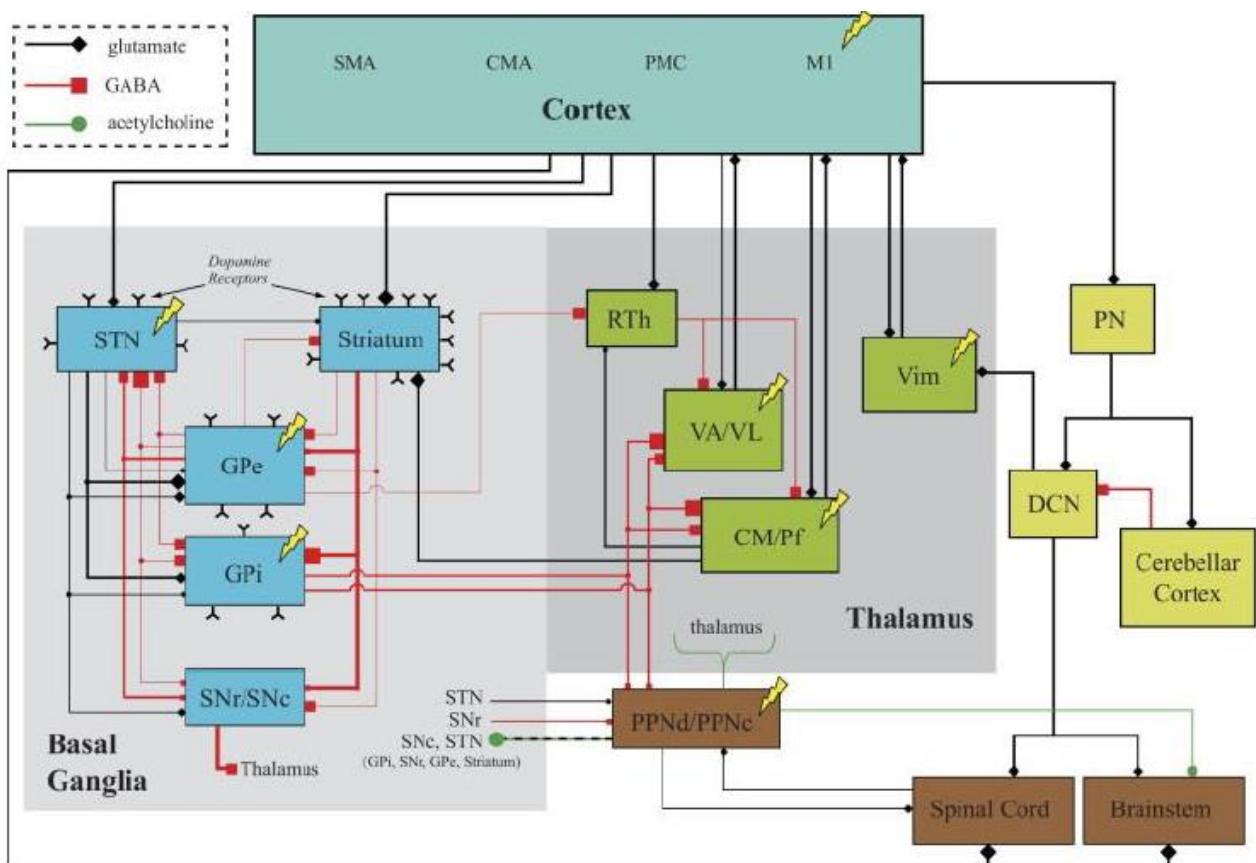
- **Disfunción del sistema nervioso entérico y autónomo:** trastornos de la motilidad gastrointestinal, con excesiva sudoración, disfunción de vejiga, sialorrea e hipotensión ortostática.
- **Hiposmia**
- **Inestabilidad postural**, debido a la pérdida de reflejos posturales.
- **Depresión.** En aproximadamente un 50% de los pacientes. Esto puede aparecer antes o después, pero se da en la mitad de los pacientes.
- **Deterioro cognitivo en 1/3 de los pacientes, pudiendo llegar a desarrollarse una demencia.**

La vía **nigrostriatal** es la afectada, hacia el **núcleo caudado y el putamen** (formando ambos juntos el **núcleo estriado**). Los cuerpos de Lewy son los marcadores inmunohistoquímicos de esta enfermedad, están en el interior de neuronas formando agregados de α -sinucleína. No tiene por qué aparecer siempre, en algunos casos de Parkinson no están presentes.



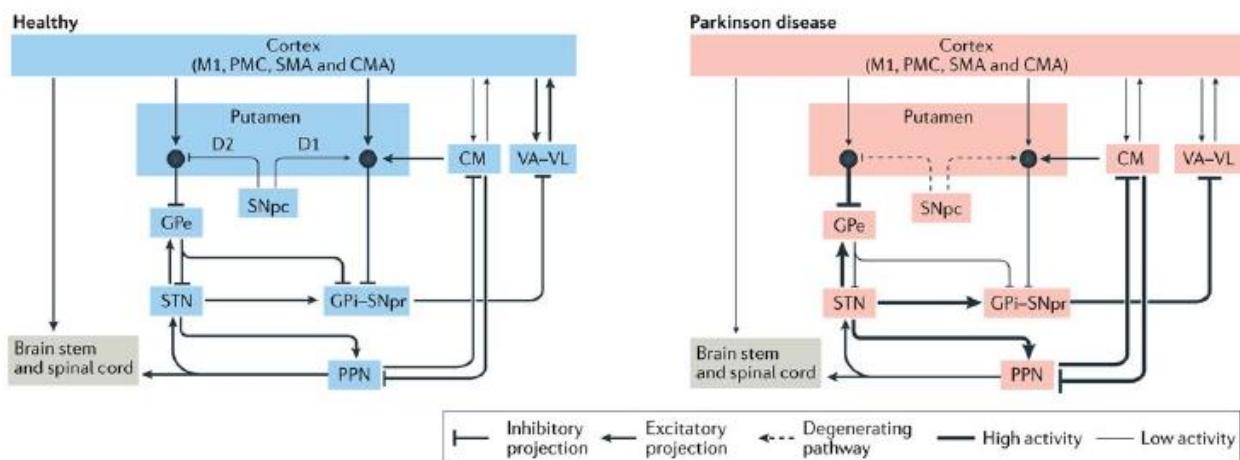


El control del movimiento no es sencillo. Hay toda una serie de circuitos que participan en el control del movimiento. **Conocemos bastante bien los circuitos que se ven afectados en Parkinson.**



En un paciente con Parkinson:

- Se pierden las **neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra**, que ejercían un efecto **inhibidor sobre el n úcleo caudado y el putamen**. Se activan mucho así el **n úcleo subtalámico**, activando al **globo p álico interno**, mandando se ñales **inhibitorias al t álamo** (**provocando el enlentecimiento de los movimientos**).
La hiperexcitaci ón del n úcleo subtalámico es una diana a nivel terap éutico.



Nature Reviews | Neuroscience

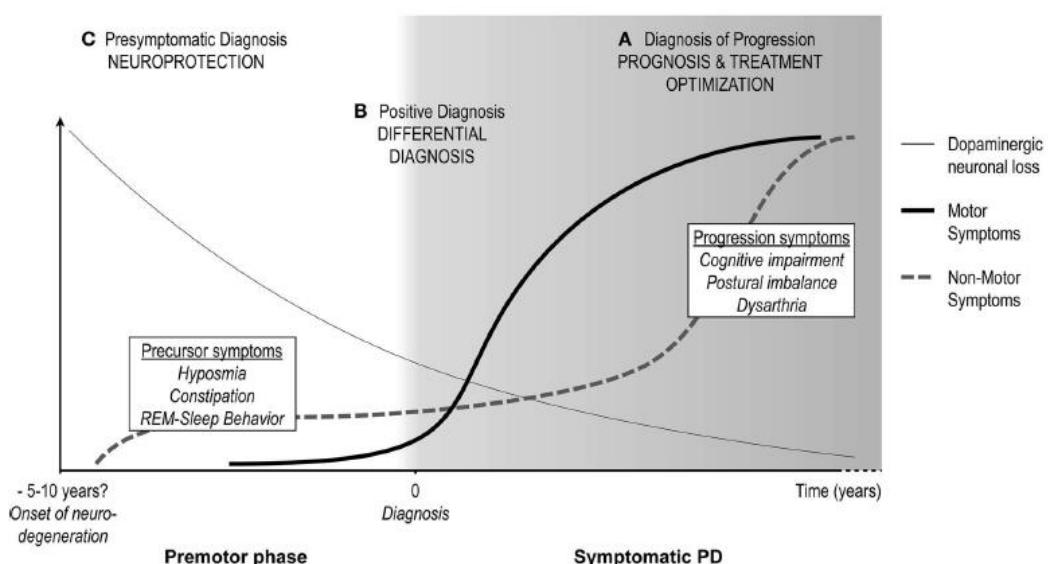
Los s íntomas motores t ípicos de la enfermedad de Parkinson aparecen cuando se han perdido casi el 70% de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Cuando encontramos los signos t ípicos cl ínicos de la enfermedad, la enfermedad est á muy avanzada.

La p erdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra produce en un principio s íntomas precursores que aparecen antes del desarrollo de la enfermedad como tal

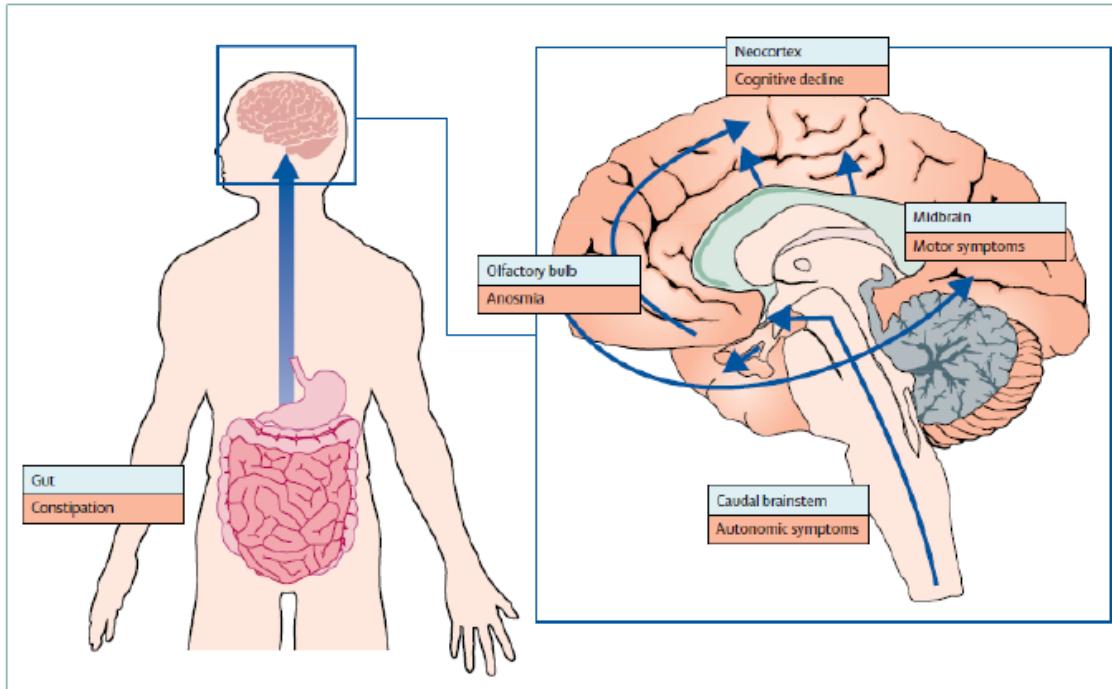
- **Hiposmia**
- **Problemas de motilidad gastrointestinal**
- **Trastornos de sue o**

Estos s íntomas son un poco inespecíficos. Mucho despu s aparece **deterioro cognitivo**. Esta enfermedad se va extendiendo a lo largo del sistema nervioso.

Biomarkers in Parkinson's Disease: What For?



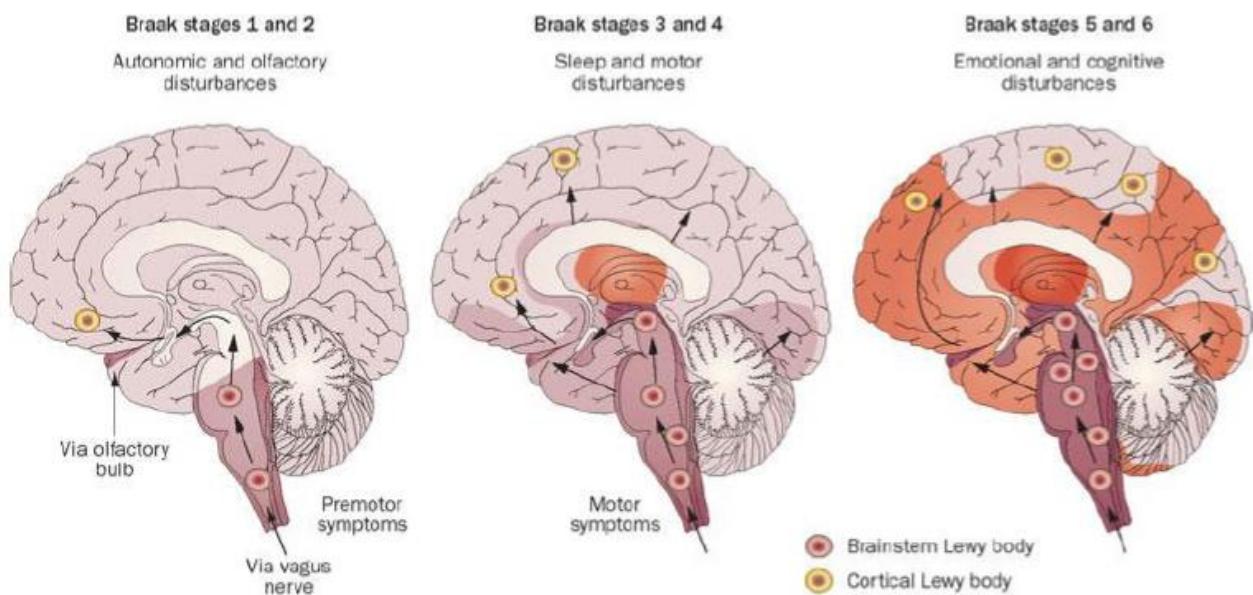
La enfermedad podría comenzar en el sistema nervioso entérico, comenzando la pérdida de motilidad gastrointestinal, y a nivel del bulbo-olfativo se extendería a la sustancia nigra y a la corteza cerebral, produciéndose un deterioro cognitivo progresivamente.



Esta progresión se refleja también en la progresión de las neuronas que incluyen cuerpos de Lewy. Estas inclusiones pueden ser más o menos difusas.

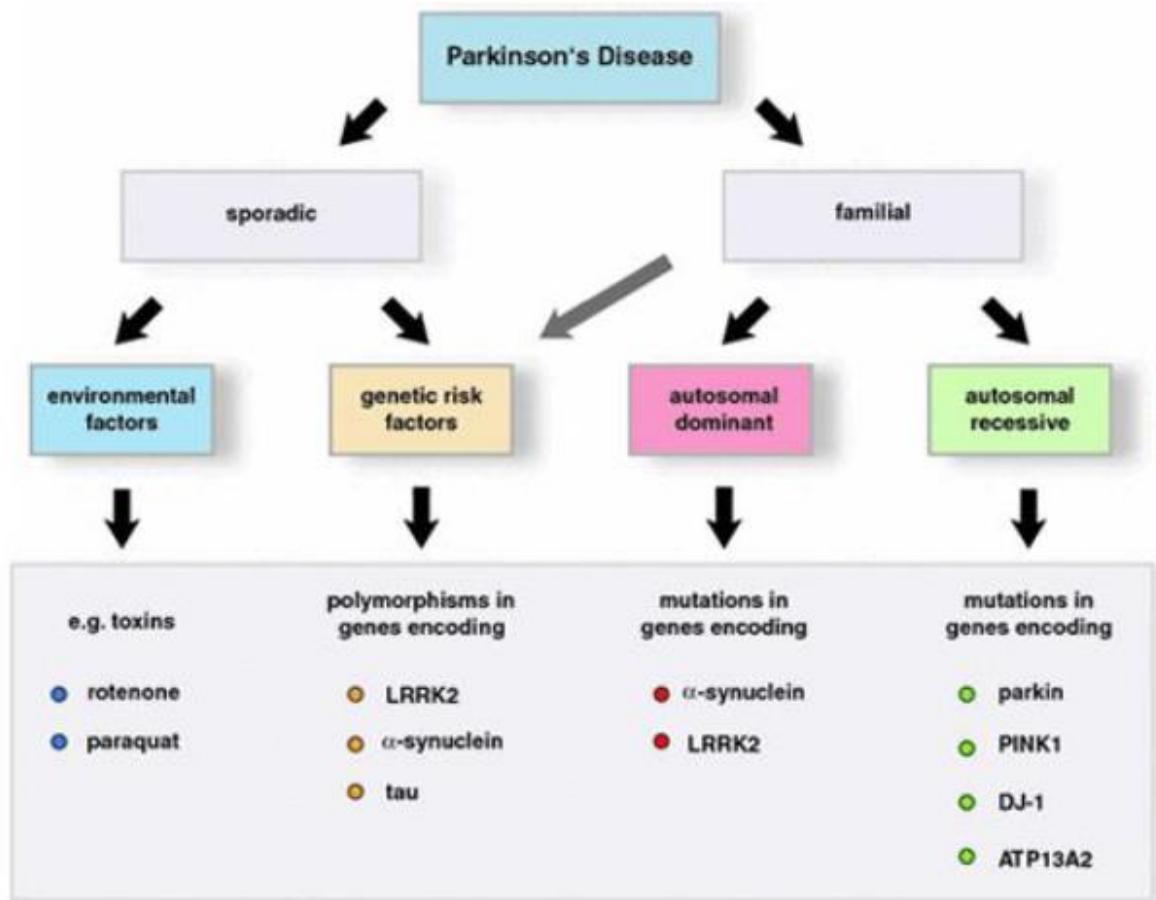
A nivel de patología se han descrito varios estadios en la enfermedad, en base a la **expansión de los cuerpos de Lewy y la progresión de la enfermedad**.

- **Síntomas premotores.** Fallos en el sistema nervioso autónomo y en la sensibilidad olfatoria.
- **Síntomas motores.** Deterioros relacionados con la función motora y con el sueño.
- **Síntomas cognitivos.** Deterioro tanto emocional como cognitivo.



Epidemiología y genética de la enfermedad de Parkinson

Tenemos dos grandes variantes de la enfermedad de Parkinson.



- **Familiar**

- Debida a mutaciones tanto **recesivas como dominantes**.

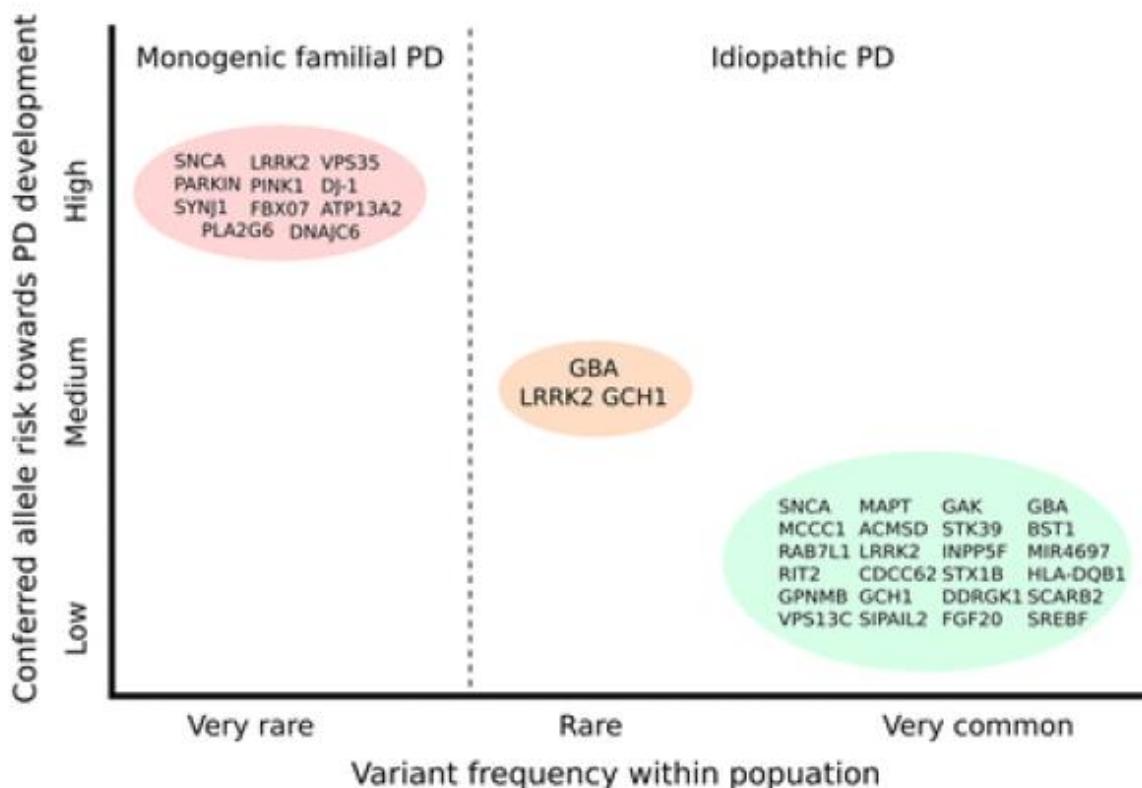
- **Mutaciones recesivas**
 - Parkin y PINK1.
 - **Mutaciones dominantes**
 - α -sinucleina
 - LRRK2

- **Esporádica**

- Es mayoritaria. 95% de los casos.

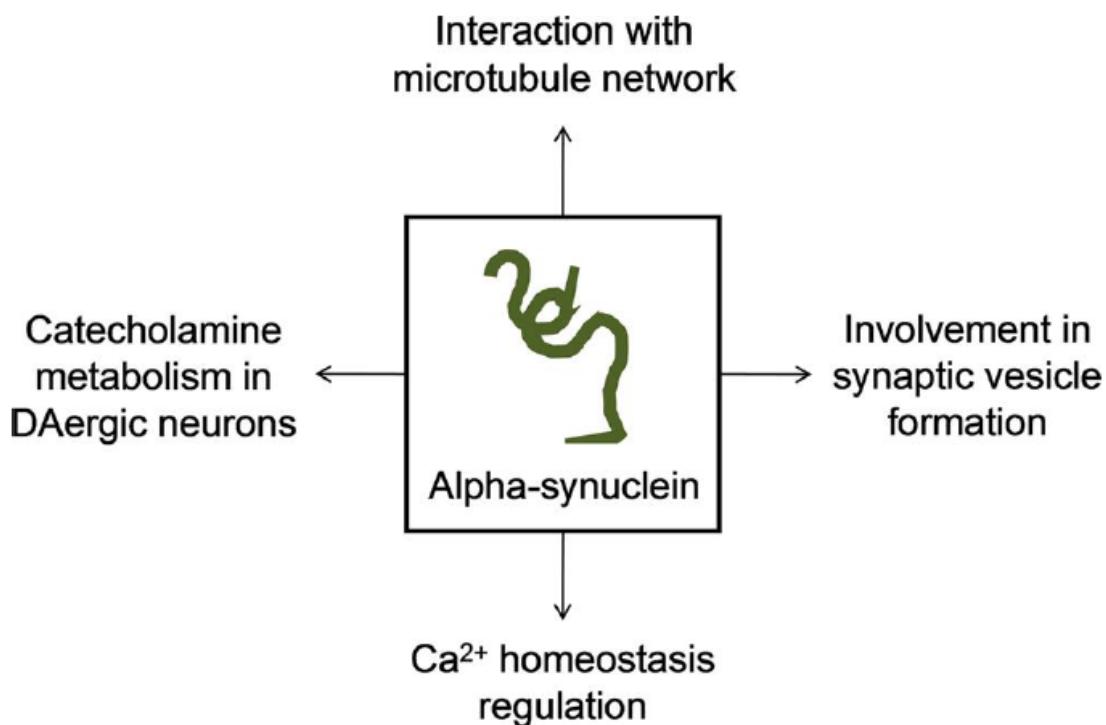
- **Factores de riesgo genético**
 - Polimorfismos en algunos genes, en concreto en **LRRK2**, α -sinucleína, tau
 - **Factores medioambientales**
 - **Exposición a rotenona y paraquat.** Ambas son neurotoxinas. Son agentes que inhiben el complejo I de la cadena transportadora de electrones, siendo insecticidas y plaguicidas.

Hay más genes implicados tanto a nivel de enfermedad familiar como esporádica. Estos van a estar en distintas vías.

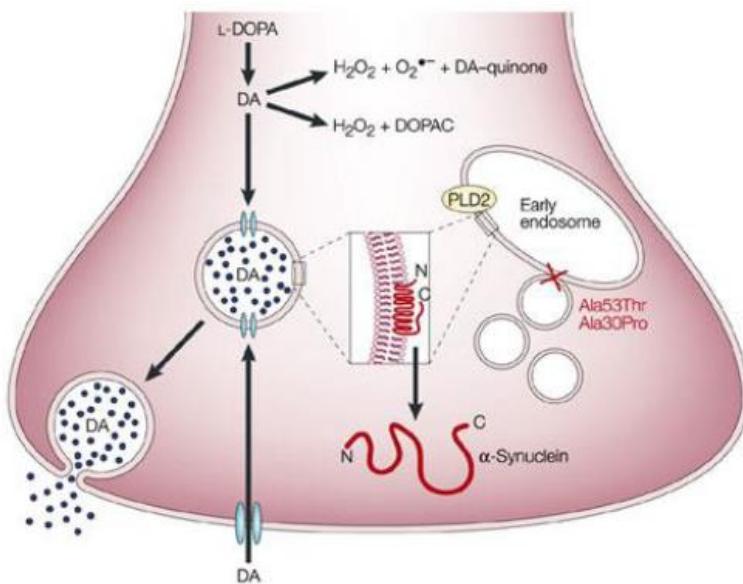


Papel de la α -sinucleína en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

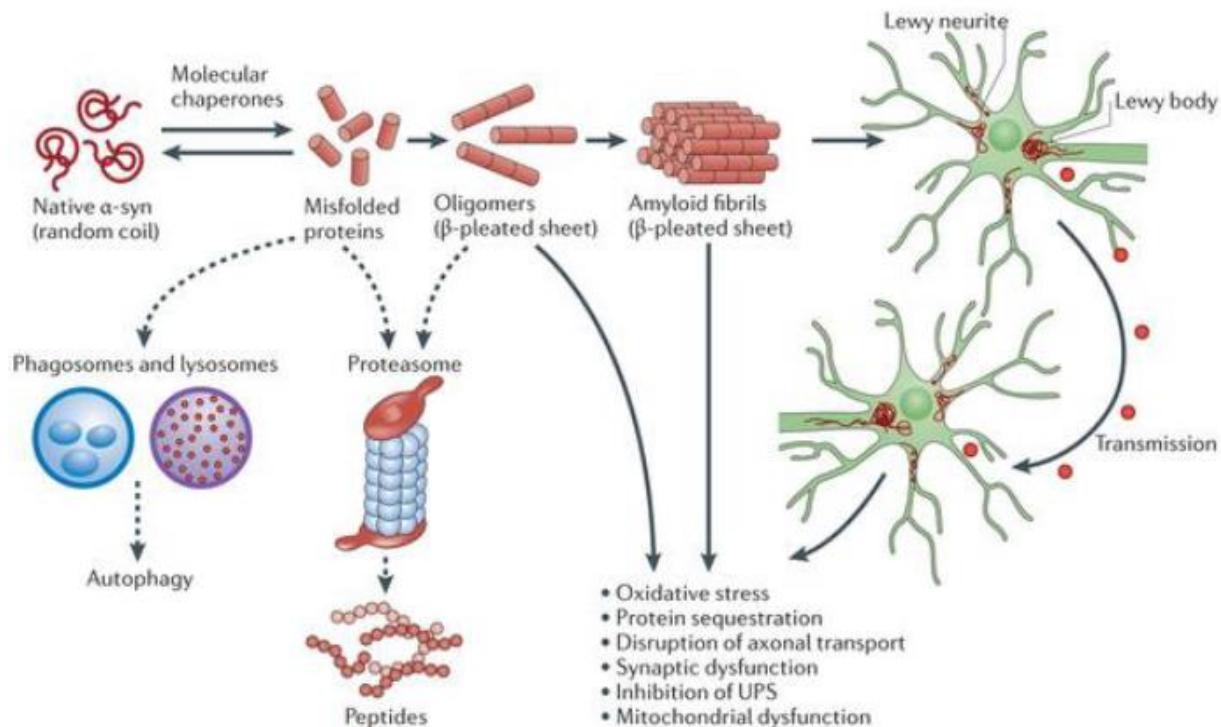
La α -sinucleína es una proteína que en **condiciones normales tiene distintas funciones**. Está implicada sobre todo en el transporte y formación de vesículas sinápticas. Tiene un **papel importante en el metabolismo de la dopamina**, la homeostasis del calcio y el metabolismo de catecolaminas en neuronas dopamínergicas.



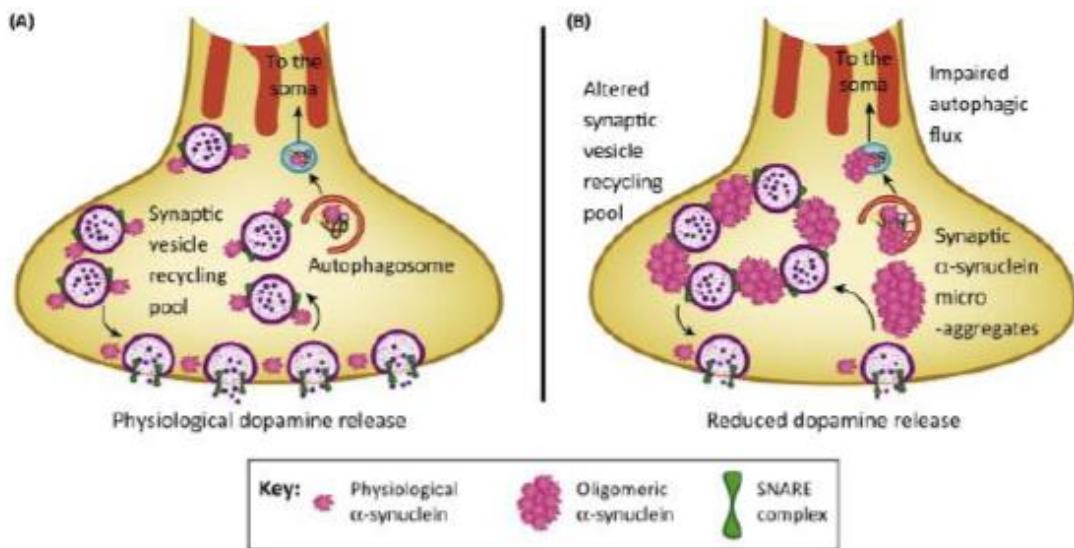
La dopamina ha de transportarse al interior de las vesículas sinápticas, participando en este transporte la α -sinucleína, interaccionando con estas vesículas y favoreciendo que se internalice la dopamina en la vesícula. La dopamina que no entra, es metabolizada por una serie de enzimas, generando ROS, que a su vez generan estrés oxidativo.



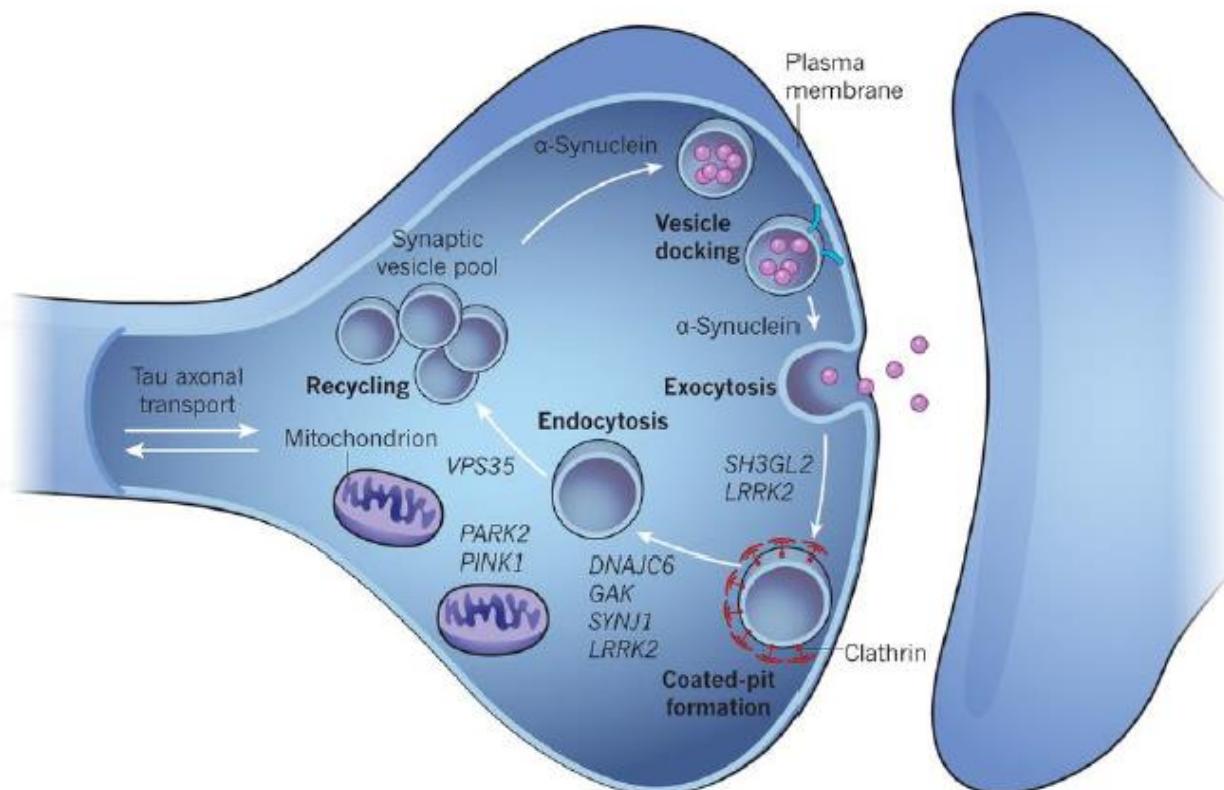
En la enfermedad de Parkinson, se forman agregados de α -sinucleína, formándose los cuerpos de Lewy. Estos agregados ejercen un efecto tóxico. Las mutaciones dominantes producirían el mal plegamiento de la misma. Además, parecería haber un efecto de dosis, pues las personas con 3 copias, en lugar de dos, del gen de la α -sinucleína desarrollan la enfermedad de Parkinson.



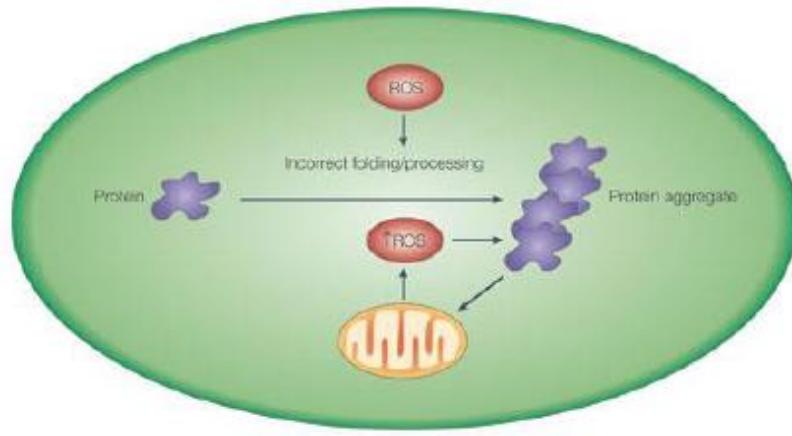
Los microagregados de α -sinucleína van a interferir con las vesículas sinápticas, disminuyéndose la liberación de dopamina a las sinapsis. Además, la dopamina se queda cada vez más en el citoplasma disparando el estrés oxidativo.



El papel de las vesículas sinápticas en la enfermedad de Parkinson está corroborado, porque además otros genes que están implicados una enfermedad de Parkinson también participan en todo el proceso de regulación de las vesículas sinápticas.

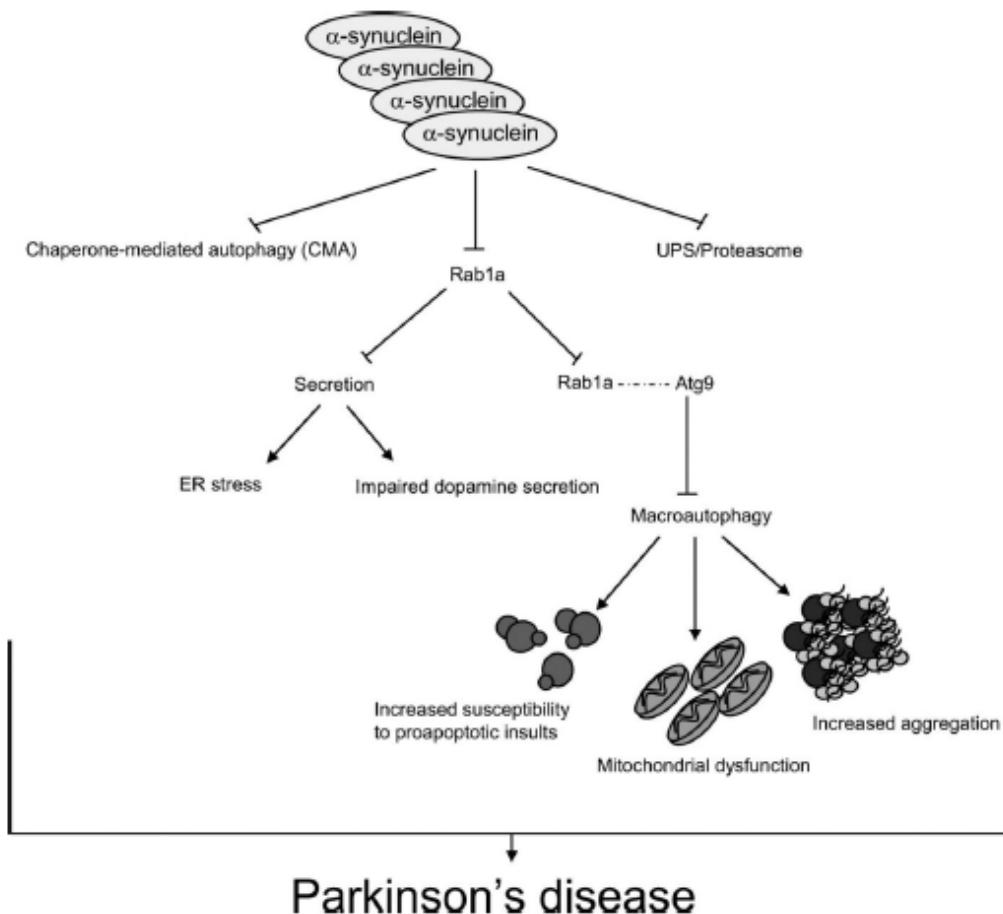


Otra de las cosas que causan estos agregados es la **disfunción mitocondrial por la interacción de los microagregados de α -sinucleína con mitocondrias**. Esto también generan **ROS**, que oxidan a la α -sinucleína, favoreciendo su agregación en un ciclo de feedback positivo.

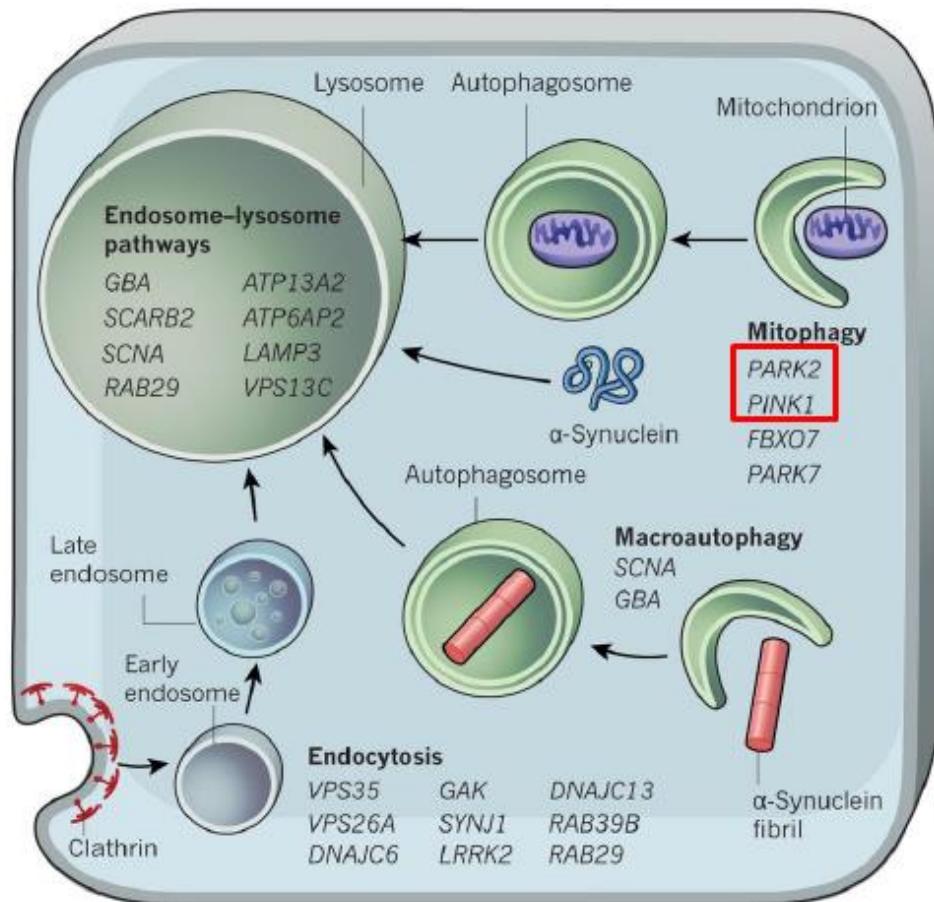


Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Los agregados de α -sinucleína tienen además un efecto **inhibidor de la autofagia**, produciendo un efecto de disfunción mitocondrial y con ello, más agregados.

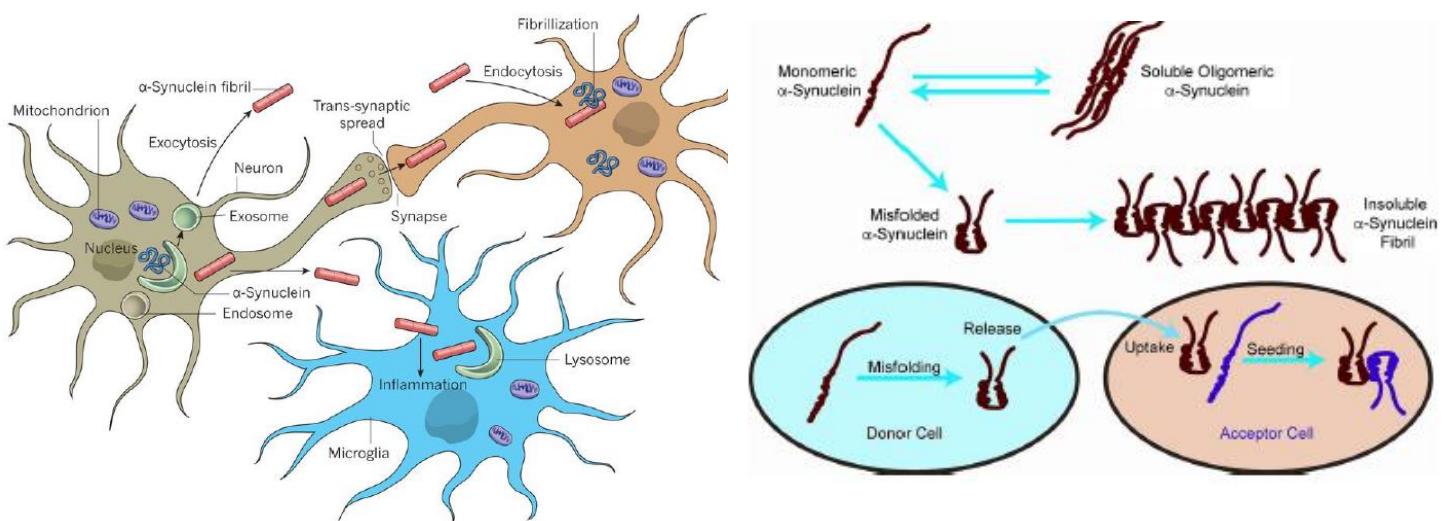


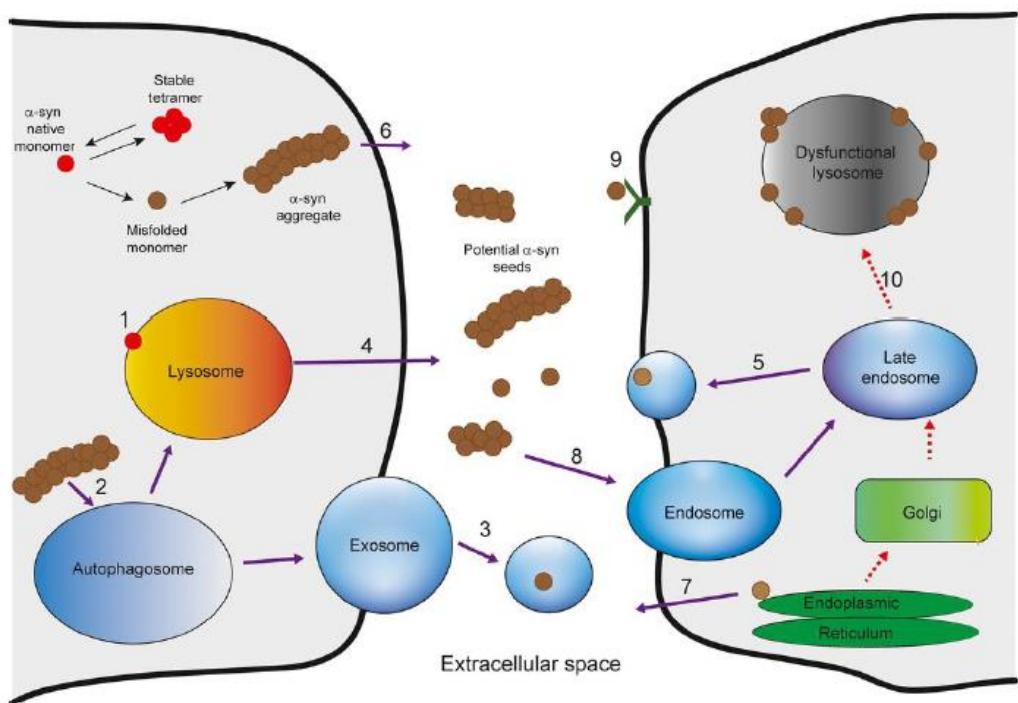
Hay otras proteínas implicadas en el control de la autofagia codificadas por **genes implicadas en la enfermedad de Parkinson**, en particular la **Parkina** y la **PINK1**, implicadas en mitofagia.



Los agregados de α -sinucleína son capaces de transmitirse a través de la sinapsis de unas neuronas a otras, **produciendo la expansión de la enfermedad de unas regiones del SNC a otras**.

Una de las estrategias terapéuticas que se probaron al principio fue el transplante de neuronas dopamínergicas. El paciente al principio mejoraba un poco, pero cuando se miraba el cerebro de los pacientes, al final, las neuronas se habían muerto y las que quedaban, **tenían muchos agregados de α -sinucleína**.

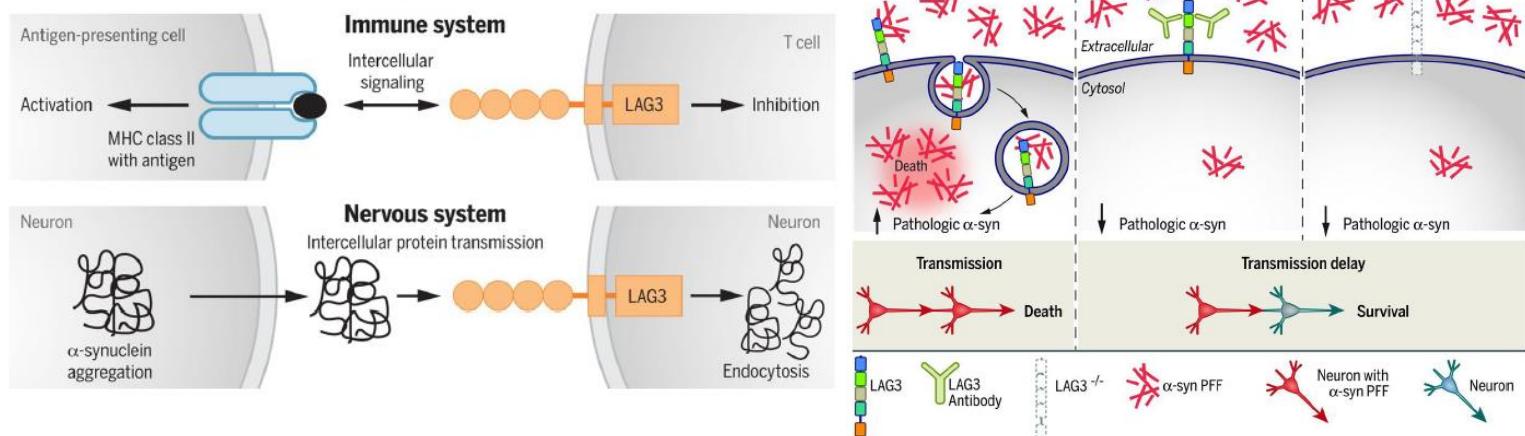




Se ha identificado una proteína, LAG3, que está implicada en el transporte de estos agregados. LAG3 está implicada en regulación del sistema inmune. Es necesario para que entren en una neurona los agregados de α -sinucleína. En un KO de LAG3, prácticamente no hay transporte. Si se trata con anticuerpos neutralizantes de LAG3 hay un menor transporte de α -sinucleína.

Intercellular transmission

LAG3 functions in neurons to facilitate the spread of pathogenic α -synuclein.

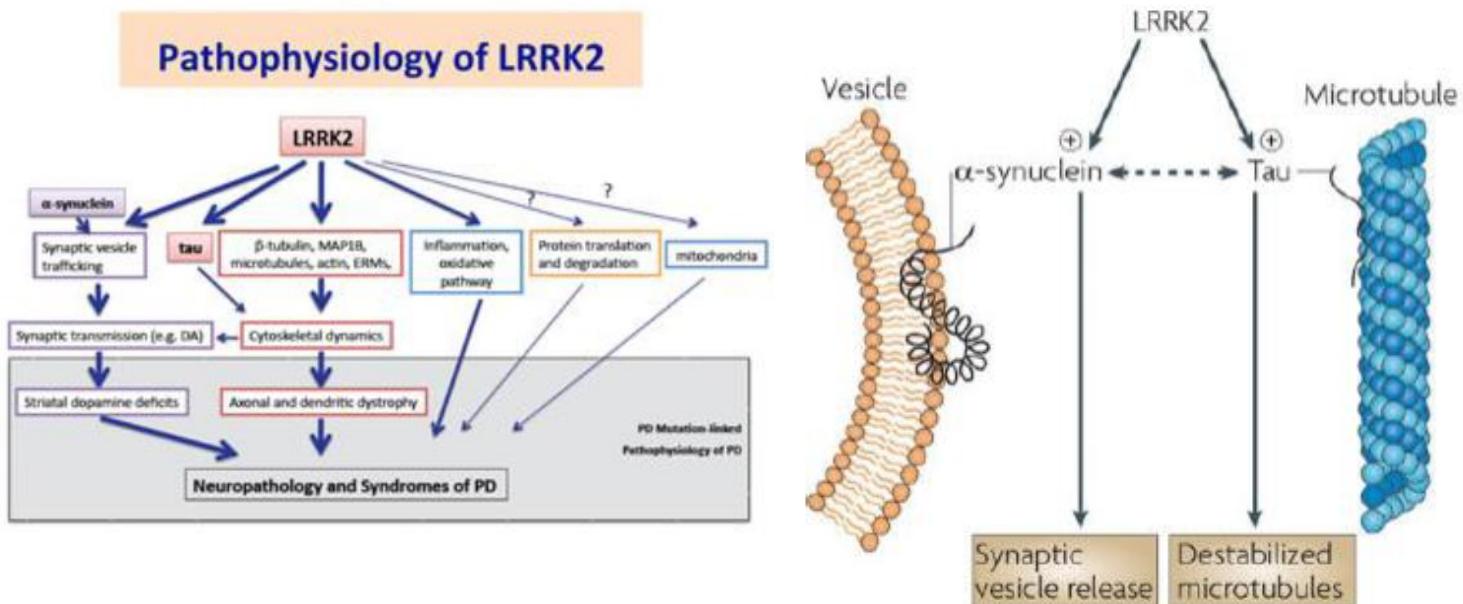


Papel de LRRK2 en enfermedad de Parkinson

LRRK2 es una quinasa multifuncional, que modifica muchas proteínas. Está implicada en muchos procesos:

- Participa en la regulación del tráfico de vesículas sinápticas
- Modifica los microtúbulos, capaz de fosforilar a tau. Hay muchos casos de Parkinson en los que aparecen agregados de tau.
- Control de la función mitocondrial y de la respuesta inflamatoria.

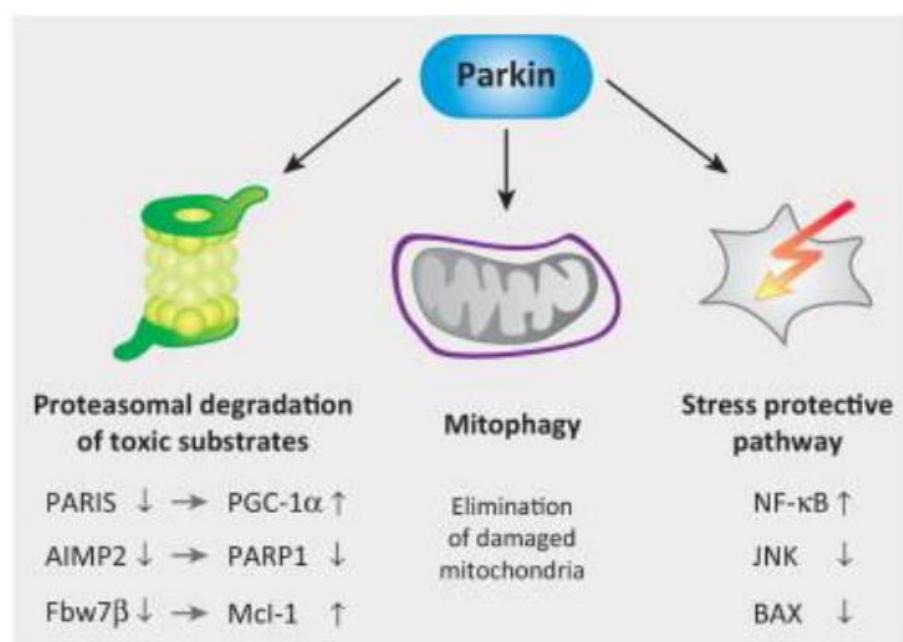
Dos de las dianas fundamentales de LRRK2 sería α -sinucleína y tau.



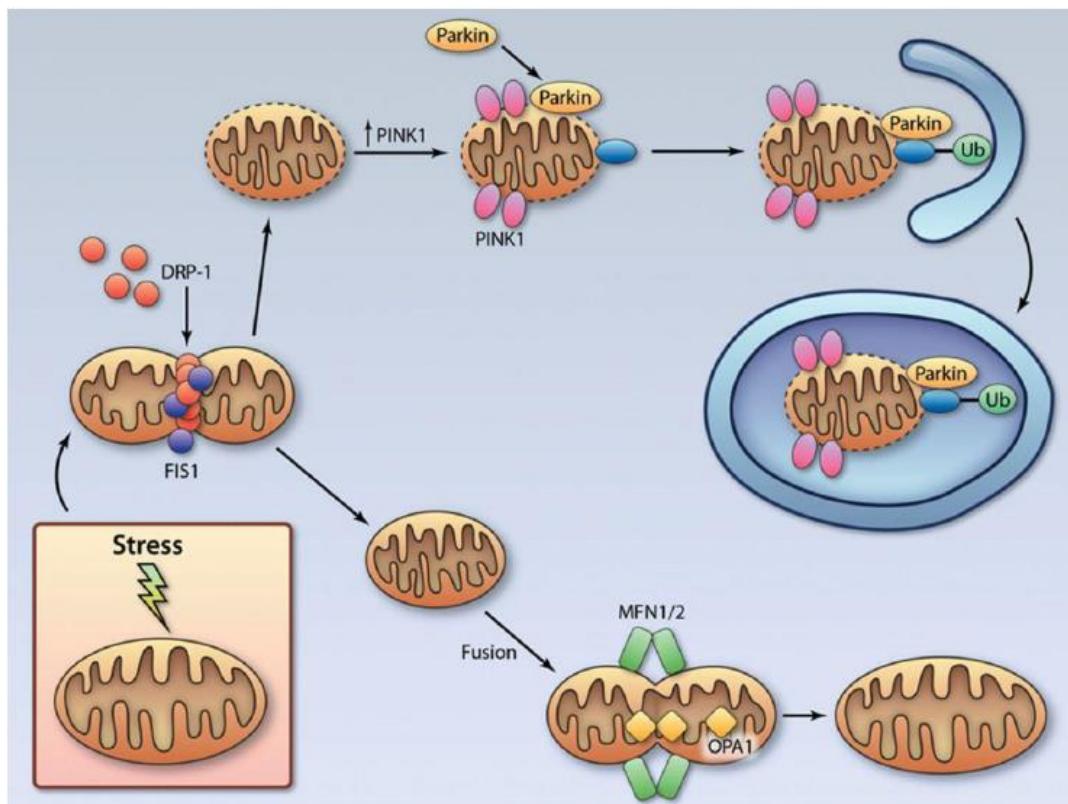
Papel de la Parkina en la enfermedad de Parkinson

La Parkina está implicada en la enfermedad de Parkinson por mutaciones recesivas. Está implicada en varias funciones:

- Degradación proteosómica
- Mitofagia
- Vías de protección al estrés



Está muy implicada en la mitofagia. Una de las vías importantes de mitofagia, **comienza cuando una mitocondria pierde el potencial de membrana**, siendo esto reconocido por PINK1. PINK1 es reclutada por mitocondrias dañadas, fosforila a una serie de proteínas y recluta a la Parkina. La Parkina es parte del sistema de ubiquitinación, **constituyendo la señal reconocida por el fagóforo**.



En los casos de Parkinson con mutaciones en parkina **prácticamente no hay agregados de α -sinucleína**. Esto nos hace pensar que **es posible una enfermedad de Parkinson sin agregados de α -sinucleína**, siendo lo más importante quizás no los agregados sino la falta de eliminación de mitocondrias dañadas.

Los casos más severos son los que se deben a mutaciones en LRRK2. Las mutaciones en PINK1, produce pocos agregados, pero los produce. La relación entre estas mutaciones y los agregados de α -sinucleína es incierta.

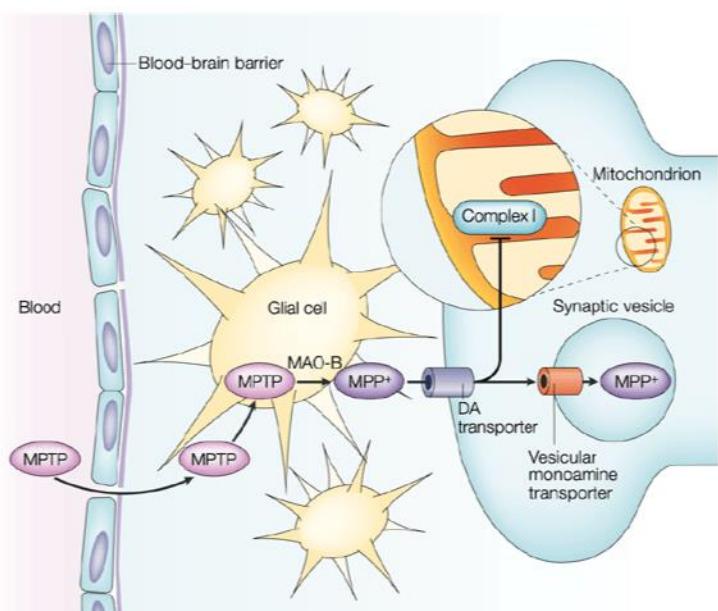
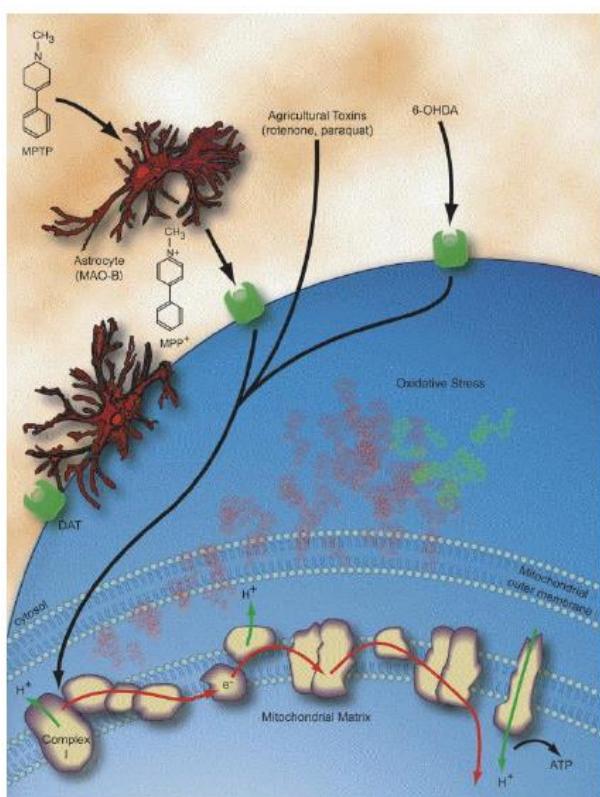
Modelos experimentales en la enfermedad de Parkinson

Como modelos experimentales, tenemos:

- Sustancias tóxicas que producen la degeneración de neuronas dopaminérgicas. Ratones y macacos tratados con MPTP. Pacientes jóvenes con Parkinsonismo fulminantes, todos heroinómanos, compuesto adulterante.

El MPTP sólo produce Parkinson cuando se introduce por equivocación. Se parece a la dopamina, engañando a muchas proteínas del metabolismo de la dopamina.

En astrocitos se degrada por la deaminasa, convirtiéndolo en MPP⁺ y entrando este a las neuronas dopaminérgicas por transportadores de dopamina. Allí, inhibe el complejo I en la ETC.



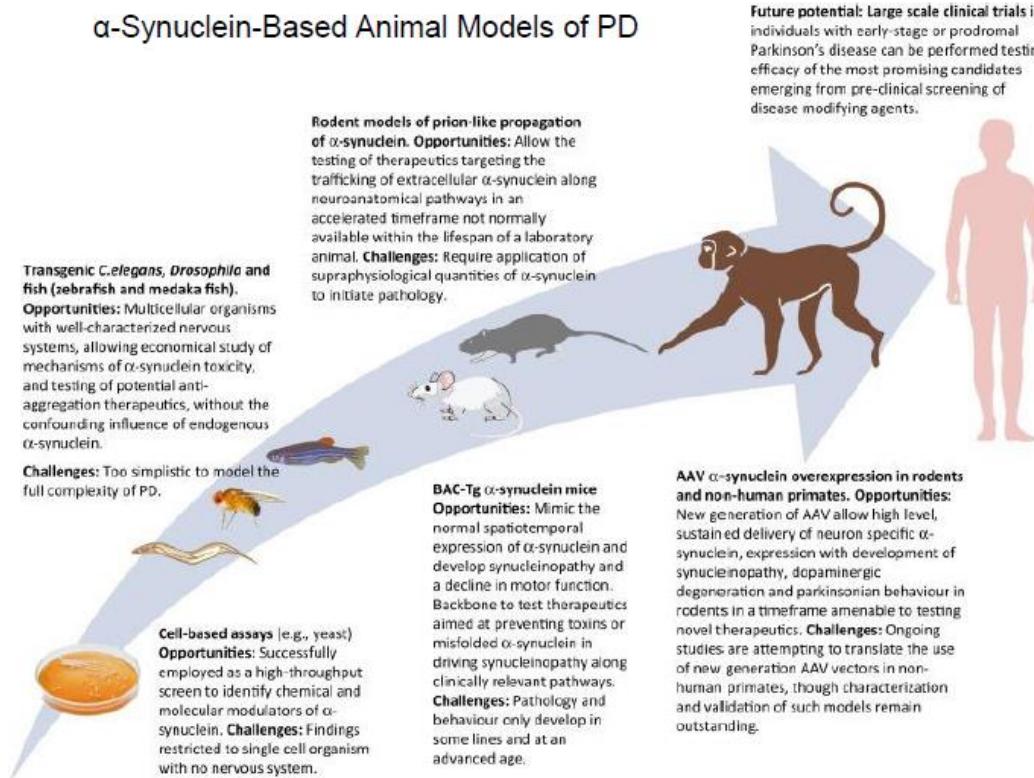
Nature Reviews | Neuroscience

En macacos produce una enfermedad de Parkinson con los mismos síntomas clínicos que la enfermedad humana. Es un modelo artefactual, siendo un Parkinsonismo fulminante. La enfermedad humana es crónica. Este modelo no forma agregados de α -sinucleína. El modelo se ha refinado, inyectando pequeñas dosis de MPTP de forma continuada, para conseguir un parkinsonismo más parecido al crónico. De esta manera, se ha obtenido una enfermedad de Parkinson que se parece a la humana y que tiene agregados de α -sinucleína.

Bases Moleculares de la Patología II

Enfermedad de Parkinson – 15-02-2019

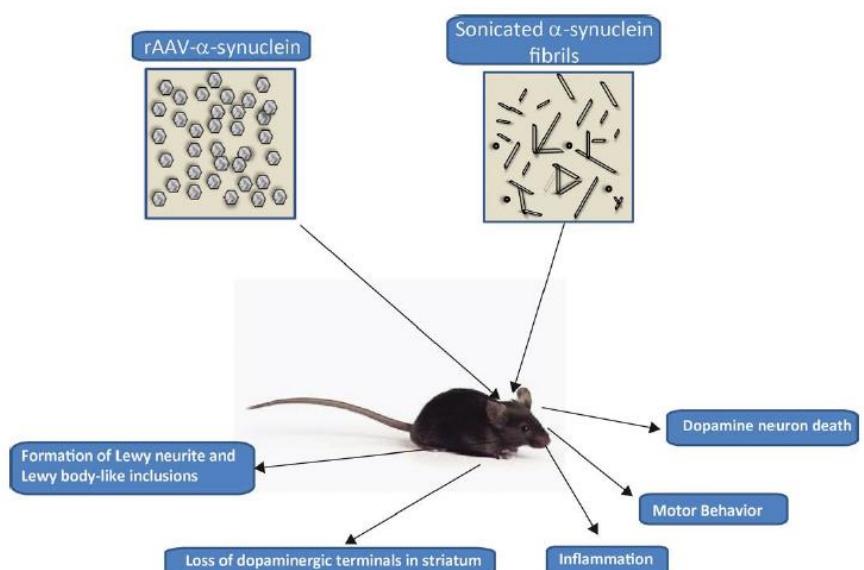
Modelos basados en sobreexpresión de α SNC

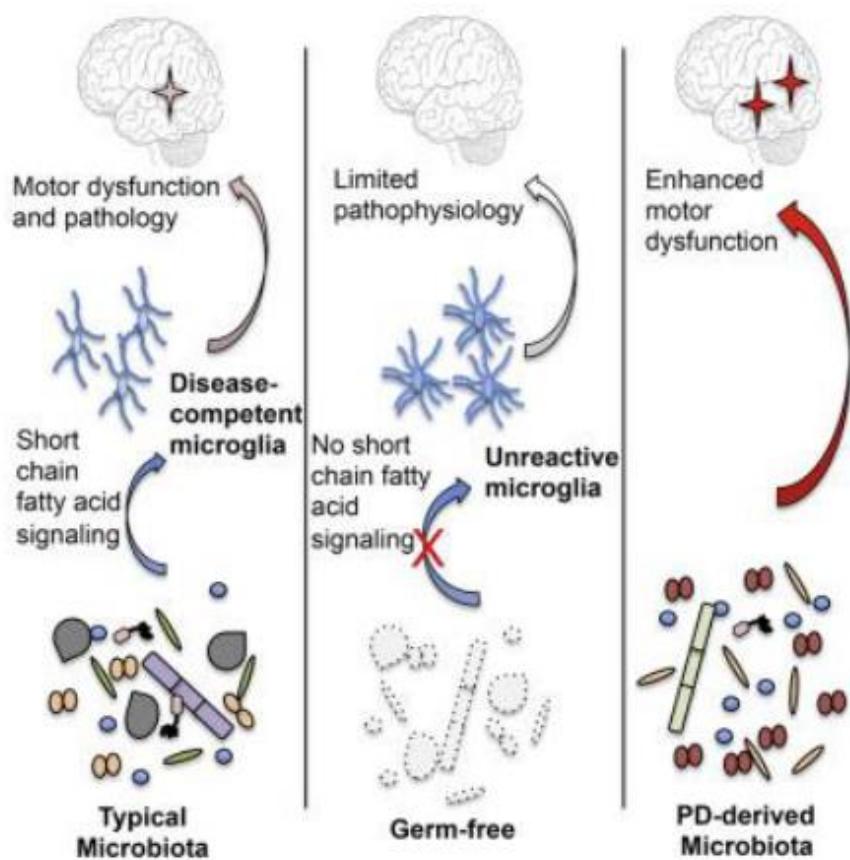


Se suele hacer con vectores de la α SNC virales con mutación de Parkinson. Sobreexpresión conduce a la formación de cuerpos de Lewy, pérdida de sinapsis dopaminérgicas, respuesta inflamatoria por interacción de los agregados con la microglía y muerte de las neuronas dopaminérgicas.

Se ha usado también en macaco, usando vectores virales. En lugar de usar vectores virales, **puedes inyectar fibras de α -SNC y se ve un fenotipo similar al Parkinson.** Por aislamiento de cerebros post-mortem, por sonicación.

Hay también **mutaciones recesivas en parkina y PINK1, pero no han resultado ser buenos modelos de parkinson. El KO de Parkina tiene un fenotipo mínimo, no es un buen modelo.**

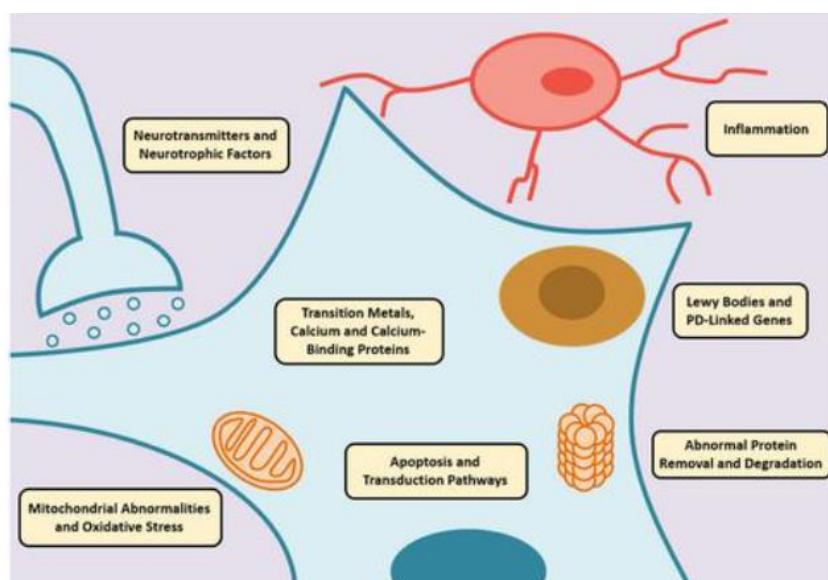




Visión integrada

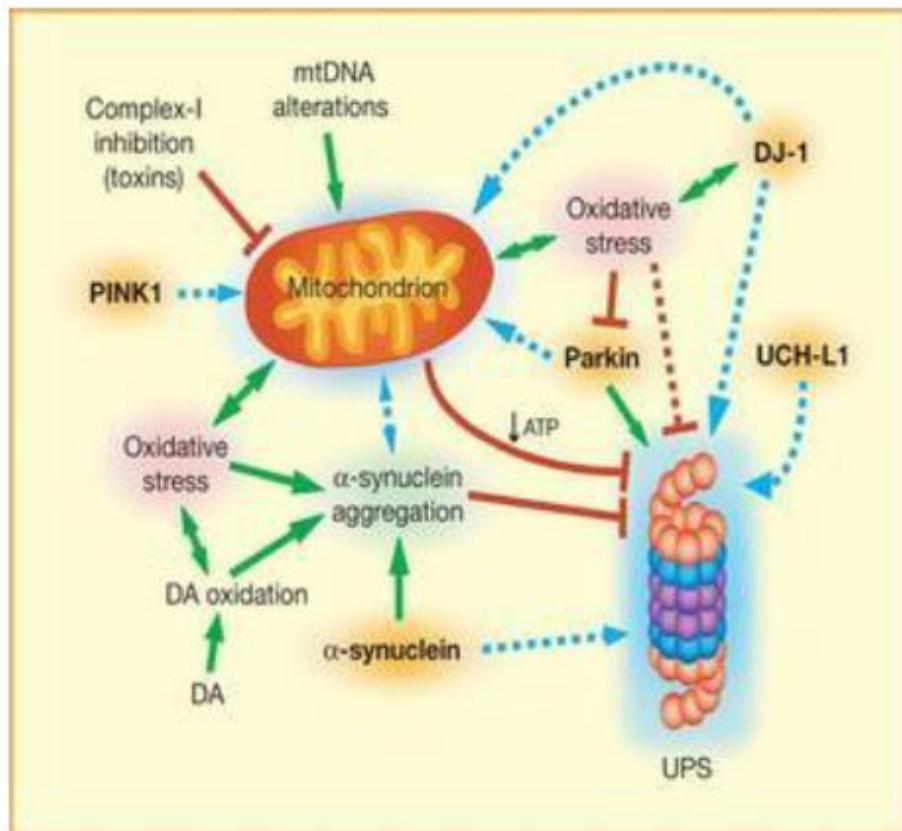
Alterados muchos procesos:

- Agregación de α SNC, que se puede ir de unas neuronas a otras.
- Interacción con microglía y que se transforma en una microglía neurotóxica.
- Implicación en función de vesículas sinápticas
- Control de la vía de lisosomas y autofagia
- Genes implicados con función mitocondrial



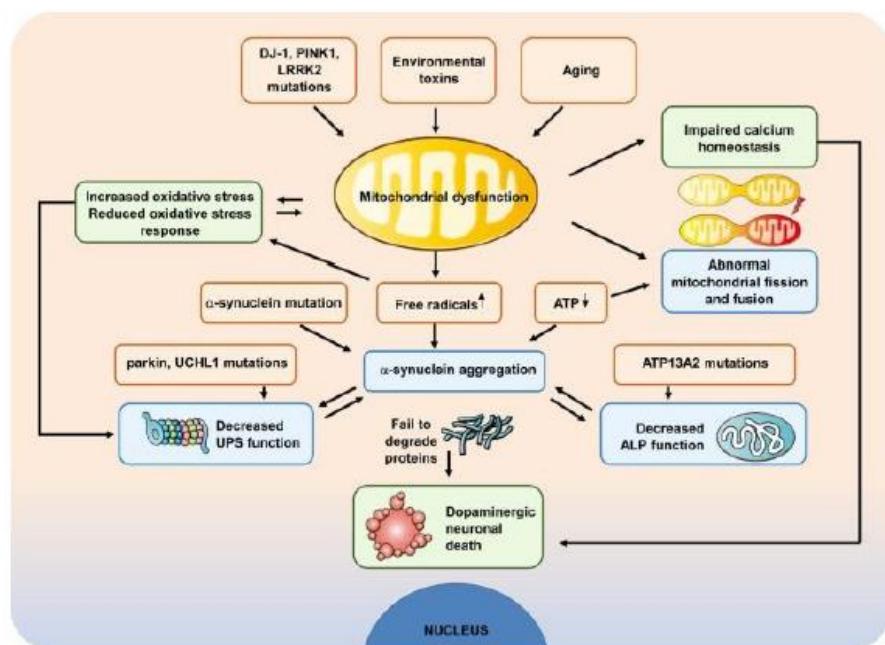
Todos podrían ser posibles dianas terapéuticas. Sería interesante saber qué viene primero y qué después, para relacionar.

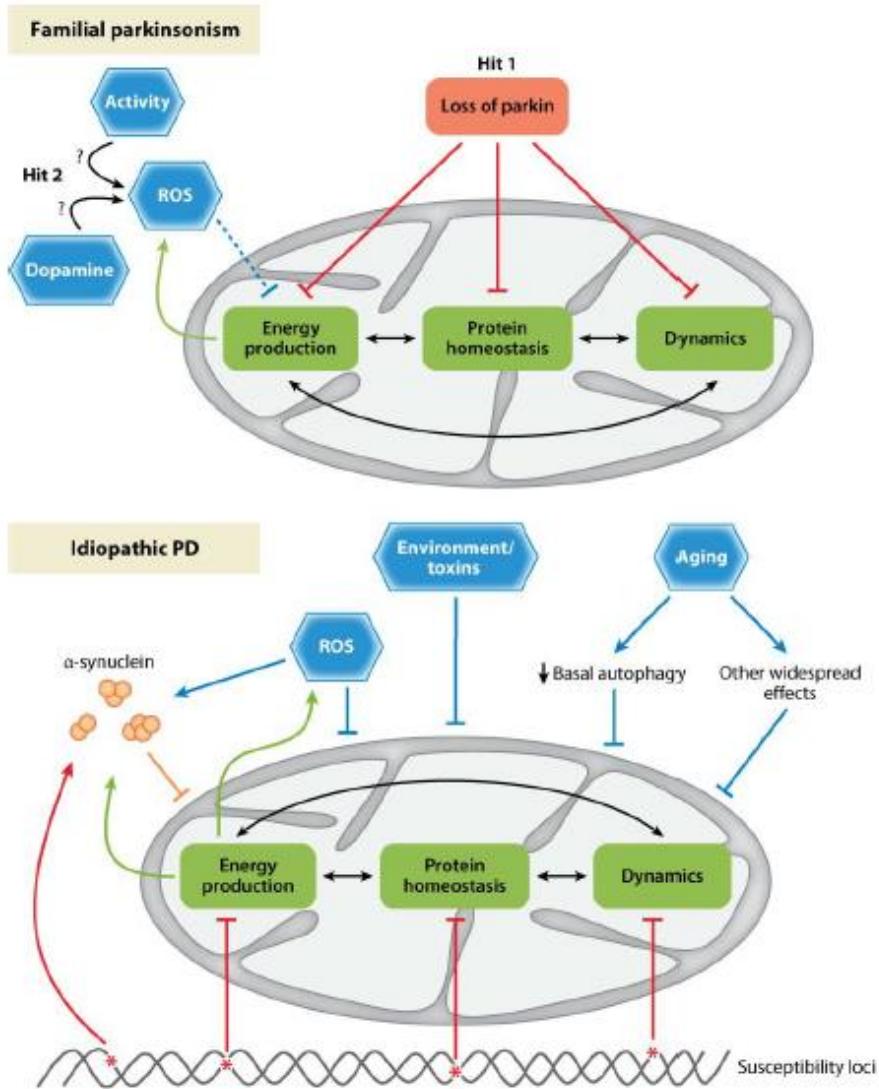
La visión predominante es una versión **mitocéntrica**. Es una **hipótesis de trabajo, no hay conclusiones definitivas**. Se ha visto que en todos los casos de enfermedad de Parkinson hay disfunción mitocondrial. En la inmensa mayoría, hay α -SNC, pero **hay casos de Parkinson sin agregados o casi sin agregados**.



También es cierto que neurotóxicos que afectan a las mitocondrias, producen Parkinson. Así, **serían el elemento común a la enfermedad de Parkinson**. En los casos en los que hay mutaciones en α SNC, los agregados interaccionan con la mitocondria y causan disfunción mitocondrial.

En otros casos, **dependiendo de si la disfunción mitocondrial es drástica o no, se verían o no se verían los agregados de α SNC (aunque sí muerte mitocondrial)**, dependiendo de si la disfunción es fulminante o crónica.



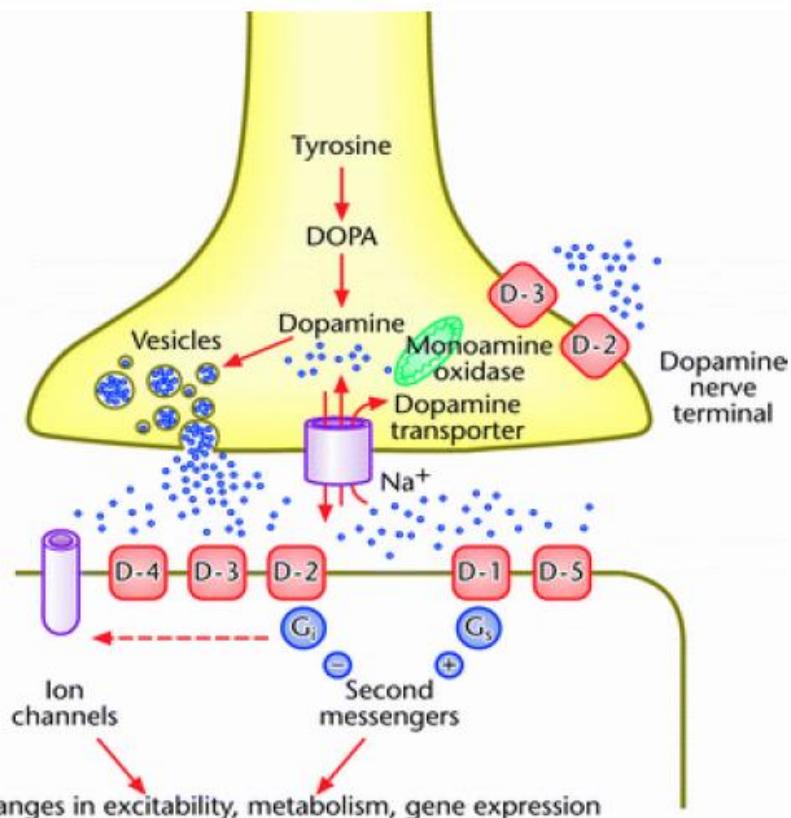


Terapia en la enfermedad de Parkinson

Sí tiene tratamientos sintomáticos y paliativos, muy eficaces al principio y luego dejan de serlo:

Sinapsis dopaminérgica

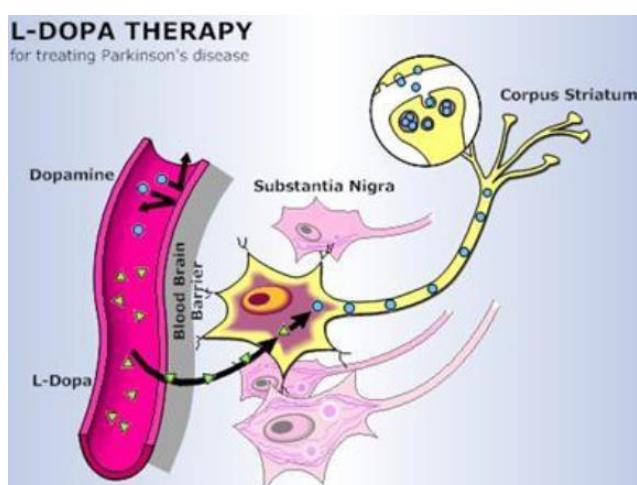
Aminoácido tirosina forma DOPA y al descarboxilarse, dopamine. Se almacena dentro de vesículas sinápticas, y actúan sobre los receptores dopaminérgicos. La dopamine es recaptada por los transportadores de dopamine.



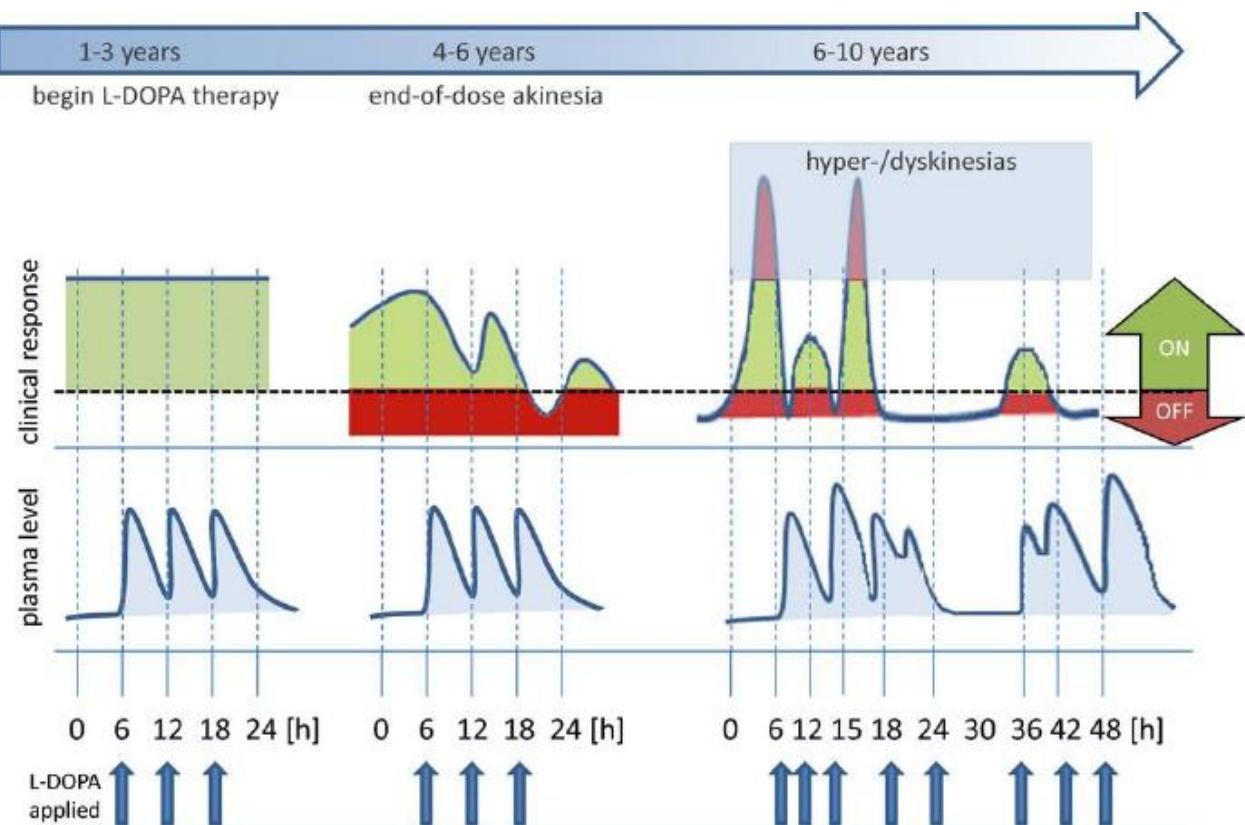
La no recaptada, se cataboliza por medio de la monoaminoxidasa o la ortocatecol metiltransferasa. En Parkinson, hay una pérdida de sinapsis dopaminérgicas en el núcleo estriado. Una de las terapias que se planteó es proporcionar DOPA a los pacientes.

DOPA es el precursor inmediato de la dopamine y puede pasar la barrera hematoencefálica, la dopamine no es capaz de pasárla. La DOPA la administramos y de la sangre llega al SNC, cargándose dentro de las neuronas dopaminérgicas.

Tenemos menos neuronas sobre el estriado, así que las que quedan, les ponemos mucha más DOPA, para que se libere mucha más dopamine. Funciona transitoriamente, porque la neurodegeneración sigue. Lo único que hacemos es que las neuronas que quedan sean más eficientes.



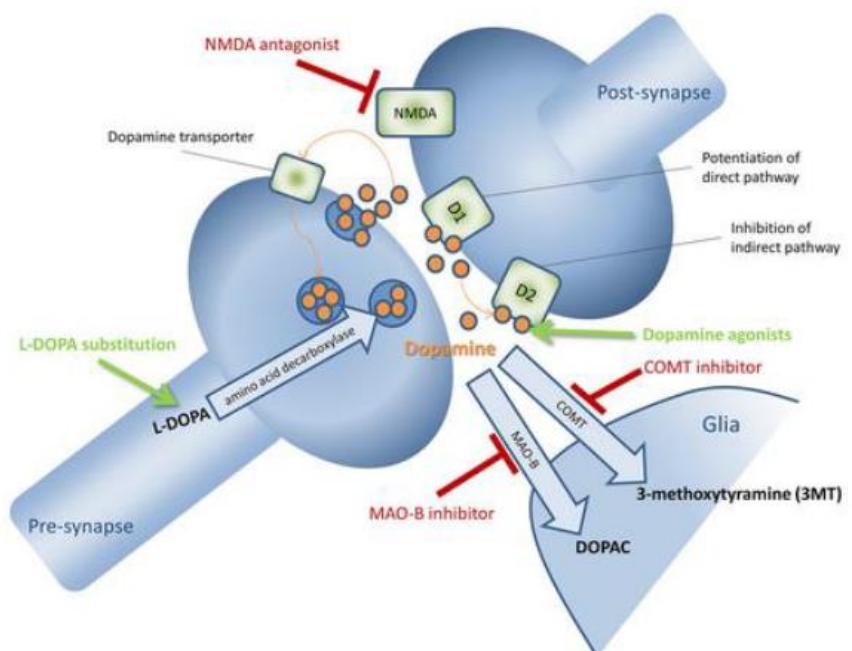
El tratamiento crónico acaba con problemas, como fluctuaciones motoras y disquinesias (**hiperkinesia y akinesia juntas**). En algunos pacientes, **algunos trastornos neuropsiquiátricos**.



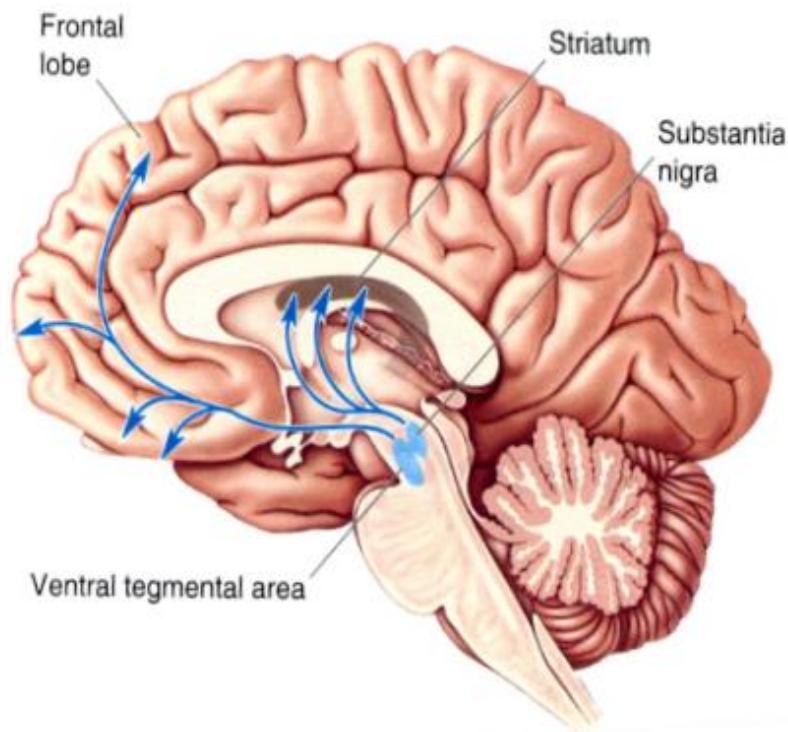
Se están probando otros fármacos, que buscan lo mismo: **potenciar la sinapsis dopaminérgicas**:

- **Agonistas de los receptores de dopamina**
- **Inhibidores de la monoaminoxidasa**
- **Inhibidores de la catecolortometiltransferasa**

Todos estos fármacos **hacen casi lo mismo que la DOPA**, el principio es el mismo. No detienen el proceso patogénico, **teniendo efectos secundarios que pueden tener una potenciación de sinapsis dopaminérgicas**.

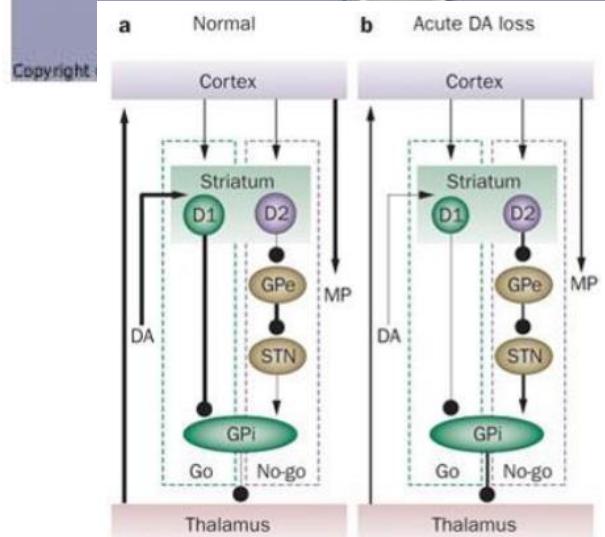
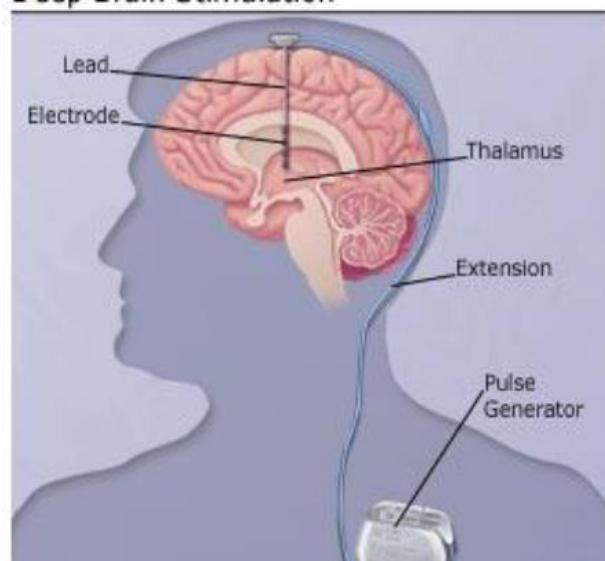


Además, **hay otras vías dopaminérgicas en el cerebro: área tegmental ventral que va al lóbulo frontal de la corteza cerebral**. Así, estos fármacos hiperactivan otras vías, lo que hace que se produzcan **problemas neuropsiquiátricos en pacientes más vulnerables por hiperactivación de sinapsis dopaminérgicas**.

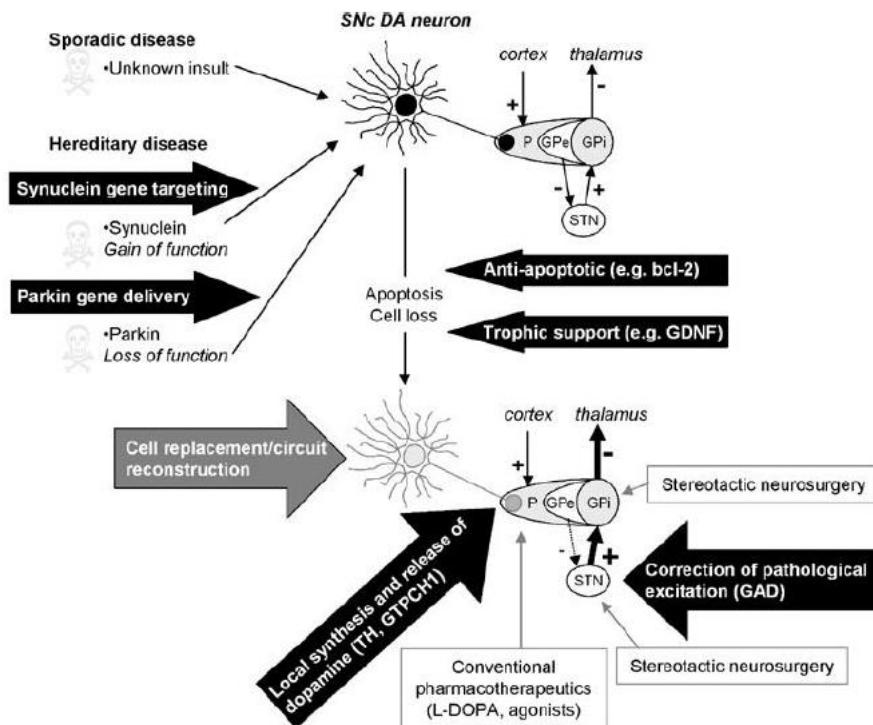


Otras opciones no basadas en fármacos pueden ser bastante invasivas. La estimulación cerebral profunda se basa en insertar electrodos dentro del cerebro, estimulando determinadas áreas dentro del cerebro. Se saca un cable por fuera del cráneo para aplicar las corrientes correctas. Se usa en pacientes que no responden bien a la DOPA.

Es una técnica problemática. La cirugía no es dolorosa, pues no tienen terminales sensoriales del dolor. No causa ningún daño cerebral de ningún tipo, pero tiene un riesgo asociado de infecciones. Funcionan mimetizando la pérdida de los cambios en los circuitos neuronales.



Se están buscando otro tipo de aproximaciones más basadas en mecanismos moleculares, una de ellas, la terapia génica.



- Proporcionar genes que codifican enzimas que producen la síntesis de la dopamina. Cambiamos el suministro de la DOPA por las enzimas.

Ventaja: constancia con respecto a los fármacos

Desventaja: no hacemos nada en el mecanismo de la enfermedad. Tratamiento sintomático y paliativo.

- Glutamato descarboxilasa en terapia génica. Convierte el glutamato en GABA, descarboxilándolo. El glutamato es un neurotransmisor excitador y el GABA inhibidor. Expresando glutamato descarboxilasa podemos convertir una neurona excitadora en inhibidora.

En el núcleo subtalámico, tendremos un exceso de activación en el globo pálido interno, con lo cual la inactivación de este por medio de GABA podría funcionar.

Ensayo clínico: funciona bien. No está claro que esto detenga el proceso patogénico, la disfunción mitocondrial sigue.

- Terapias génicas para Parkina mutada, αSNC con iRNA, edición genómica...
- Terapia celular. Consiste en proporcionar **neuronas dopaminérgicas**. El problema que se ha planteado es **que funciona durante un tiempo y posteriormente deja de funcionar**: la αSNC es capaz de entrar en ellas.
- Tratamiento con factores neurotróficos como GDNF – Factor neurotrófico derivado de glía, muy importante para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

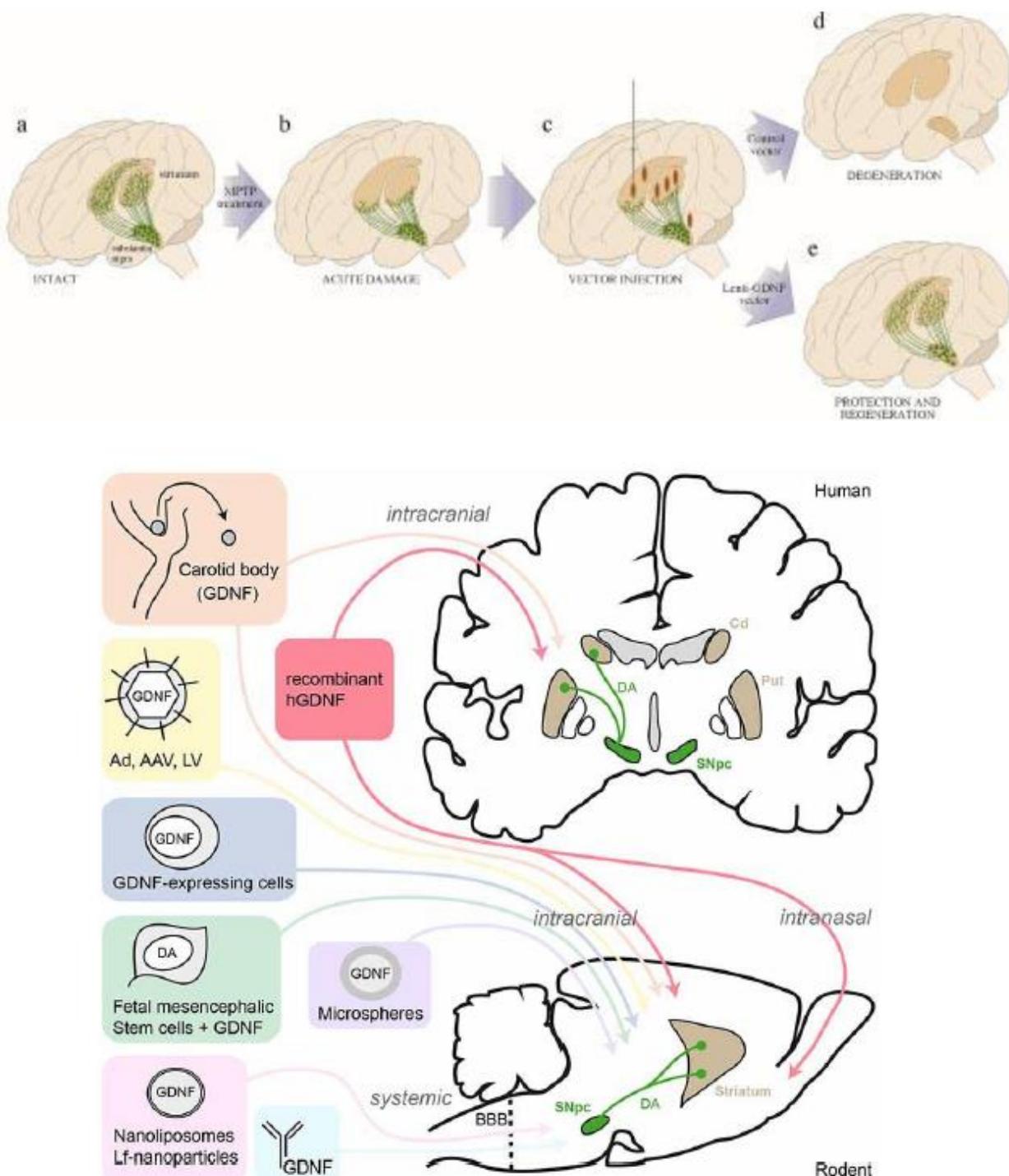
La ventaja es que se activan **muchas vías moleculares** que sí que pueden intervenir en los **mecanismos de patogénesis**, como por ejemplo, la disfunción mitocondrial.

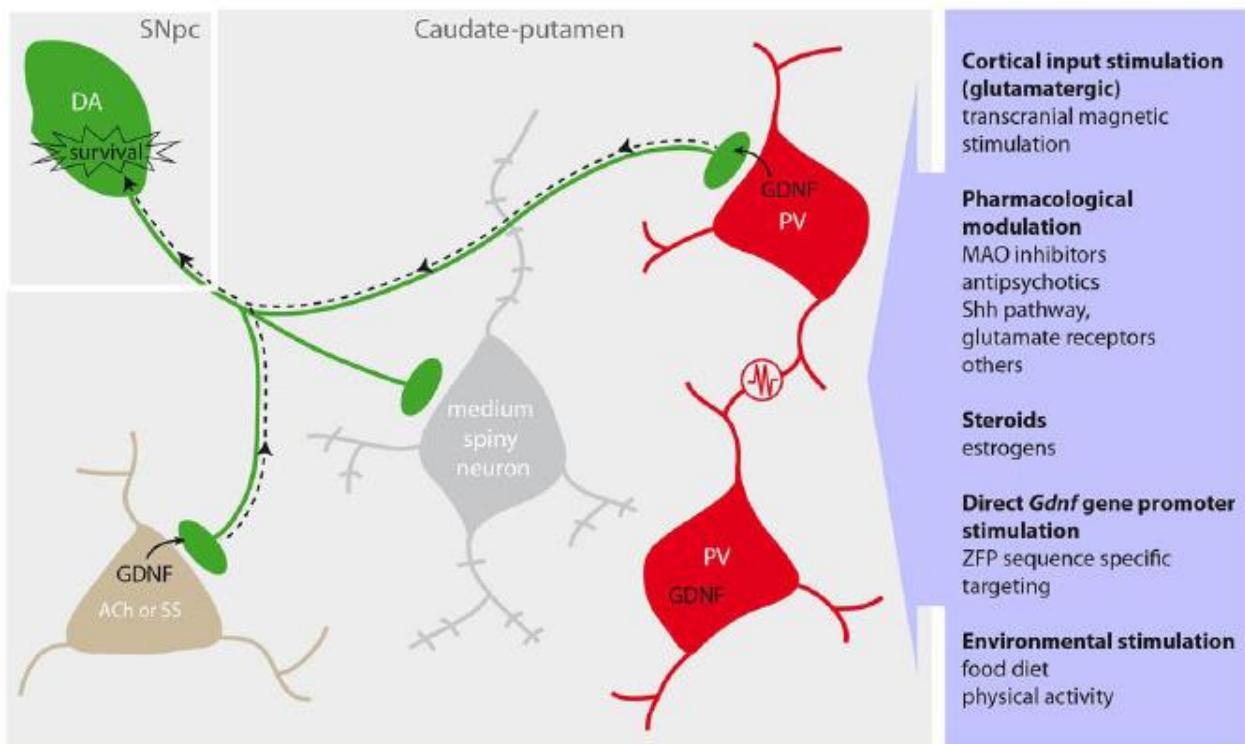
Experimentos en macacos con MPTP, usando vectores que llevan el gen del GDNF. Las células del estriado sobreproducen GDNF. Las neuronas dopaminérgicas que han

sobrevivido siguen vivas y forman muchas sinapsis en el estriado, restaurando la función dopaminérgica.

Con el GDNF se previene la muerte celular y se favorecen muchas sinapsis. Si se ponen estos sistemas en la substancia nigra, **se generan conexiones anormales hacia otros lugares.**

Question: ¿el GDNF, entonces, está actuando reforzando esas sinapsis dentro del núcleo estriado? Es decir, si lo ponemos en la substancia nigra, estamos favoreciendo la formación general de sinapsis, mientras que si lo ponemos en el estriado, ¿estamos favoreciendo las sinapsis hacia ese lugar?



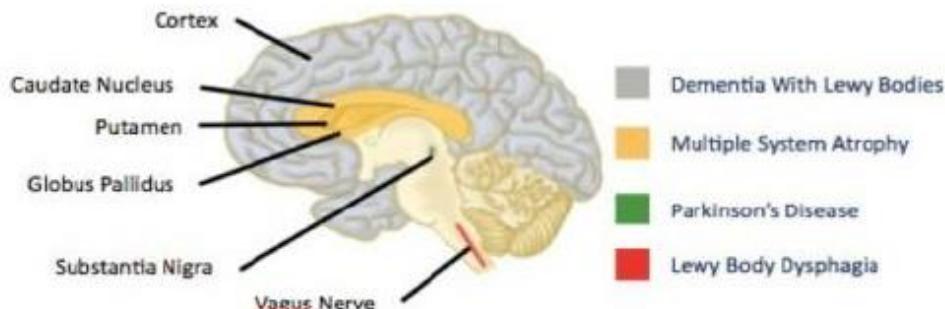


- **¿Modificación de microbioma?** Puede afectar al desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Experimentos un tanto “controvertidos” en ratones, **extrapolación a humanos es dudosa.**
- Ratones con distintas microbiotas pueden ser más o menos susceptibles en un modelo de sobreepresión de α SNC. Determinada composición del microbioma favorece más o menos una respuesta inflamatoria.
- Ciertas estirpes de bacterias podrían producir moléculas que sensibilizan a la microglía para secretar citoquinas proinflamatorias.

Otras sinucleinopatías

Hay varias enfermedades con agregados de α SNC.

A



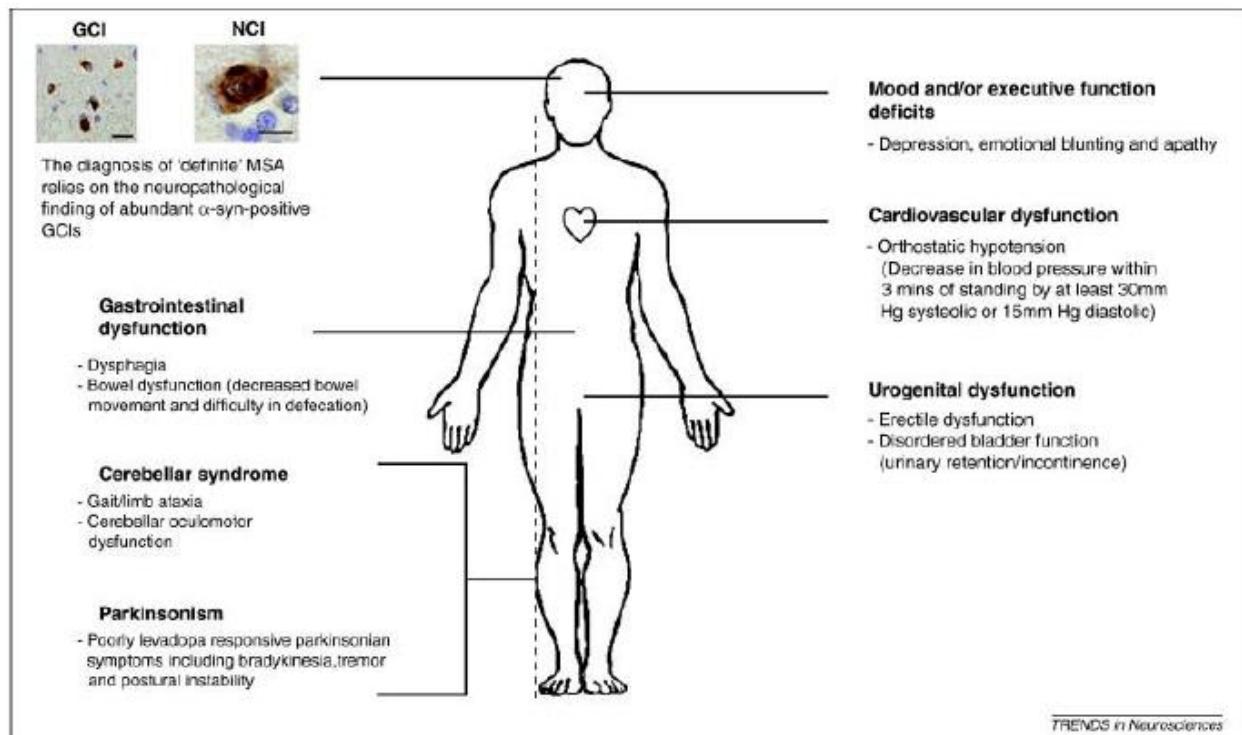
B

<u>Synucleinopathy</u>	<u>Regions Affected</u>	
Lewy Body Dementia	Substantia Nigra, Cerebral Cortex	Cell Death + α -Synuclein Misfolding
Lewy Body Dysphagia	Vagus Nerve	
Parkinson's Disease	Substantia Nigra	
Multiple System Atrophy	Caudate Nucleus, Substantia Nigra, Putamen, Globus Pallidus	

- **Demencia con cuerpos de Lewy.** Afecta principalmente a la corteza cerebral.
- **Disfagia con cuerpos de Lewy.** Los agregados de α SNC están en las neuronas que conectan el nervio vago
- **Atrofia multisistémica.** Agregados de α SNC, que se encuentran no sólo en las neuronas sino de manera muy preferente en células de glía y sobre todo en oligodendrocitos.

El patrón clínico tiene muchos trastornos.

- A nivel neurológico
 - **Cerebelosa.** Ataxia.
 - **Parkinsoniana.** Signos motores típicos del parkinsonismo.
 - En ocasiones también **depresión, apatía, déficits afectivos.**
- Suele tener **disfagia, disfunción urogenital y alguna disfunción cardiovascular.**

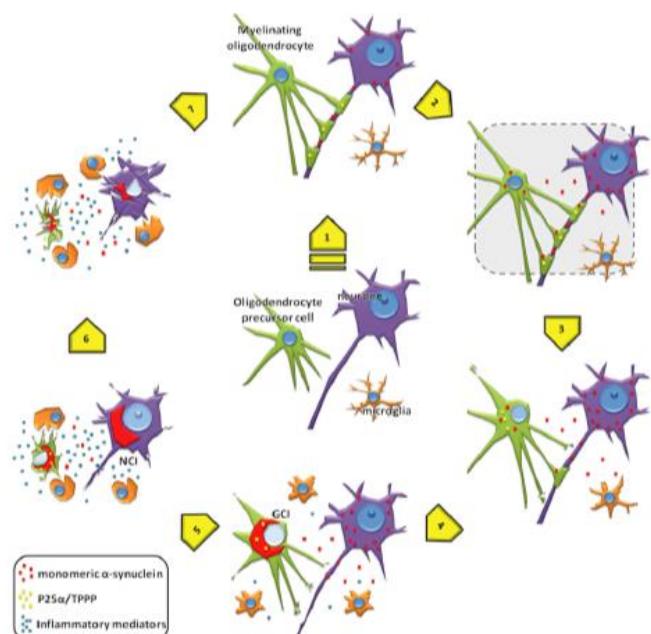


La característica histopatológica más marcada es la presencia de inclusiones en células gliales. Las regiones **atrofiadas** se ven afectadas dependiendo del tipo.

El trastorno ha sido mimetizado en ratones transgénicos en los que se sobreexpresa la SNC en oligodendroctos.

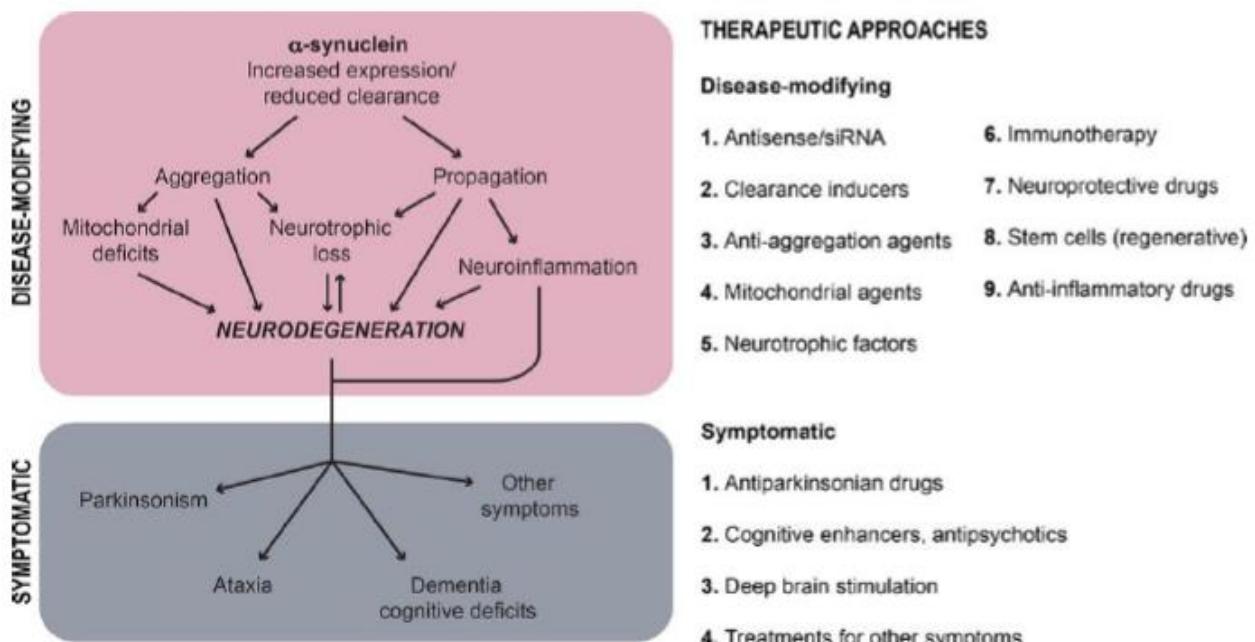
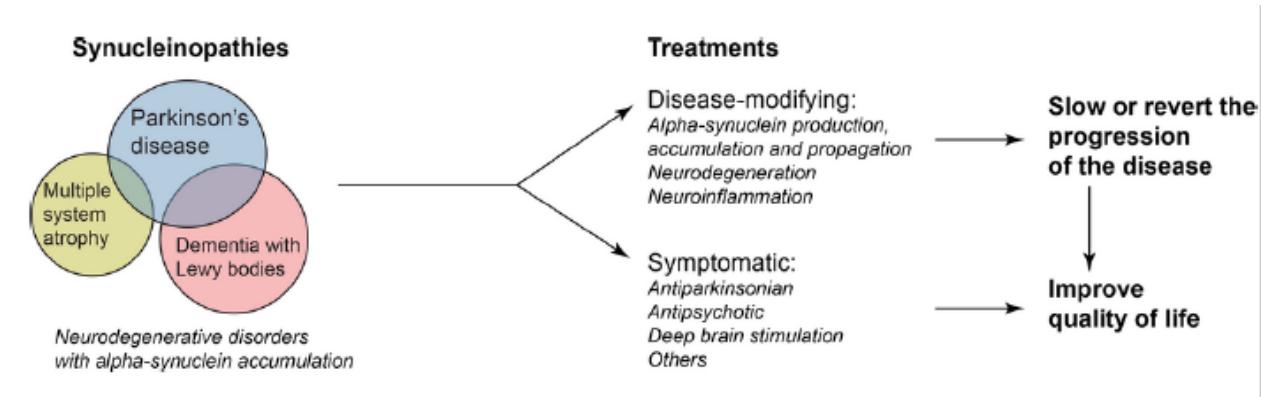
El mecanismo estudiado, dilucida que lo primero que se produce es una **acumulación de α SNC en el oligodendrocto**, que se transmiten a la neurona y causan disfunción dentro del oligodendrocto, **desmielinizando los axones (disfunción mitocondrial y metabolismo requerido para el mantenimiento de la mielina, muchos lípidos necesarios y mucho ATP)**.

Los agregados de α SNC en la neurona producen **interferencia con autofagia y disfunción mitocondrial**. La microglía se activa de manera **neurotóxica**, **produciendo mediadores inflamatorios**. Las neuronas pierden la función.



Tratamientos:

- iRNA contra la α SNC, edición genómica...
- Abordajes con factores neurotróficos, fármacos antiinflamatorios, mitotónicos...



Parece que la α SNC tiene dos tipos de plegamiento erróneo:

- Agregados que infectan solo a neuronas
- Agregados que infectan a neuronas y a células de glía

Bases Moleculares de la Patología

Ataxias – 05-03-2019

Grupo heterogéneo de enfermedades que afectan al cerebro y a la médula espinal. Caracterizadas por una inestabilidad postural.

Hay ataxias hereditarias, esporádicas y secundarias a agentes neurotóxicos o autoinmunes.

Ataxias espinocerebelosas dominantes

Las ataxias dominantes son **ataxias espinocerebelosas dominantes, se denominan SCA1-30...** Todavía se desconocen las mutaciones **responsables de estas enfermedades en algunos casos**. Casi la mitad de las ataxias dominantes, el mecanismo de patogénesis es una expansión del trinucleótido CAG.

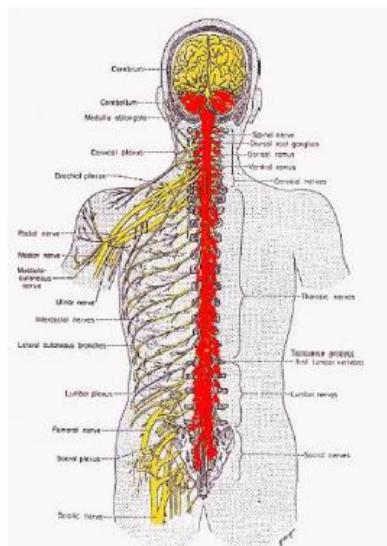
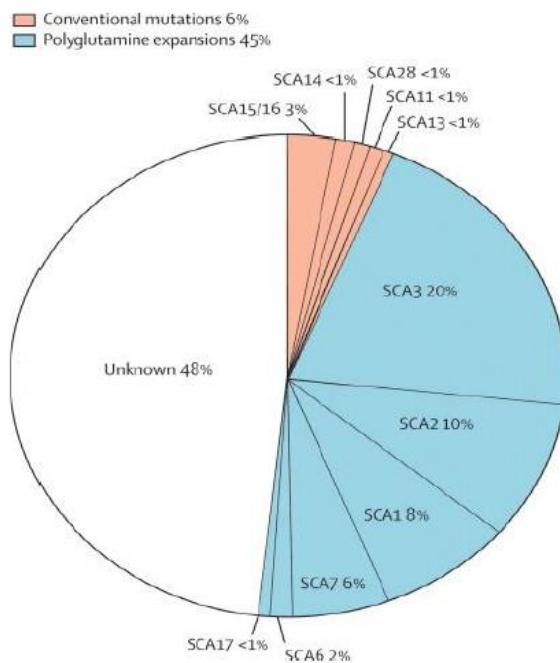


Fig. 2. The human central nervous system, exposed by dissection from the dorsal aspect. Shows the brain, spinal cord and the proximal parts of the spinal nerves.

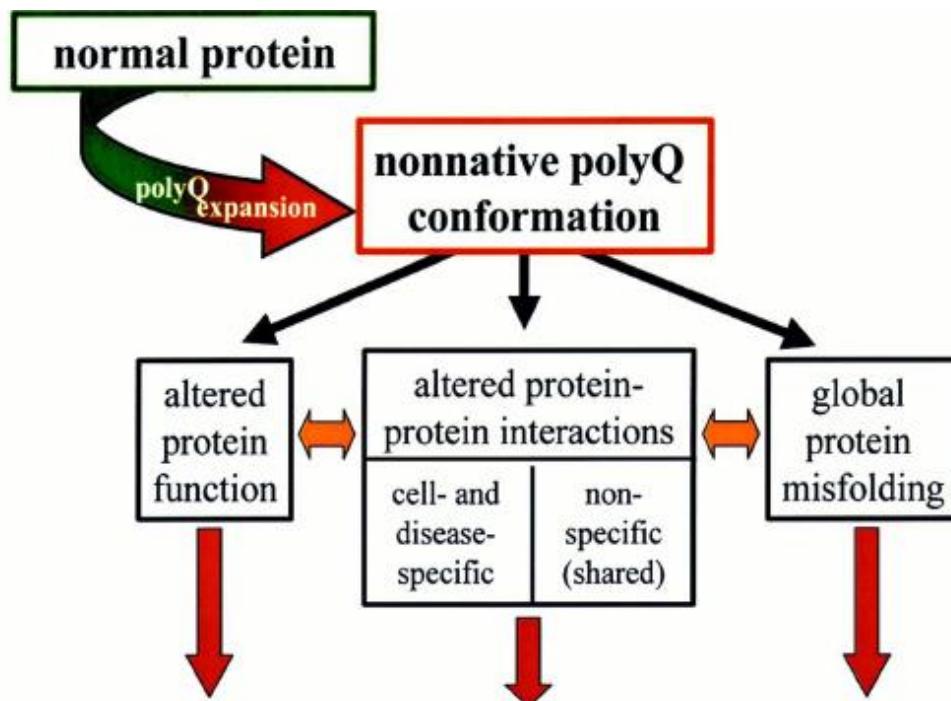
En torno al 10%, son mutaciones missense. Dentro de las dominantes las más frecuentes se deben a una **expansión de poliglutamina**. Estas proteínas tienen un número normal menor de 30 en las variantes sanas, mientras que a partir de 50, 100, 300 glutaminas dan lugar a enfermedad.

Este tipo de expansión se da también en la HD, en la hungtintina, afectando al estriado y corteza.

	HD Huntingtin	SCA1 Ataxin 1	DRPLA Atrophin 1	SCA 7 Ataxin 7	MJD Ataxin 3
Pathological range	CAG ¹²¹ CAG CAG CAG ³⁶ CAG ³⁴ CAG ⁶ CAG ¹	CAG ⁸¹ CAG CAG ⁴¹ CAG ³⁹ CAG ⁶	CAG ⁸⁸ CAG CAG ⁴⁹ CAG ²⁵ CAG ⁷	CAG ³⁰⁶ CAG CAG CAG ³⁷ CAG ³⁵ CAG ⁴	CAG ⁷⁹ CAG CAG ⁶⁸ CAG ³⁶ CAG ¹³
Normal					
5' UTR					
Normal					
Pathological range	CAG ¹⁵ CAG ²⁹ CAG ³⁵ CAG ⁴⁰ CAG ⁶²	CAG ¹¹ CAG CAG ⁴⁰ CAG ⁶²	CAG ²⁵ CAG CAG ⁴² CAG ⁴² CAG ⁶³	CAG ⁴ CAG ¹⁶ CAG ²¹ CAG ²²	
ORF					
Normal					
Pathological range	CAG ¹⁵ CAG ²⁹ CAG ³⁵ CAG ⁴⁰ CAG ⁶²	CAG ¹¹ CAG CAG ⁴⁰ CAG ⁶²	CAG ²⁵ CAG CAG ⁴² CAG ⁴² CAG ⁶³	CAG ⁴ CAG ¹⁶ CAG ²¹ CAG ²²	
	SCA2 Ataxin 2	SBMA Androgen Receptor	SCA 17 SBMA	SCA6 Ataxin 6	

En el receptor de andrógenos, se da la spinobulbar motor ataxia.

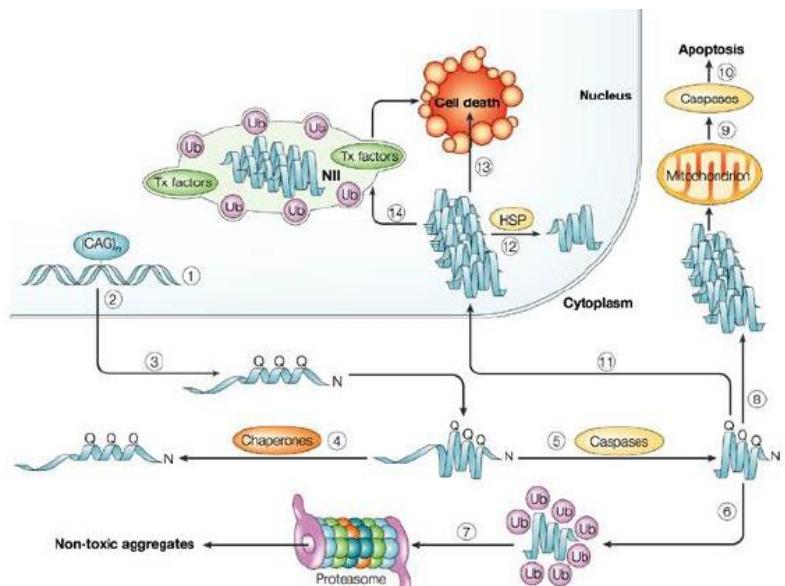
Cuando se produce esta extensión de glutaminas hay un cambio conformativo de la proteína, que puede llevar a un cambio o no de la función de la proteína. Además de eso, suelen producirse cambios en las interacciones con estas proteínas y una formación de oligómeros y agregados.



Neuronal dysfunction and degeneration

Cuando hablamos de una mutación recesiva, normalmente hablamos de pérdida de función; pero en mutación dominante puede darse una ganancia de función o una pérdida de función. Con las poliglutaminas, hay una ganancia de función tóxica debido a que hay nuevas interacciones/agregados y puede haber o no una pérdida de función normal.

Las poliglutaminas formarían microagregados capaces de interaccionar con factores de transcripción dentro del núcleo y por lo tanto alterar la expresión de los genes, siendo además capaces de interaccionar con las mitocondrias y producir disfunción mitocondrial. En cada caso concreto, hay otros tipos de interacciones que se dan, pero estos anteriores serían los mecanismos patogénicos comunes.



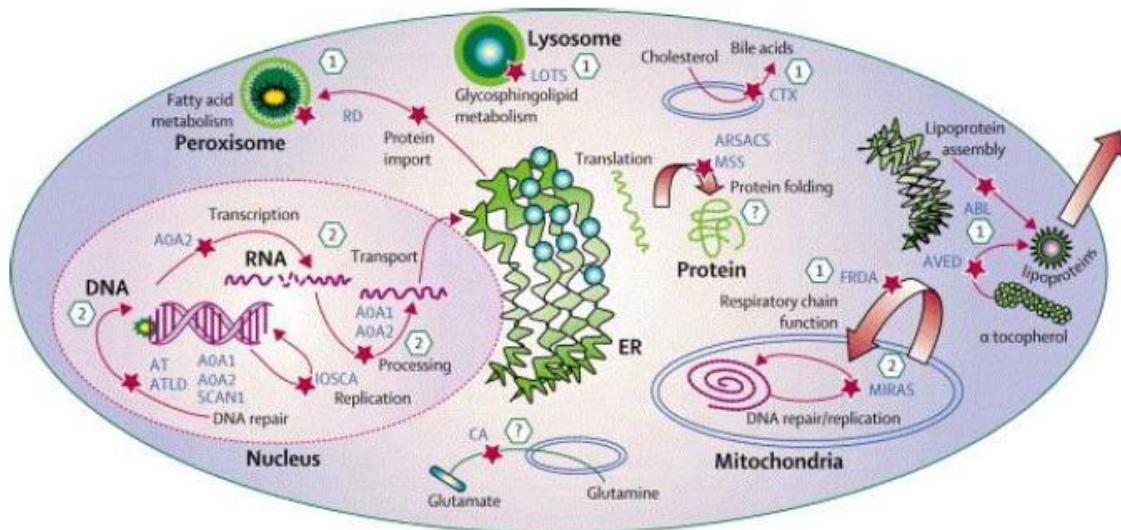
Ataxias autosómicas recesivas

Las ataxias (ARCASs) son ataxias cerebelosas autosómicas recesivas, se caracteriza por una aparición generalmente antes de los 20 años. En las dominantes, suele darse entre 25-45 años.

En general, en las recesivas la edad de aparición es anterior a los 20 años. Suele presentarse una mayor atrofia cerebelosa en algunos casos, otros más en la atrofia de la médula espinal, a veces es combinada y otras veces también se ve una afectación de nervios sensitivos y motores.



Las ataxias cerebelosas recesivas tienen una variedad de enfermedades debidas a mutaciones en genes que codifican una gran variedad de proteínas. Si mapeamos las proteínas que están codificadas por genes asociadas a ataxias recesivas hay tres grandes grupos:



The pathways or sites affected by the various underlying mutations causing the different autosomal recessive ataxias are indicated by a red star.

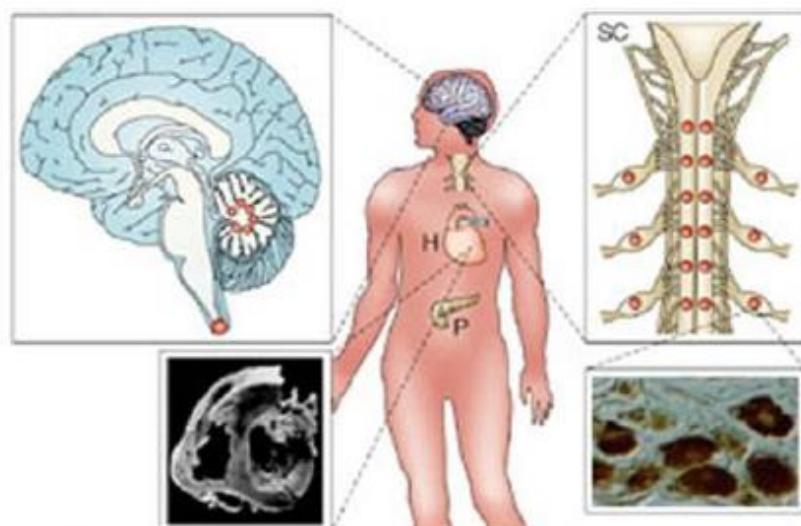
- Ataxias debidas a mutaciones en genes que se encargan de reparaciones en el DNA.
- Ataxias debidas a mutaciones en genes que se encargan de la mitocondria.
- Ataxias debidas a mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos

Nos centraremos en la **ataxia de Friederich** que es la más frecuente en la población de origen europeo, estando más implicada la mitocondria.

Ataxia de Friedrich

La ataxia de Friedrich es una **enfermedad de inicio temprano**, entre los 5 y los 15 años. Los principales síntomas son la inestabilidad postural, la pérdida de coordinación de los movimientos, disartria (no se pueden articular bien las palabras). Hay una variedad de déficits sensoriales (pérdida de oído, visión, olfato pequeño) y una progresiva debilidad muscular.

Los pacientes suelen verse confinados a una silla de ruedas. Desde el punto de vista general, la ataxia de Friedrich es una enfermedad principalmente neurodegenerativa (médula espinal y cerebro), pero una gran mayoría de los pacientes tienen deformidades musculo esqueléticas (escoliosis, pie cavo, cardiopatía hipertrófica o diabetes).



Deformities of feet and spine (scoliosis) (80%)

Cardiomyopathy (60-70%)

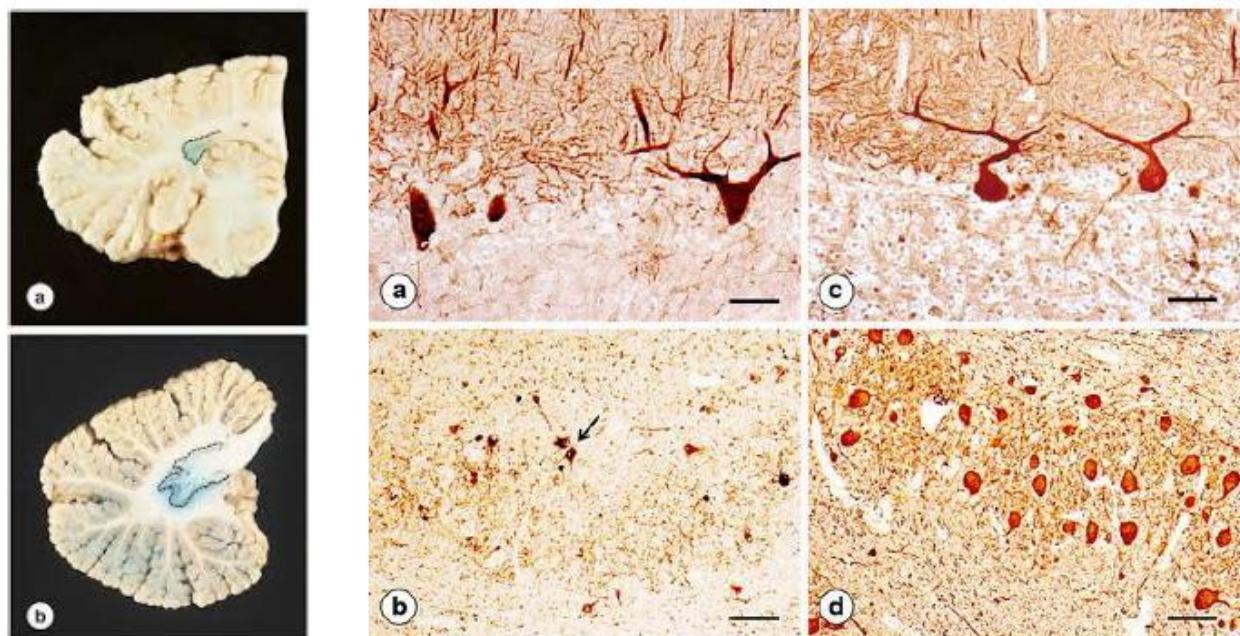
Diabetes mellitus (20-30%)

Lo más llamativo es que hay una **afectación muy temprana de la médula espinal**, consistiendo en una **atrofia de la parte dorsal de la médula espinal**. La parte ventral (motoneuronas está conservada) pero la parte dorsal (sensorial) se atrofia.



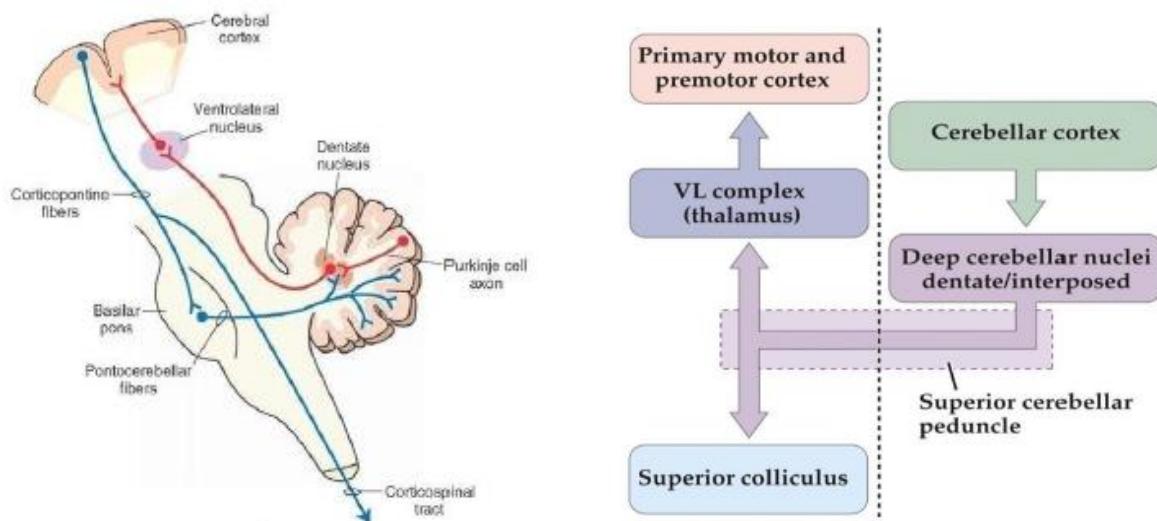
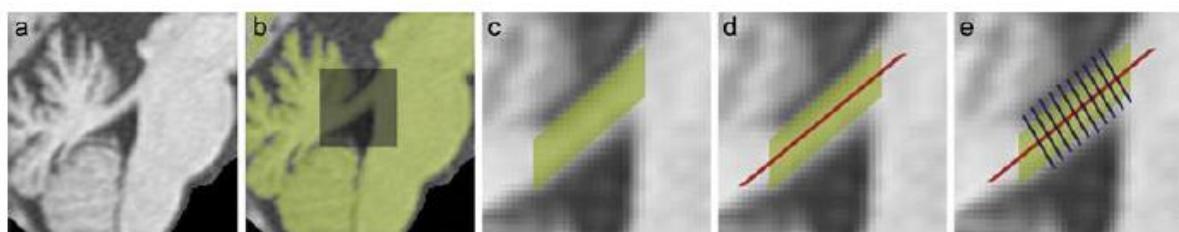
Esta atrofia se detecta de manera muy temprana en los pacientes, siendo lo más probable que no sea un proceso neurodegenerativo, sino que sea un trastorno del desarrollo (no se ha generado correctamente).

Conforme va avanzando la enfermedad, se observa una atrofia cerebelar progresiva, dentro de ellos en uno de los núcleos profundos del cerebelo, como el n úcleo dentado.

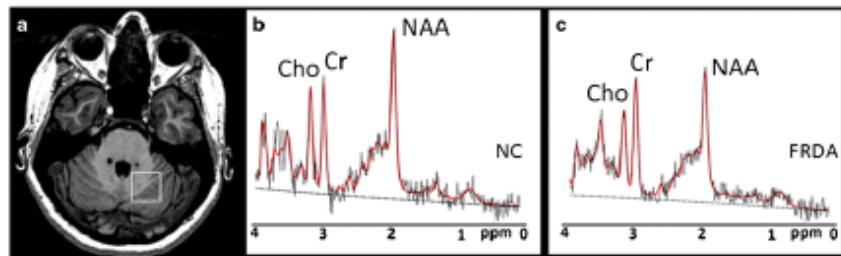


Como consecuencia de esa atrofia progresiva en el cerebelo, van desapareciendo los axones que proyectan sobre otras partes del encéfalo, disminuyendo el espesor de los pedúnculos cerebelosos. Viendo el espesor de el pedúnculo cerebeloso superior (por donde salen los axones del cerebelo), se puede diagnosticar.

Superior Cerebellar Peduncle Atrophy in Friedreich's Ataxia Correlates with Disease Symptoms



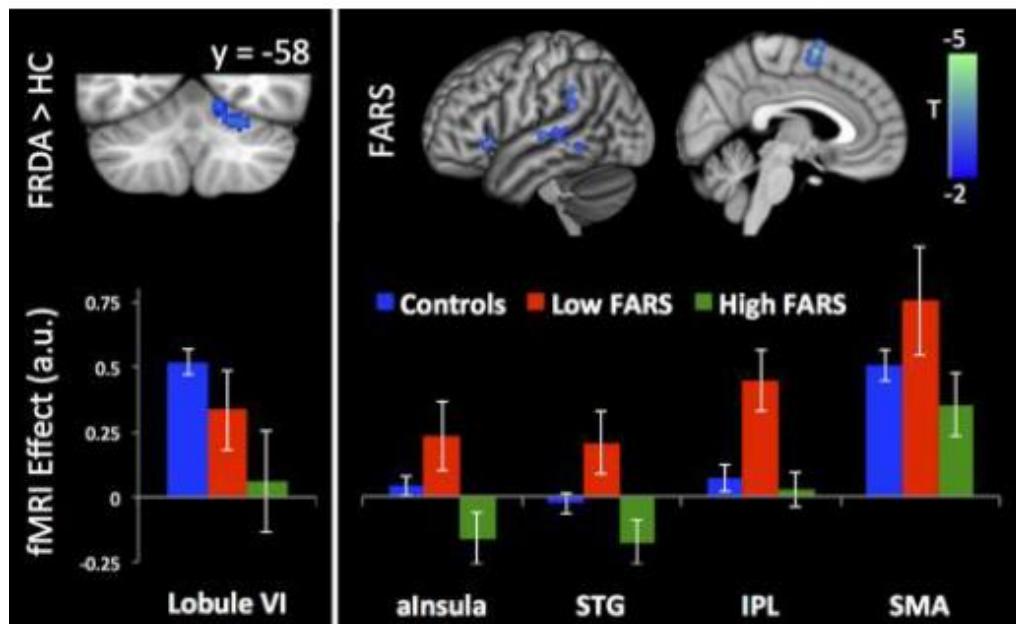
Cuando se mira en el cerebelo la espectroscopia, disminuye el **pico de N-acetilasparatato**, acompañando a la neurodegeneración.



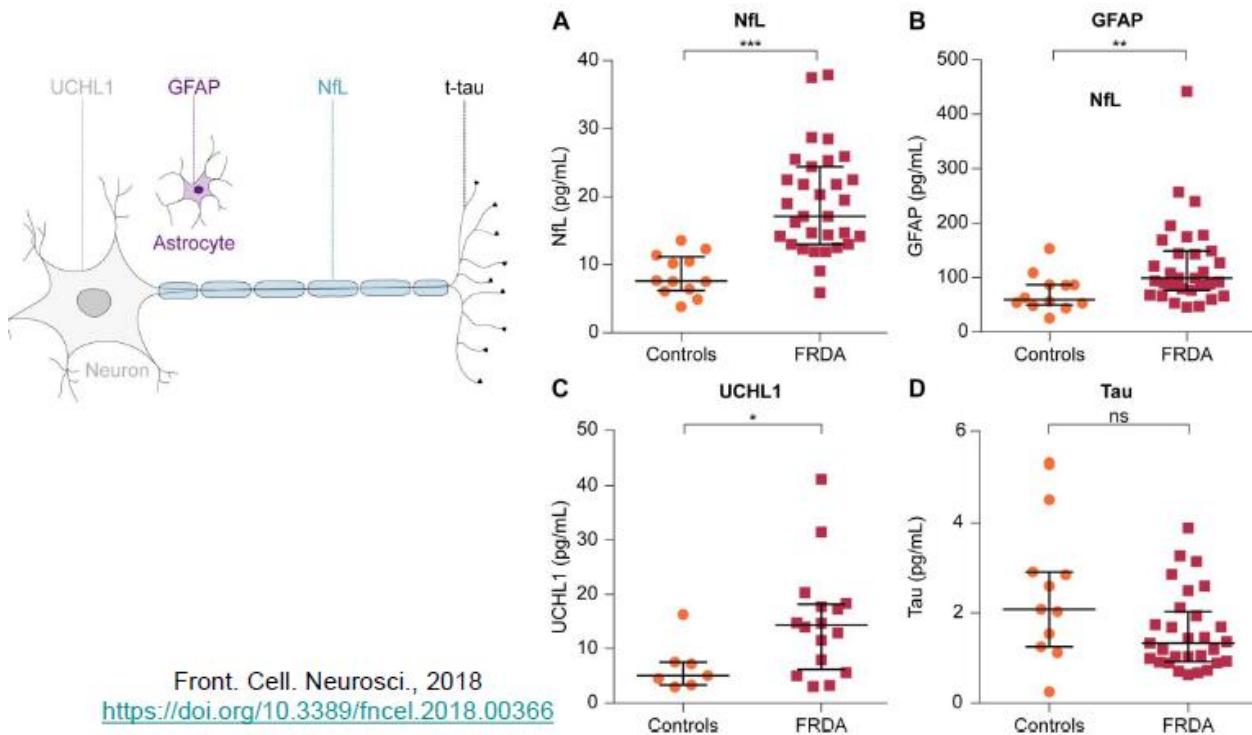
Los estudios de neuroimagen funcional de actividad cerebral han sido útiles. Se somete al paciente a una prueba típica de coordinación motora. Haciendo este estudio con sujetos sanos, pacientes con ataxia en los primeros estadios y pacientes en estado avanzado, podemos ver la actividad de distintas zonas del sistema nervioso.

- En el **cerebelo** hay una alta actividad en sujetos sanos y va disminuyendo con los estadios de la enfermedad.
- Otras áreas **del sistema nervioso** tienen una sorpresa:
 - Hay zonas en donde en los sujetos sanos no hay actividad y sí en pacientes de primeros estadios, y no en pacientes de últimos estadios.

Como consecuencia de una pérdida de función en el cerebelo hay otras regiones que se hiperactivas e intentan compensar. Sin embargo, cuando la enfermedad avanza, se pierde esta compensación.



Ciertos **marcadores en plasma sanguíneo, como la NfL**, es superior en los pacientes frente a los controles. La NfL se encuentra enriquecida en axones mielinizados. No es un marcador específico, debido a que vamos a observarlo en cualquier enfermedad neurodegenerativa. Nos puede indicar si la enfermedad va avanzando y si un determinado fármaco consigue detenerla.

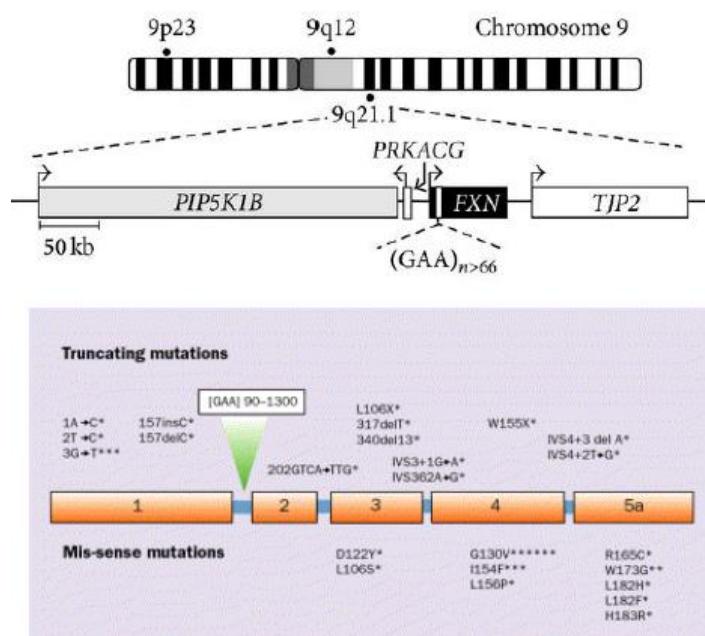


Otro marcador es el marcador **GFAP**, que se encuentra aumentado. Así, además de degeneración de neuronas habría un proceso a nivel de astrocitos.

Desde el punto de vista genético, la enfermedad está ligada a mutaciones en el gen de la frataxina, en el cromosoma 9. En el 98% de los pacientes, la mutación responsable de la enfermedad es una expansión de un triplete GAA que está localizada en el primer intrón del gen. El 98% de los pacientes son homocigotos para esta mutación.

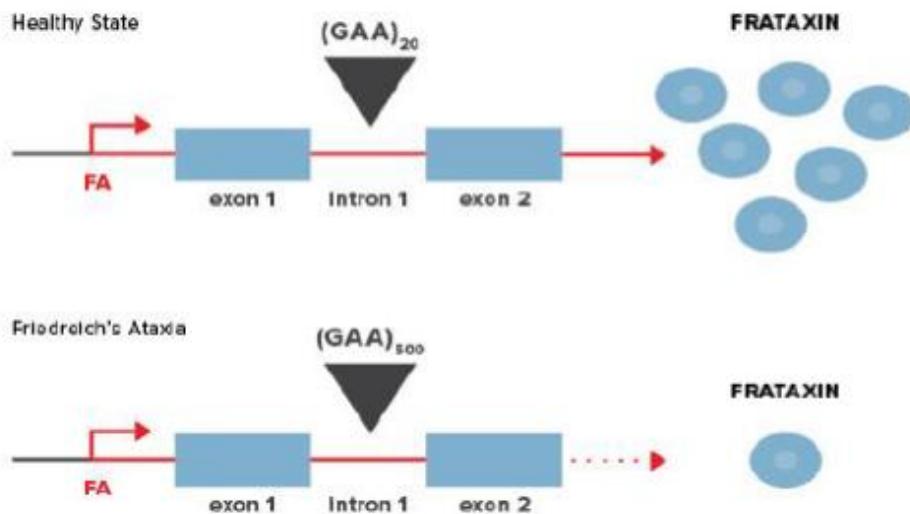
Hay un grupo pequeño de pacientes, un 2/4% que presentan un patrón de heterocigotos compuestos. Es decir, un alelo tiene una expansión típica de poliglutamina y el otro tiene una mutación puntual (diversas).

- Algunas mutaciones son non-sense y otras son miss-sense.



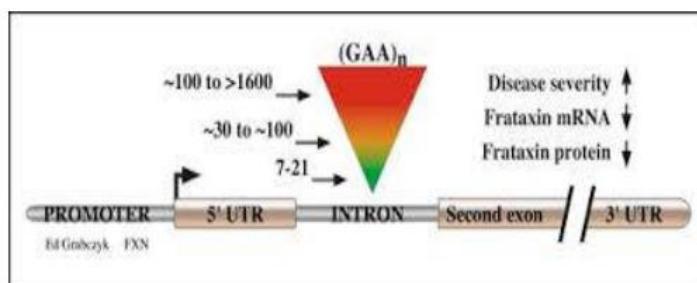
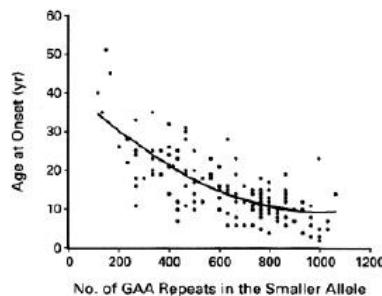
No se ha encontrado nunca un paciente con **dos mutaciones puntuales**.

La expansión intrónica produce un silenciamiento de la expresión del gen. Tendremos menos frataxina (funcional, pero menos). Las mutaciones puntuales conducen a una pérdida de función de la frataxina.



Si tuviéramos dos mutaciones puntuales, **no tenemos frataxina funcional**, pues se produciría una **letalidad embrionaria**. Cuando **inactivamos el gen de la frataxina en ratón**, la inactivación es completamente letal desde las primeras etapas del desarrollo embrionario.

La frataxina así es **esencial para la viabilidad del organismo**. La enfermedad está causada por una **falta de dosis de la frataxina**. Cuanto más larga es la expansión, menos frataxina vamos a tener. Cuanto menos frataxina tenemos, la enfermedad aparece antes y es de más rápida evolución. Existe una correlación inversa entre la edad de aparición y severidad de la enfermedad.

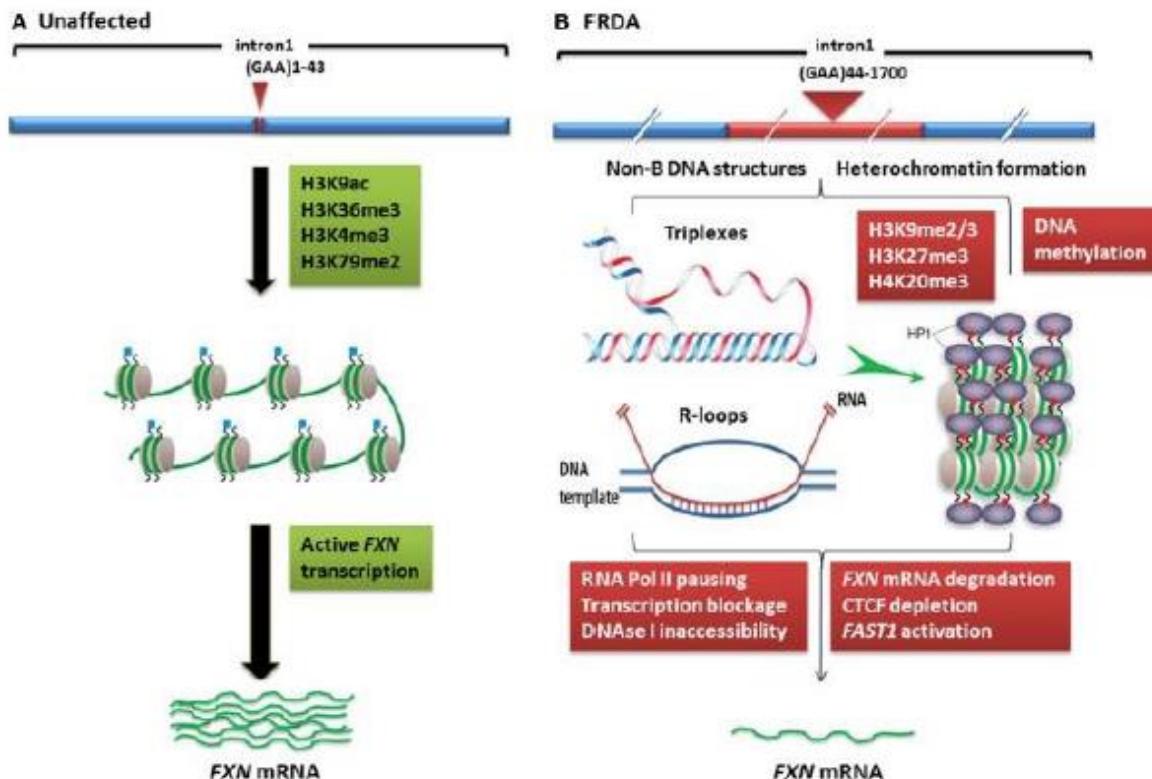


Hay algunos pacientes que pueden variar unos 20 años en la edad de aparición. Incluso en una enfermedad mendeliana simple **existen otros factores genéticos que pueden modular la enfermedad**.

Este silenciamiento de la expresión se produce porque cuando se produce la expansión hay una heterocromatinización del gen, habiendo menos mRNA de la proteína. Esta está asociada en cambios epigenéticos en histonas y en DNA. Las histonas están desacetiladas y metiladas, metilando también el DNA.

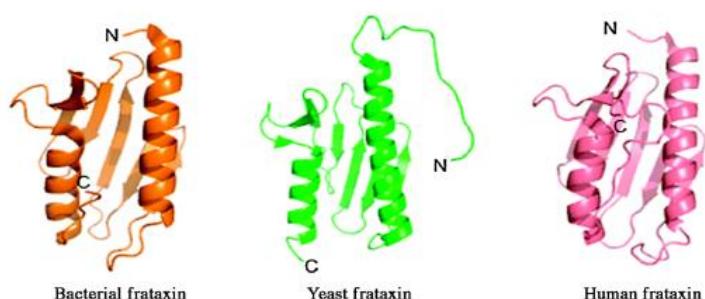
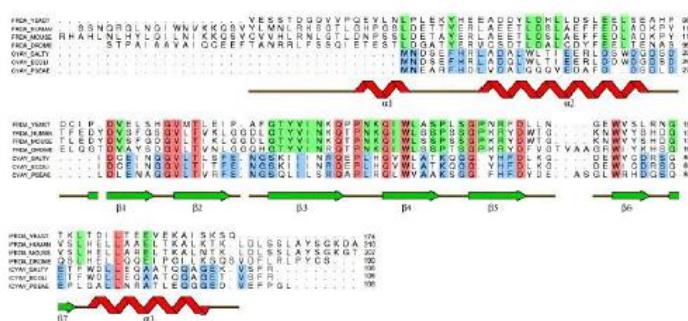
La expansión conduce a la heterocromatinización por dos teorías:

- Formación de triplex de DNA
- Formación de un lazo R del tránscrito con el DNA que dispara la heterocromatinización

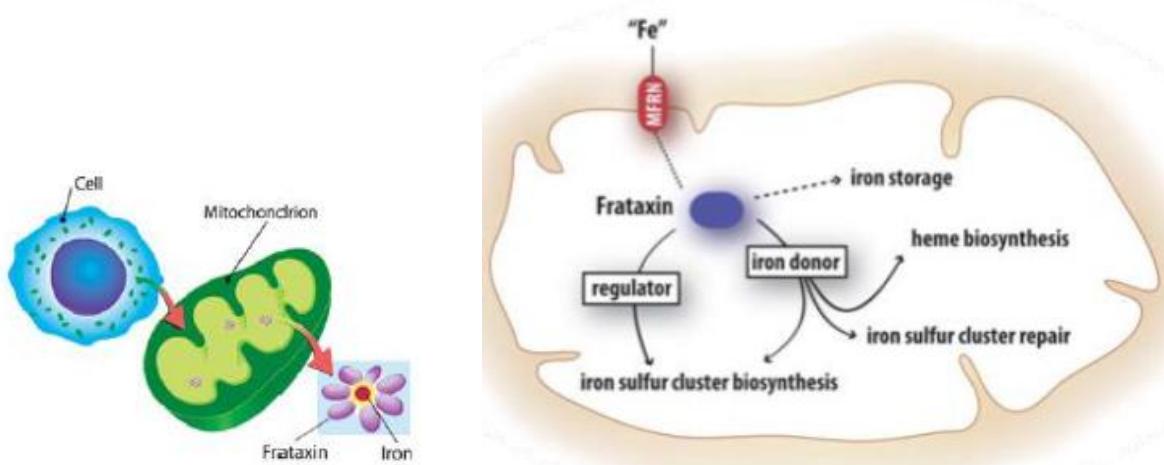


Otros factores pueden influir, como mRNAs con splicing alterados que se degradan más rápidamente.

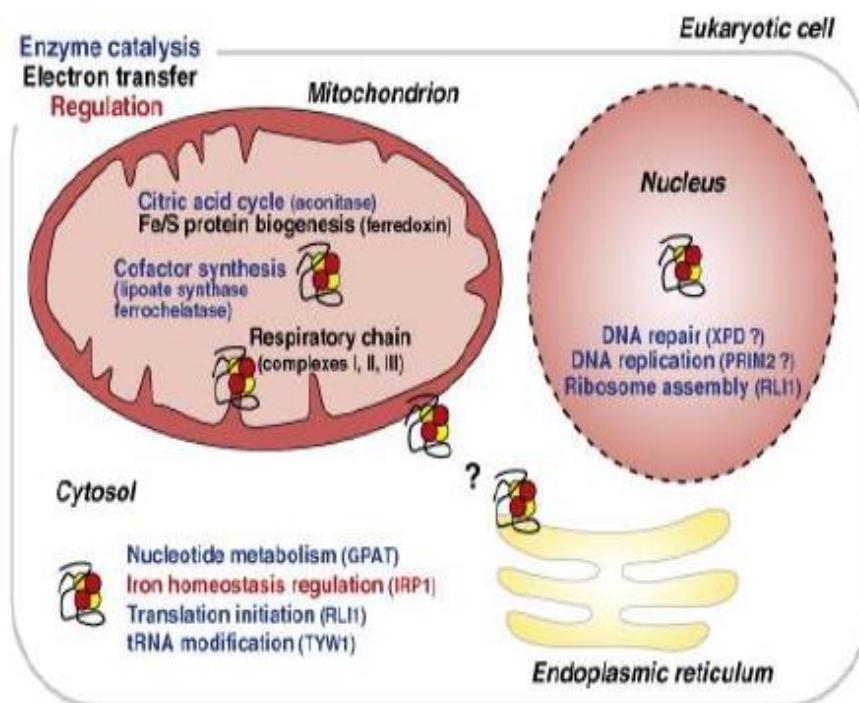
La frataxina es una proteína altamente conservada en la evolución. Tenemos una conservación también a nivel estructural. Esto es típico de proteínas housekeeping, implicadas en proteínas esenciales para la célula.



Mayoritariamente, la frataxina es una proteína localizada en la mitocondria y que dentro de ella tiene la capacidad de unir hierro. Parece que participaría en la formación del grupo hemo, y sobre todo en la formación de los centros de Fe-S. En esa formación puede actuar como dador de hierro y regulador.



La reparación de los centro Fe-S también está implicada la frataxina, cuando estos se oxidan. En los pacientes no encontramos ninguna deficiencia en la formación del grupo hemo, pero sí que se observa un déficit en la formación de centros hierro-azufre.

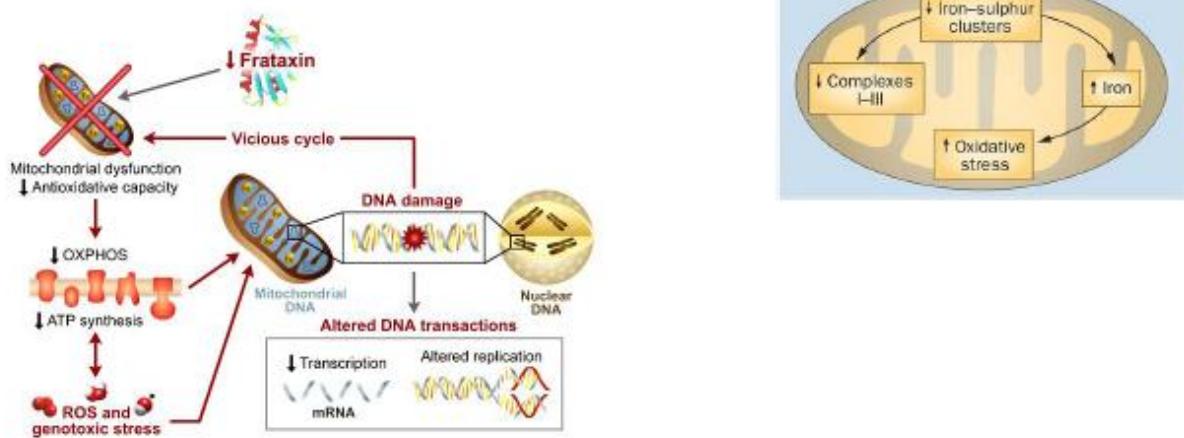


Por ello, parece ser que la biogénesis de centros hierro-azufre está impaired pero que hay suficiente proteína para grupo hemo.

Los centros Fe-S están presentes en los complejos I, II y III y en otras proteínas mitocondriales como la aconitasa. En proteínas citosólicas algunas de síntesis de nucleótidos. Muchos de los enzimas nucleares implicados en la reparación de DNA tienen centros Fe-S.

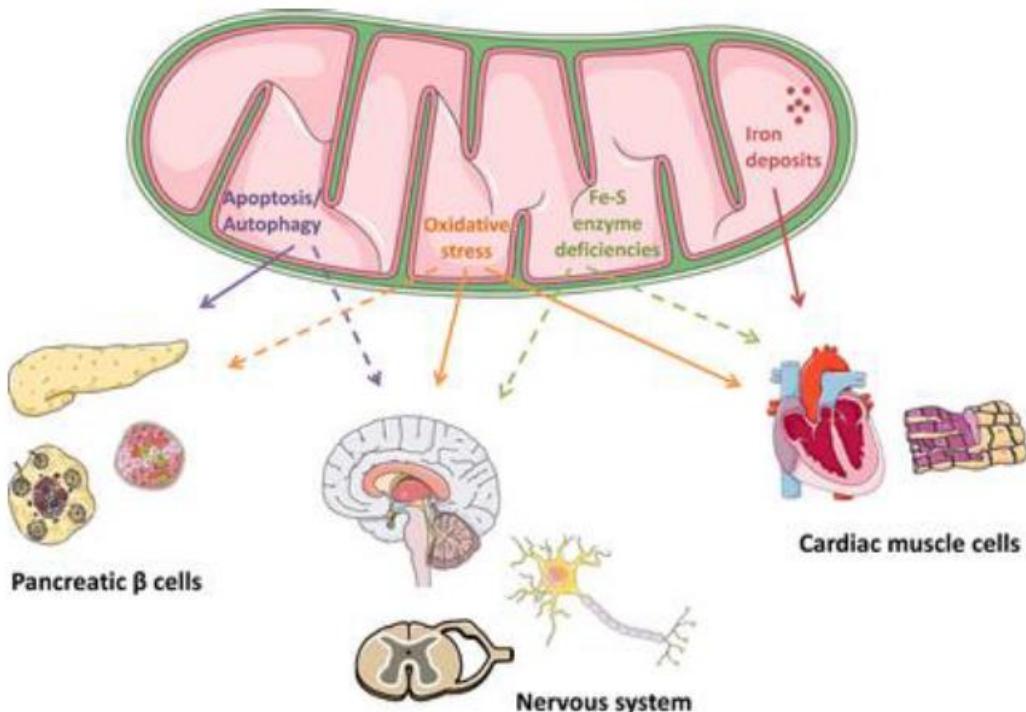
Lo que sabemos de la patogénesis de la enfermedad, es que se da un silenciamiento del gen de la frataxina y con ello **menos complejos de centros hierro-azufre**, con lo tal la mitocondria va a tener un **funcionamiento impaired**, el hierro se queda en la mitocondria y esto **aumenta el estrés oxidativo catalizado por hierro**.

En esta enfermedad, se supone que habría un **círculo vicioso donde la generación de estrés oxidativo produce daño oxidativo en el DNA mitocondrial y nuclear**, traduciéndose en una mayor disfunción mitocondrial.



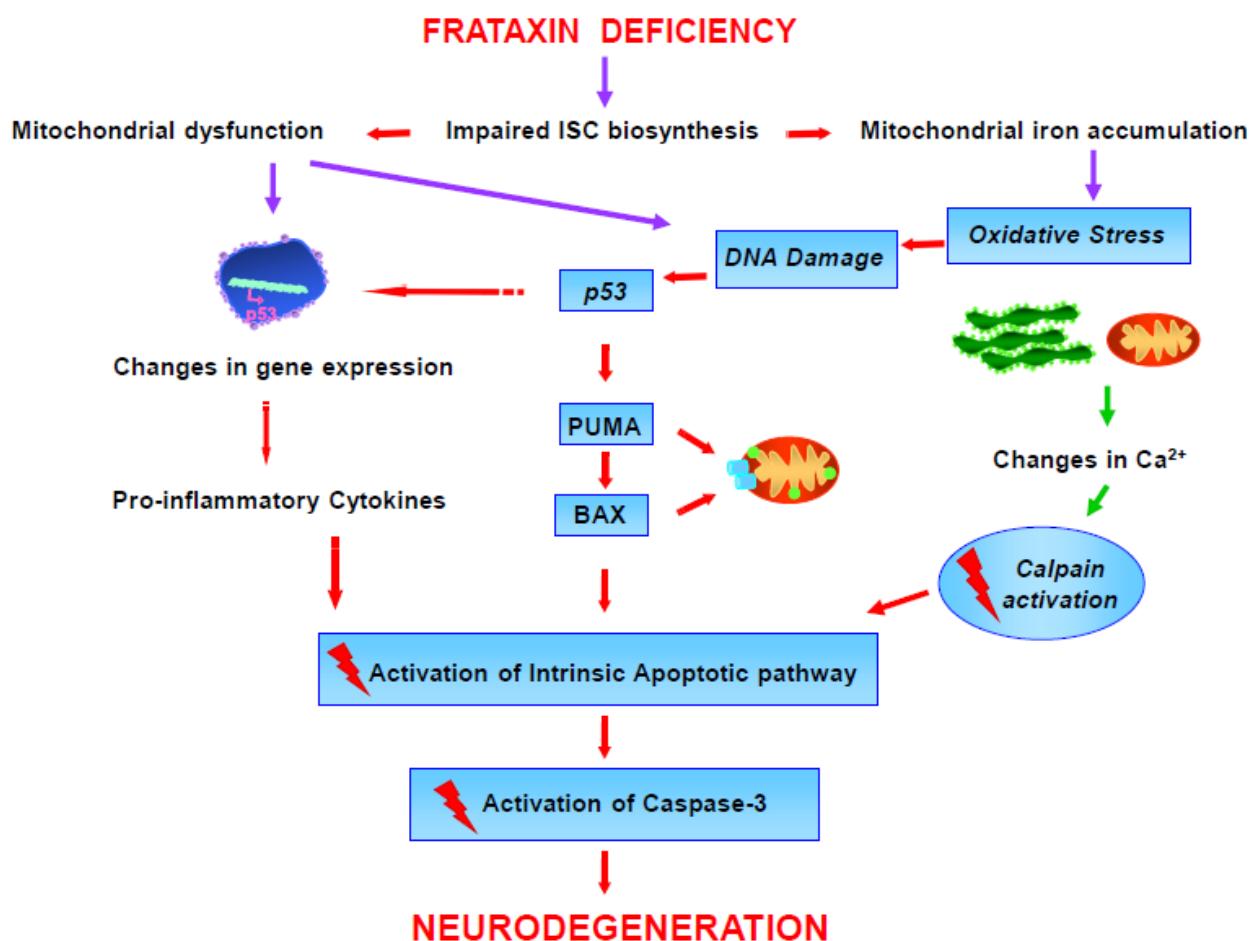
Uno de los retos en entender la patogénesis de la enfermedad es cómo estos problemas **en los distintos tejidos causa los distintos fenotipos**:

- En el corazón da lugar a **hipertrofia cardíaca**
- En el sistema nervioso da lugar a **neurodegeneración**
- En el páncreas da lugar a **diabetes**



En ciertos modelos celulares donde se ve la deficiencia de frataxina se ve:

- Disfunción mitocondrial
- Daño oxidativo
- Daño en el DNA → p53
- Cambios en la homeostasis del calcio por cambios en el retículo endoplásmico. Activación de calpaínas, que llevan a apoptosis y neurodegeneración.
- Estos cambios producen cambios en la expresión génica, habiendo astrocitos neurotóxicos y liberación de citoquinas proinflamatorias.



En cuanto a modelos animales:

- KO letal embrionaria
- KO condicional
- Desarrollar un modelo exactamente igual que el humano. Ratones en los que se inactivan las dos copias del gen de frataxina de ratón (mFXN-/-) donde se introduce un gen de frataxina humana con la expansión GAA.

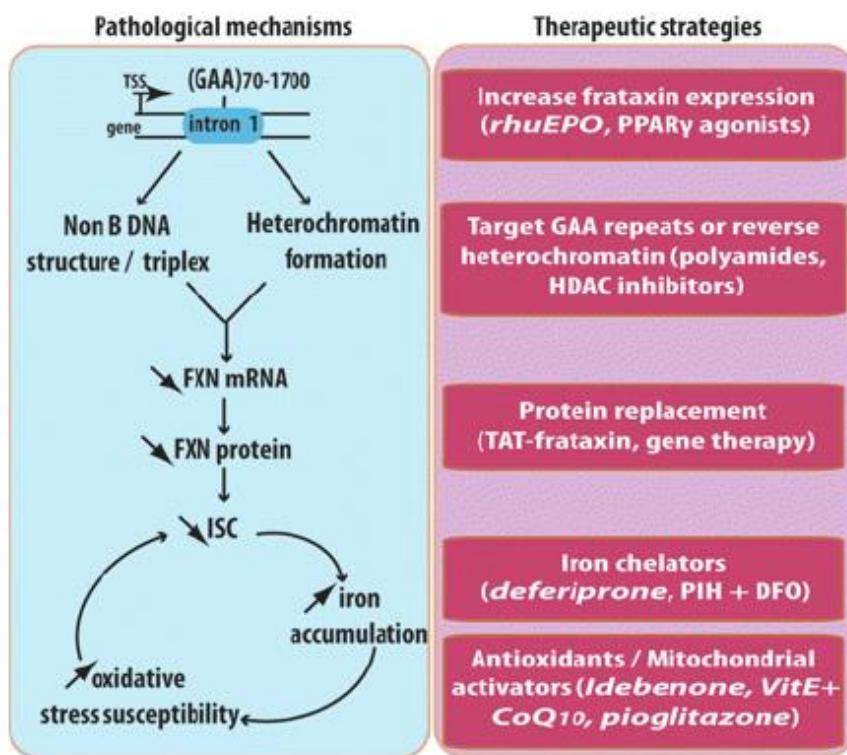
El resultado es que el ratón se rescata y además vive bien. Cuando envejece, tiene una ataxia leve frente a ciertas pruebas. Estrategia terapeuta para ver resistencia?

Cuando se han introducido expansiones de poliG DOMINANTES en ratones, sí mimetizan la enfermedad.

Muchas de las estrategias terapéuticas han ido a fármacos que desheterocromatinizan el gen. Se han probado muchos fármacos con bastante éxito, como **inhibidores de histonas desacetilasas**, **inhibidores de metilasas de histonas**, **activadores de las histonas desmetilasas** y **activadores de las histonas acetil-transferasas**.

Todos estos **inhibidores son capaces de desheterocromatinizar el gen y aumentar la expresión de la frataxina**. Sin embargo, también habría una discusión en cuanto a la **especificidad de estos fármacos**. Pequeñas dosis de los fármacos podrían tener un efecto, pero podrían tener un efecto muy arriesgado como uso crónico.

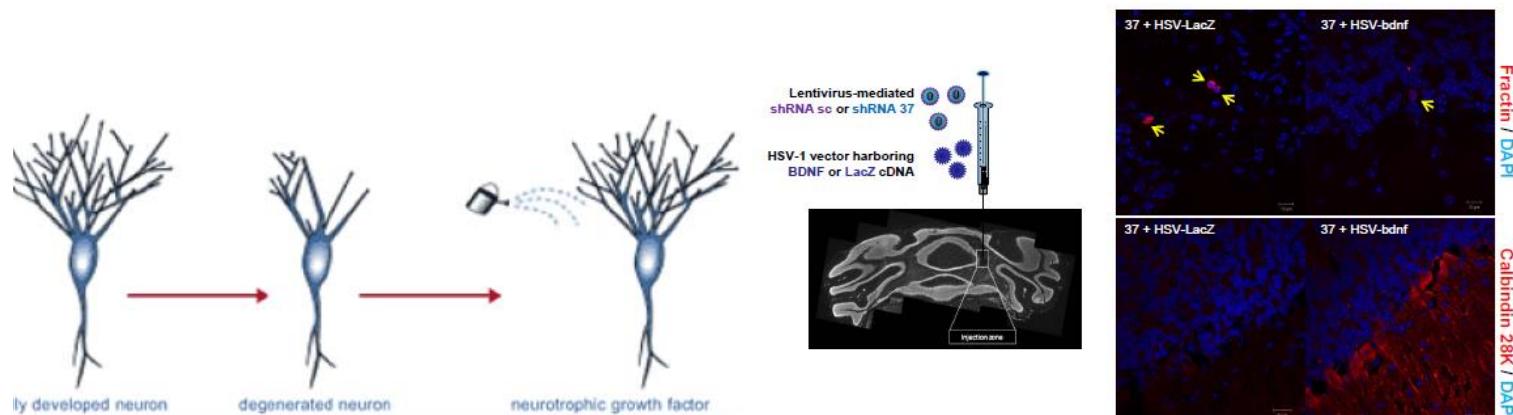
Estos fármacos se han usado para tumores, pero compensan los efectos secundarios.



Diseñar RNAs dirigidos a la expansión para interferir para bloquear la heterocromatinización, pero los resultados son prometedores aunque están en el inicio.

Aproximaciones de terapia génica para proporcionar el gen de la frataxina. Estas aproximaciones son prometedoras, pero se precisa llevar la frataxina a muchos targets, necesitando vectores más eficientes de lo que hay en la actualidad.

Otro tipo de aproximación que se ha seguido como en otras enfermedades neurodegenerativas ha sido el resultado con BDNF.



Bases Moleculares de la Patología II

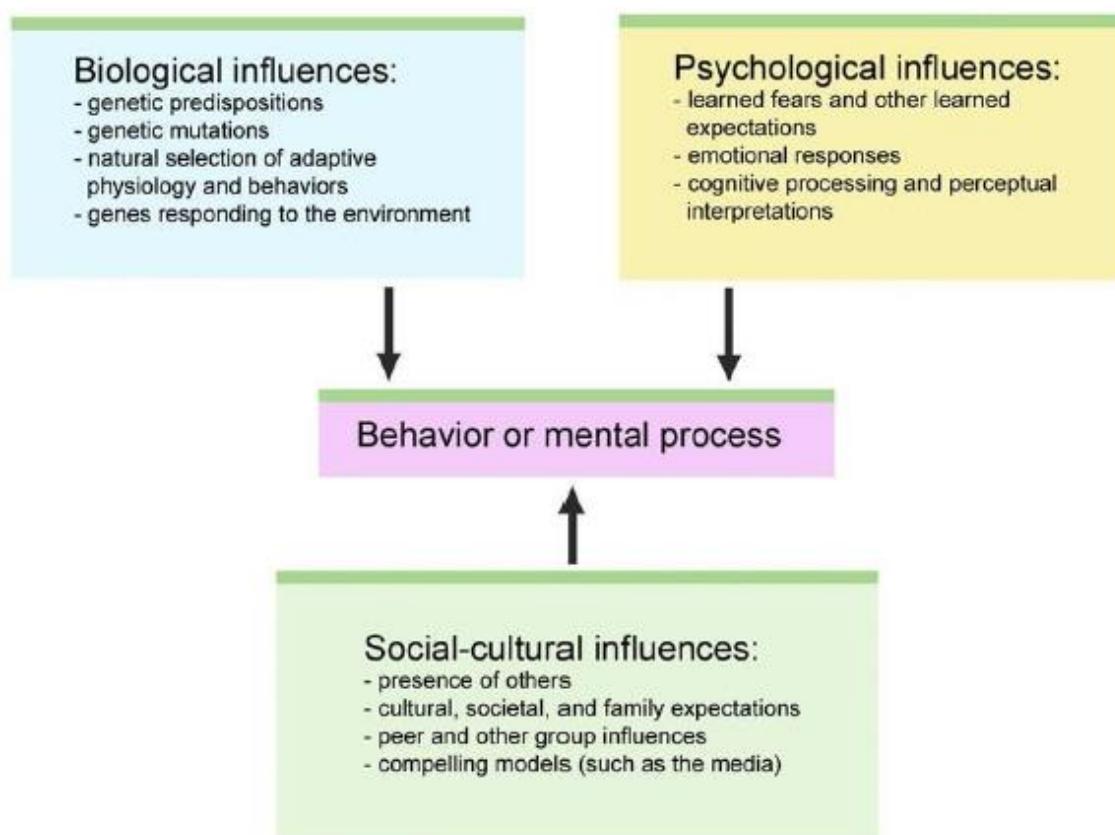
Enfermedad neuropsiquiátricas – 06-03-2019

La **diferenciación entre enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas se basan en un primer momento en cambios patológicos detectables**. Las enfermedades psiquiátricas en un primer momento no eran detectables.

La situación ha cambiado, pues en muchas enfermedades psiquiátricas hay alteraciones **estructurales y funcionales que pueden estudiarse por estudios de neuroimagen**. En trastornos afectivos, **pueden llegar a haber pérdidas progresivas de sinapsis**.

Hoy en día se habla de trastornos neuropsiquiátricos con síntomas sobre el estado cognitivo-emocional de las personas.

Las enfermedades neuropsiquiátricas son **mucho más complejas**, pues hay que tener en cuenta la **interacción de factores biológicos, psicológicos y sociales**. Tenemos que entender que muchos cambios en nuestro estilo de vida y ambiente van a incidir en el desarrollo del sistema nervioso y en la expresión génica. La **influencia ambiental se traduce en cambio epigenéticos**.

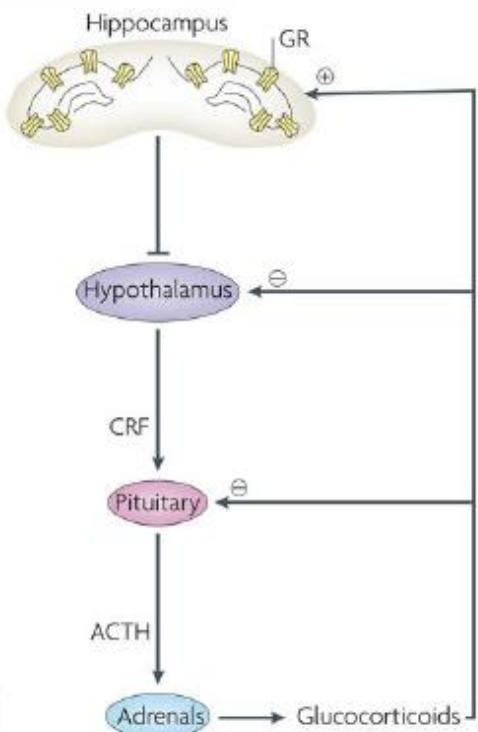
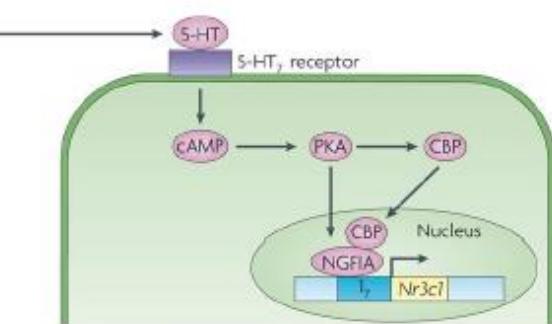


Para entender cambios en las enfermedad neuropsiquiátricas hay que tener en cuenta las:

- **Influencias biológicas**
- **Influencias psicológicas**
- **Influencias sociales**

Uno de los ejemplos típicos está estudiado con el **cuidado maternal**. Animales que tienen un cuidado maternal adecuado, se ha visto que hay **madres muy cuidadoras que cuidan a las crías**. Dicho **cuidado maternal intenso se traduce en que las crías tienen unos niveles más altos de serotonina en el hipocampo**.

a Tactile stimulation
(maternal licking and grooming)



Estos niveles, a través de algunas cascadas, **activan la transcripción de distintos genes, entre ellos el que codifica por el receptor de glucocorticoides**. En las crías que tienen este cuidado maternal intenso tienen un **buen nivel de receptor de glucocorticoides**. El **hipocampo controla el hipotálamo, hipófisis y médula adrenal**. Cuando más ACTH hay, tenemos una mayor respuesta al estrés, y estos **glucocorticoides producen un feedback para inhibir el eje**.

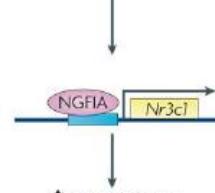
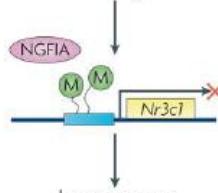
Las crías que han tenido este cuidado maternal más intenso tienen niveles más altos de GR y en respuesta a un estrés van a tener **menos ansiedad, y van a cuidar mejor a sus crías**.

Sin embargo, las crías que no han tenido estos cuidados tienen una **falta de expresión del receptor de glucocorticoides por medio de niveles bajos de serotonina en el hipocampo, respondiendo peor al estrés, teniendo mucho más nivel de ACTH elevado y no cuidan a sus crías**.

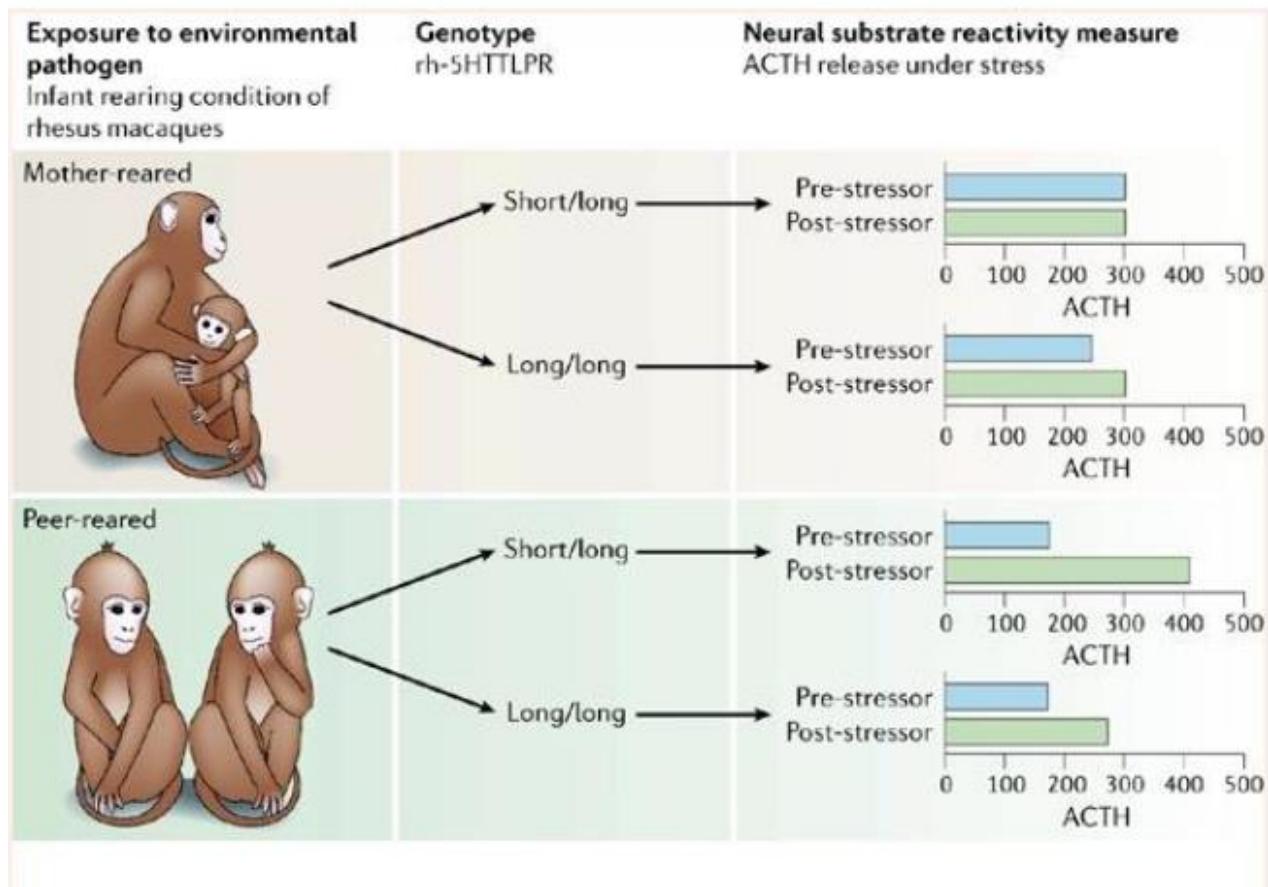
b Low maternal licking and grooming



High licking maternal and grooming



Este tipo de cuestiones no se han visto sólo en roedores, sino también en primates. **Determinadas influencias genéticas sólo tienen influencia en un contexto ambiental determinado.**



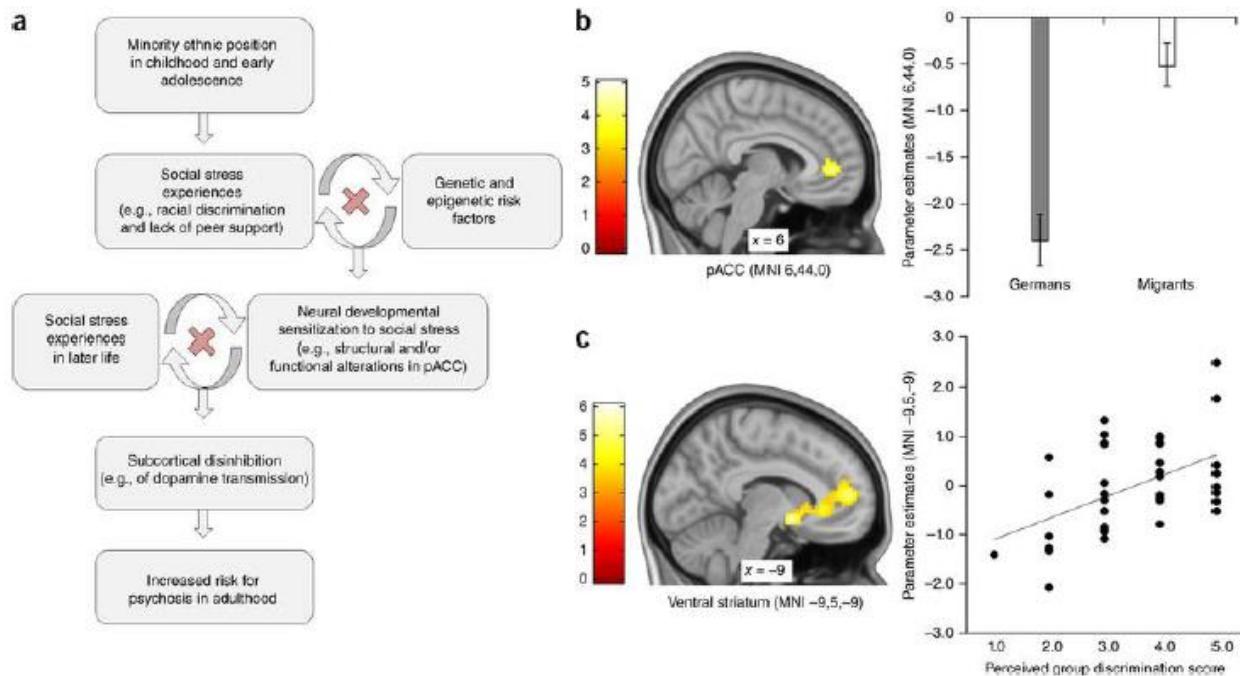
Se han descrito dos variantes que codifican para un transportador de serotonina, que recata serotonina de la hendidura sináptica:

En un macaco normal, cuando se mide su respuesta al estrés con estos dos posibles fenotipos, no hay diferencias significativas en los valores de ACTH. Sin embargo, si los macacos han sido cuidados aislados, los que tienen un genotipo responden al estrés de una manera mucho más exagerada que los que tienen otro genotipo. Así, el mismo polimorfismo genético puede manifestarse o no dependiendo de las condiciones ambientales.

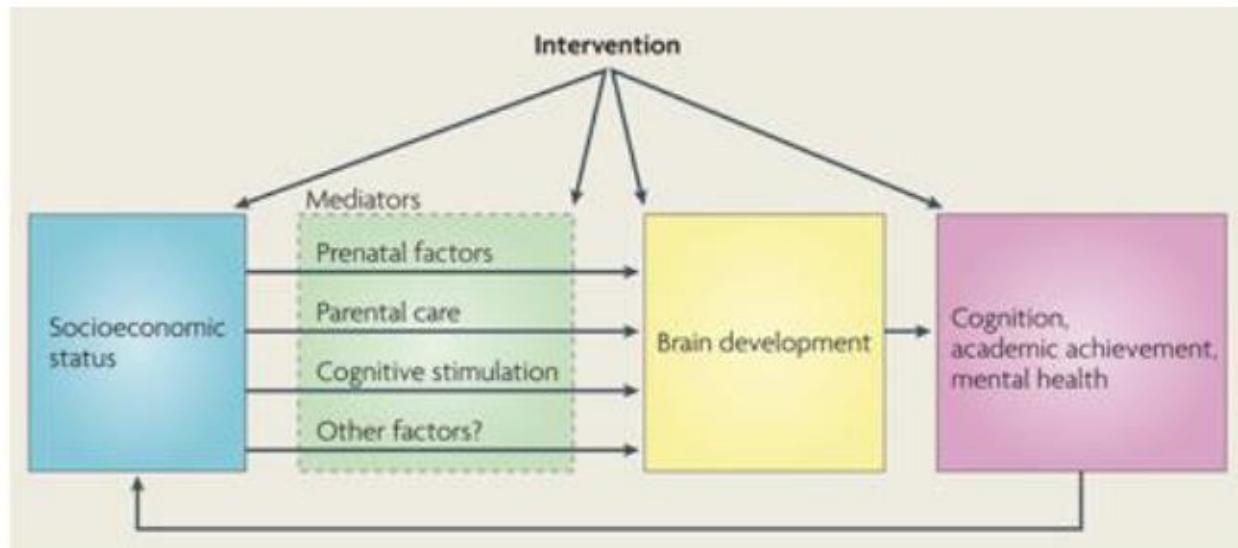
En muchas ocasiones, la **vulnerabilidad genética se va a manifestar sólo en situaciones que dependan de la crianza y dependiendo de las situaciones a las que la persona se enfrente**. Así, hay que tener en cuenta la interacción **fenotipo-ambiente y cómo esto se traslada a la estructura neural y la enfermedad psiquiátrica**.

En personas, **se hacen estudios de neuroimagen**. Si se comparan alemanes con migrantes de otras etnias que refieren una historia de discriminación racial, se ve cómo estas últimas tienen un riesgo mayor para trastornos psiquiátricos en la edad adulta.

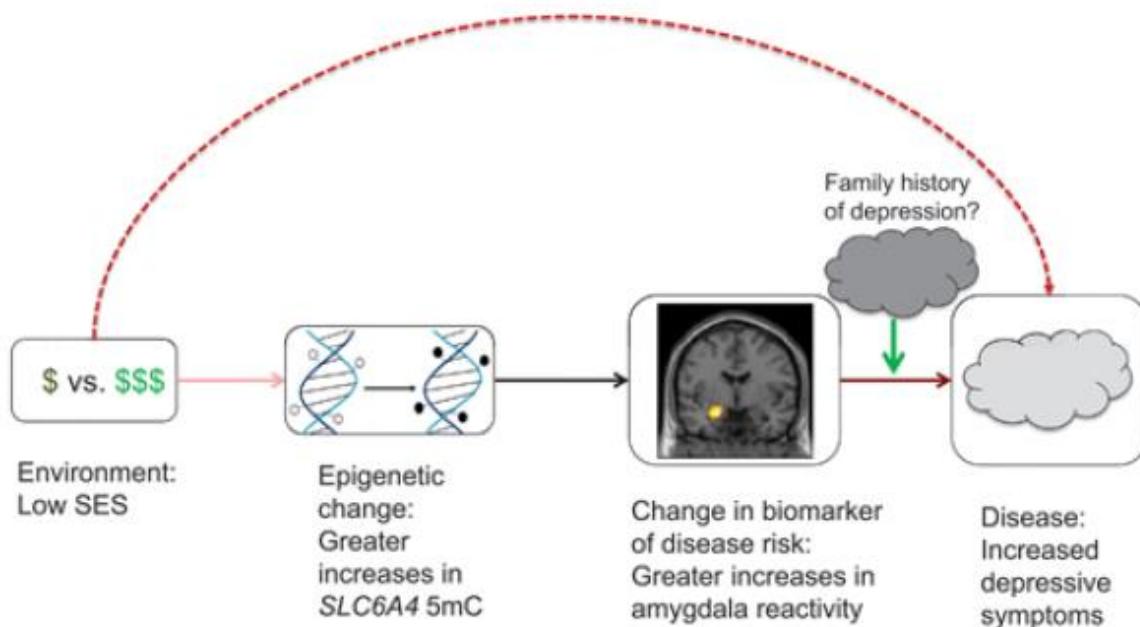
Se ha visto que las personas que **experimentan dicha discriminación racial**, probablemente se traduzca a una serie de cambios epigenéticos que llevan a una **hiperactivación** de una zona del sistema nervioso (**corteza cingulada anterior en este estudio**). No todas estas personas van a desarrollar luego una psicosis, sino que **esta discriminación racial ha producido cambios en su cerebro que ha producido una vulnerabilidad**.



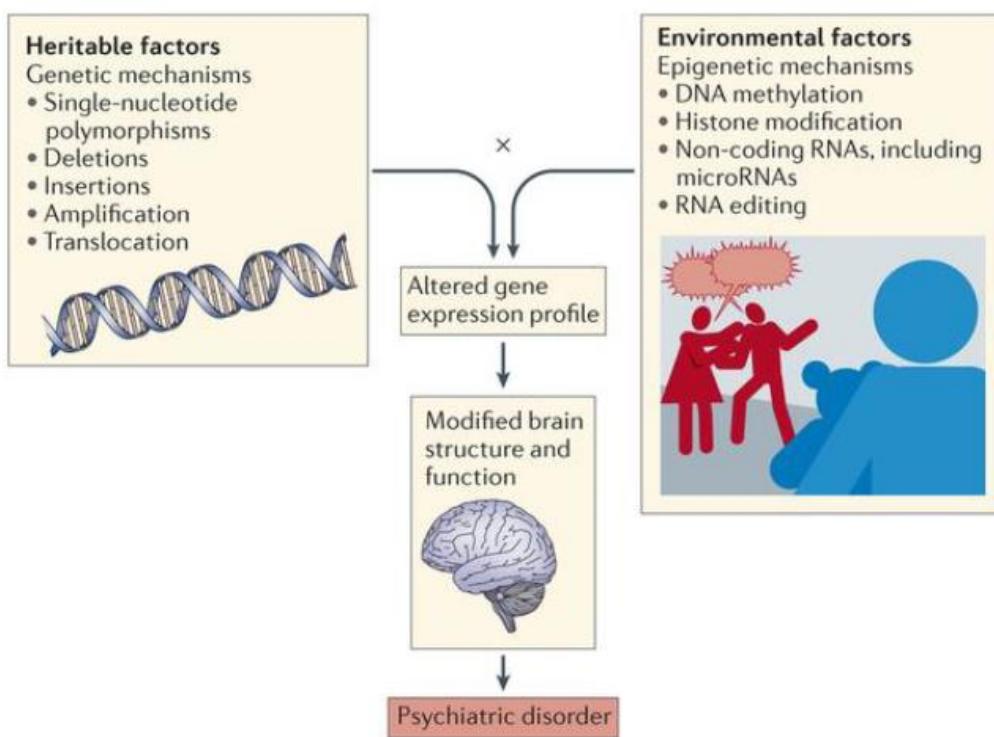
Ha habido **estudios que lo han correlacionado con el bajo estatus socioeconómico**. La epidemiología es clara: las **personas con un bajo estatus socioeconómico, tienen más problemas de salud mental. Se han encontrado algunos cambios epigenéticos asociados a ello.**



Se ha visto que en los adolescentes que proceden de barrios más empobrecidos, **hay una mayor metilación en el gen que codifica un transportador de serotonina**, de manera que este cambio epigenético se correlaciona con cambios en neuroimagen, como una **hiperactivación de la amígdala**. Esto, además, se correlaciona con una mayor incidencia de enfermedades depresivas.



Así, las **enfermedades neuropsiquiátricas se deberían a cambios en la expresión génica que dependen de cambios genéticos heredables y de factores ambientales que pueden modificar la expresión de los genes**.



Trastornos del estadio de ánimo o trastornos afectivos

Son un grupo de **enfermedades neuropsiquiátricas** que están **caracterizados por cambios patológicos en el estado de ánimo** de manera constante o cuando hay estados de ánimo de tipo manía.

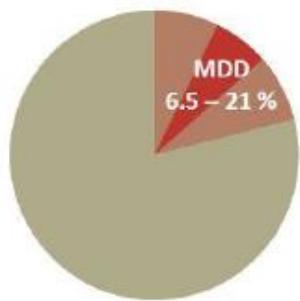
- **Manía – alto estado de ánimo**
- **Depresión – bajo estado de ánimo**

Fundamentalmente hay dos:

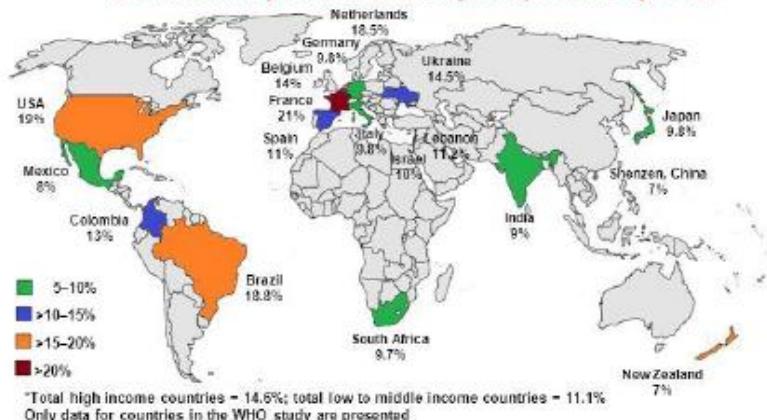
- **Depresión unipolar.** Alternan periodos de **normalidad y depresión**.
- **Trastorno afectivo bipolar.** Alternan **periodos de manía y episodios de depresión**.

Los síntomas son muy variados: **emocionales, cognitivos, deteriorio de la memoria, cambios de la conducta, síntomas físicos, dormir mucho o no dormir nada...** La incidencia de la depresión es muy alta, existiendo un estigma. Entre el 6-20% de la población podrían estar afectado por trastornos de este tipo.

The lifetime prevalence of MDD is 6.5–21%, depending on the country²⁻⁴



Mean lifetime prevalence of major depressive episode⁴

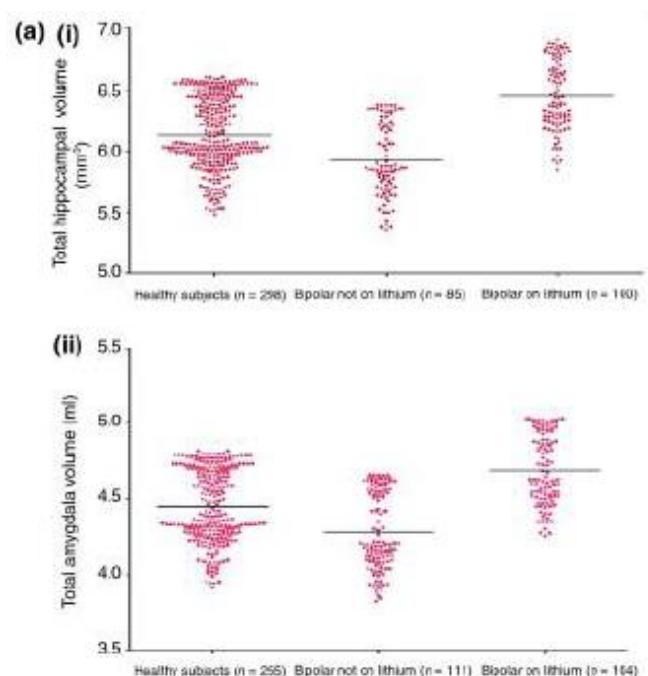


Es un trastorno discapacitante, **causando un coste económico fuerte y es el mayor factor de riesgo para los suicidios, la primera causa de muerte. El suicidio está en la mayor parte de los casos asociado al estado de ánimo.**

Este tipo de trastornos tiene una base fisiológica. Los estudios de neuroimagen han visto cambios importantes en el sistema nervioso. Los cambios son más sutiles.

- **Medición del volumen del hipocampo en distintos grupos.** La media en sujetos sanos es **significativamente más alta que los bajos en sujetos no sanos.**

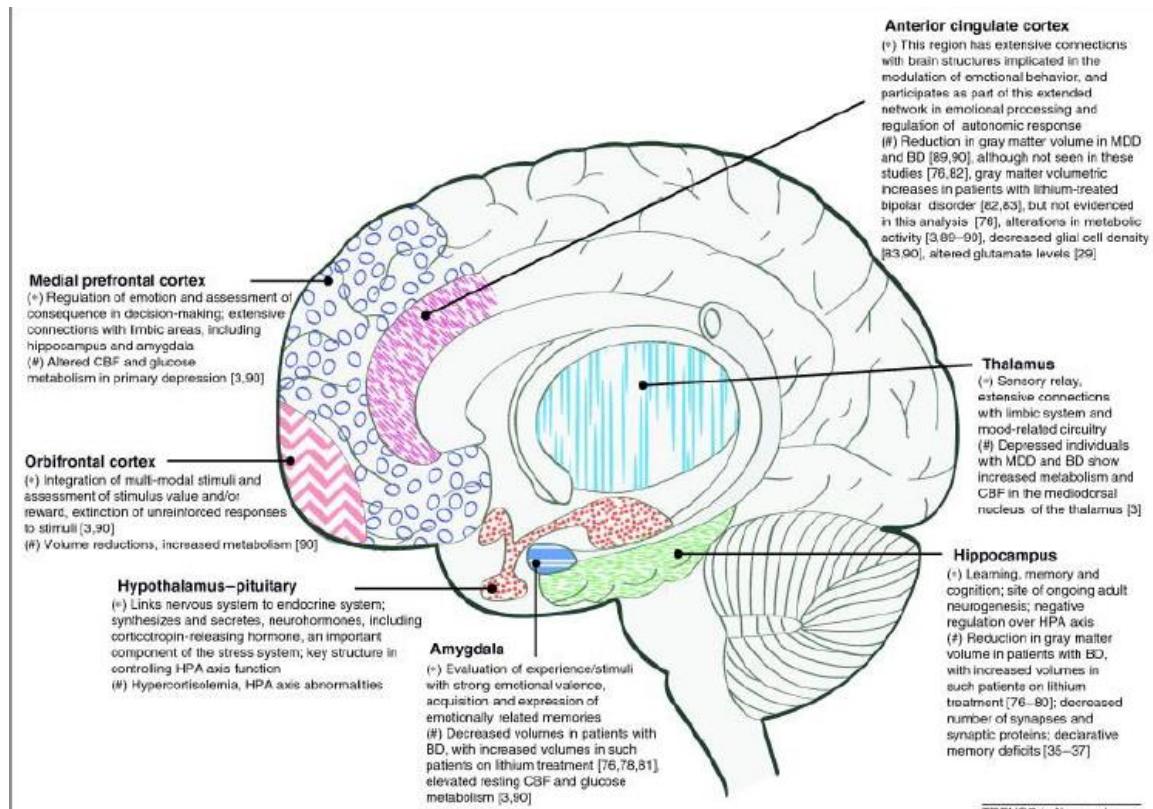
Cuando los pacientes con depresión bipolar se tratan con carbonato de litio, **que estabiliza, observamos que el volumen del hipocampo se dispara. Esto nos dice que el tratamiento con litio es muy efectivo**



¿Pareado?

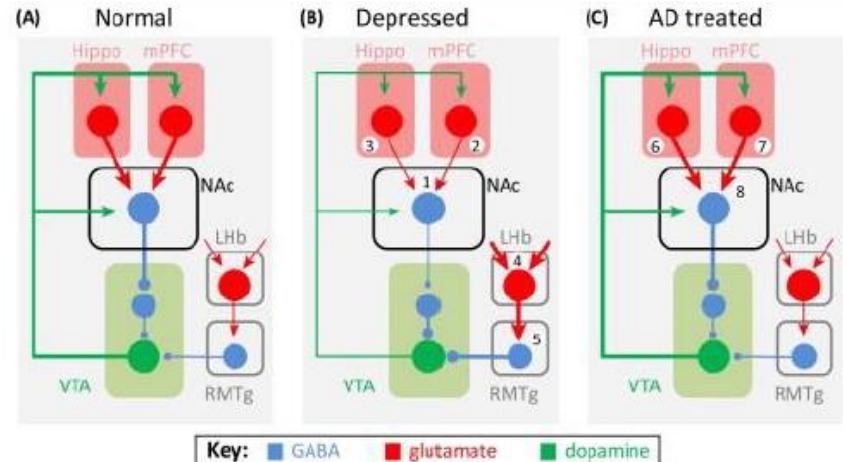
Las regiones afectadas son muchas. Sin embargo, el sistema límbico-prefrontal es importante.

- **Hipotálamo – hipófisis.** Son de las estructuras que condicionan la **respuesta al estrés, uno de los factores desencadenantes.**
- **Amígdala.** Núcleo cerebral implicado en temor, respuestas emocionales
- **Hipocampo – Región especializada en el aprendizaje, memoria, procesos cognitivos y emocionales**
- **Tálamo**
- **Distintas regiones de la corteza frontal,** que es la zona que más se expande en los primates y sobre todo en los humanos. En la corteza orbifrontal y la prefrontal medial y la cingula anterior se encuentran afectaciones.

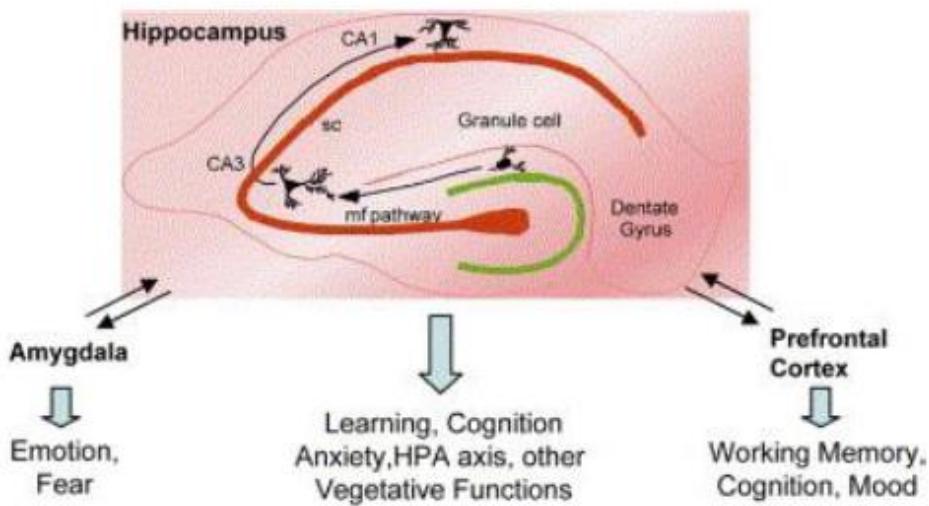


Sabemos muy poco de los circuitos que están funcionando. En un estado de ánimo normal hay una fuerte conexión sináptica entre el hipocampo y la corteza prefrontal medial y el nuclo accumbens.

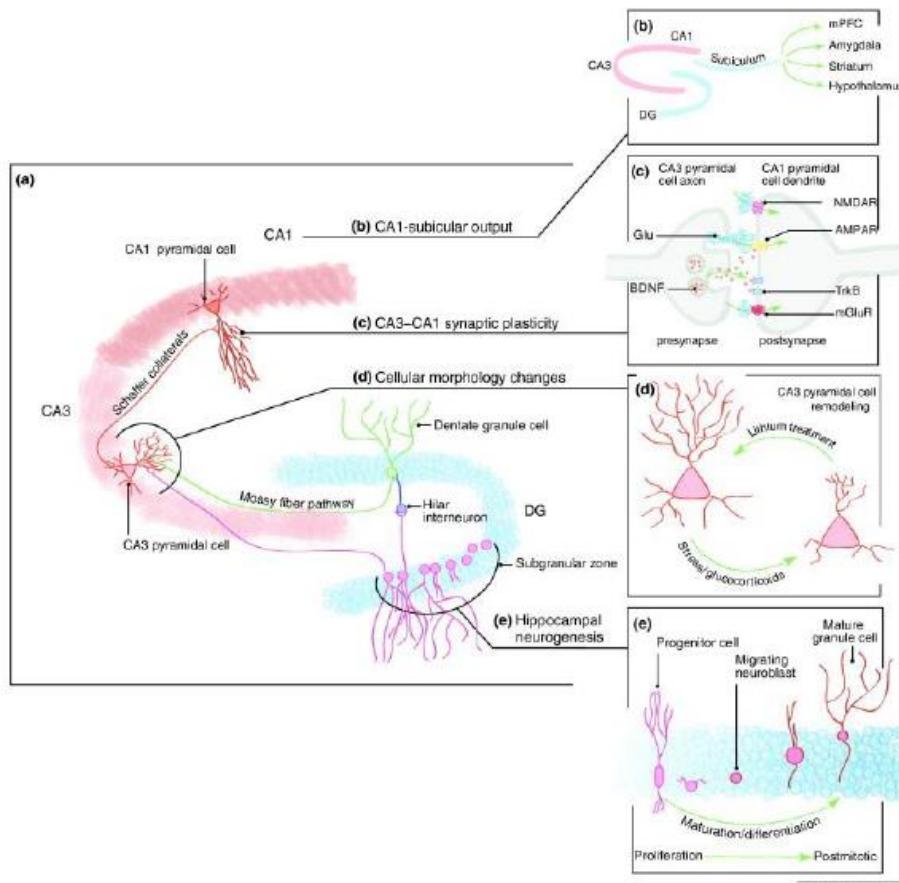
Cuando el paciente está deprimido, bajan estas conexiones. Antidepresivos permiten su reforzamiento.



Se ha prestado una especial atención al hipocampo, **pues se conoce bien y porque es una estructura fácil de estudiar**. Es una estructura afectada en estos trastornos, y es más fácil de estudiar y entender. Otra ventaja es que no hay un homólogo de corteza prefrontal medial en ratones, por lo cual es mucho más difícil estudiar un modelo animal donde no está esa estructura, obviamente.

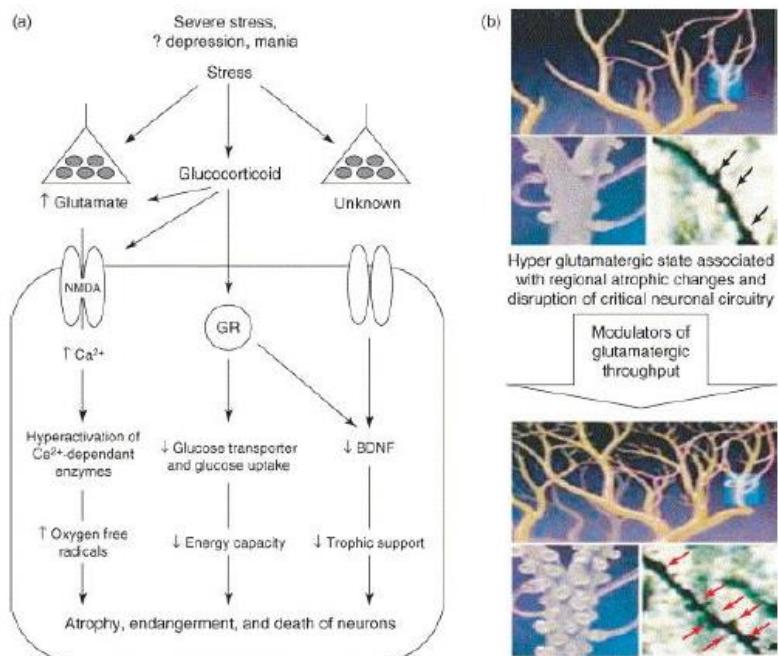
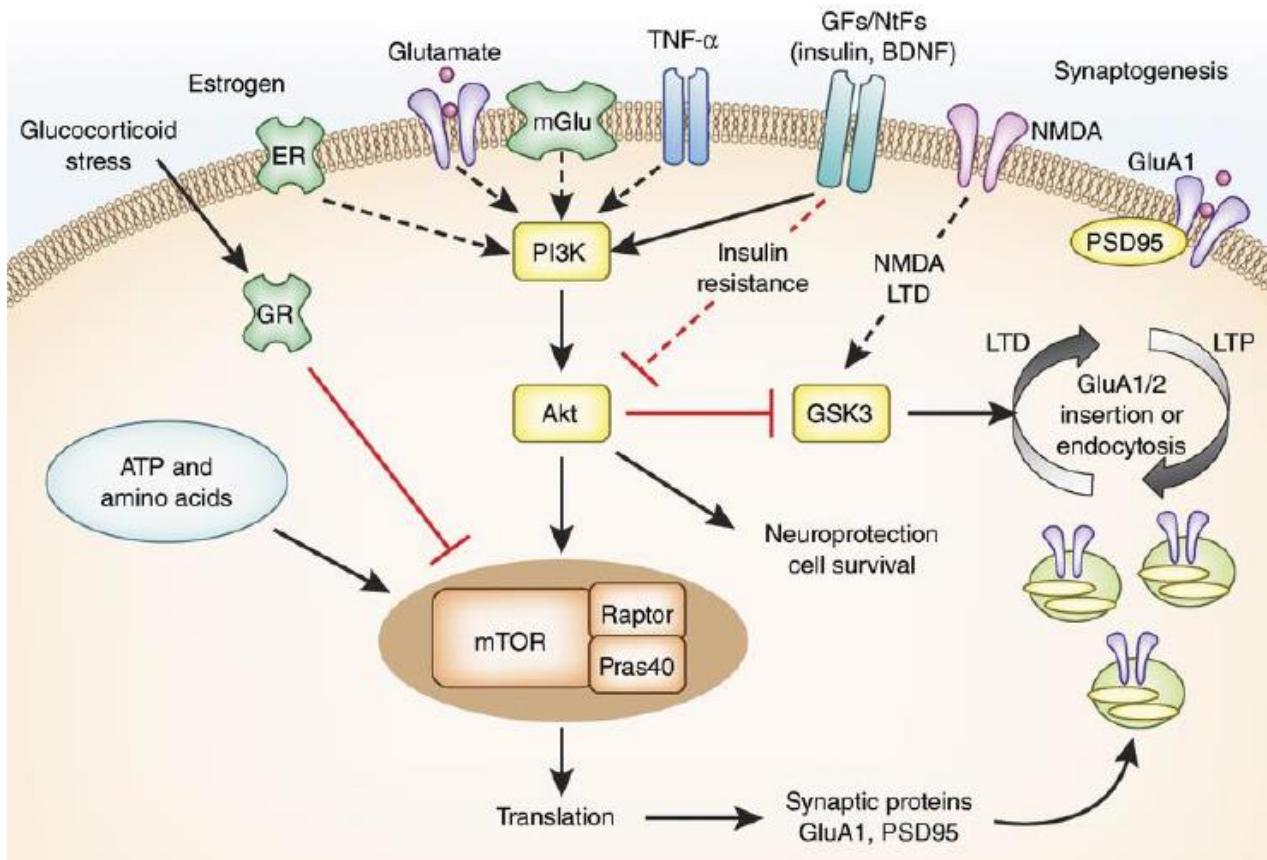


El hipocampo está conectado con la amígdala, corteza prefrontal e hipotálamo-hipófisis. Hay una atrofia de neuronas piramidales CA3 y hay menos neuronas por bajada de neurogénesis adulta en el giro dentado y por otro lado, hay una atrofia en la sinapsis sobre las neuronas CA1.



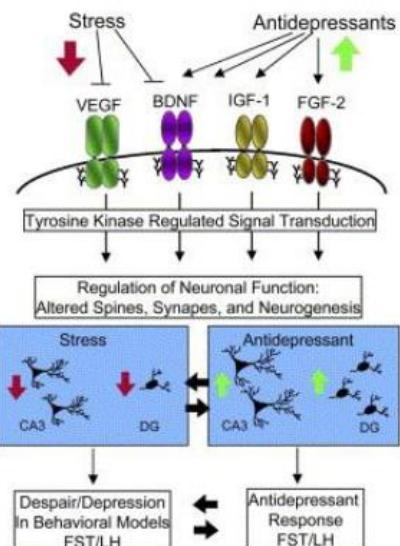
En estudios con roedores, estos **cambios pueden inducirse por el estrés**. Las neuronas sometidas a estrés tienen **menos dendritas y una disminución de espinas dendríticas y sinapsis**, inducidas por estrés.

Se han estudiado las vías moleculares implicadas, es la vía de la PI3K, Akt, mTOR y GSK3. En estos modelos además se ha visto cómo funcionan los fármacos antidepresivos, que revierten los cambios inducidos por el estrés. Cuando tratamos al ratón con fármacos antidepresivos, con un tratamiento crónico, vemos que se recuperan las neuronas CA3 y que hay muchas más neuronas en el giro dentado.

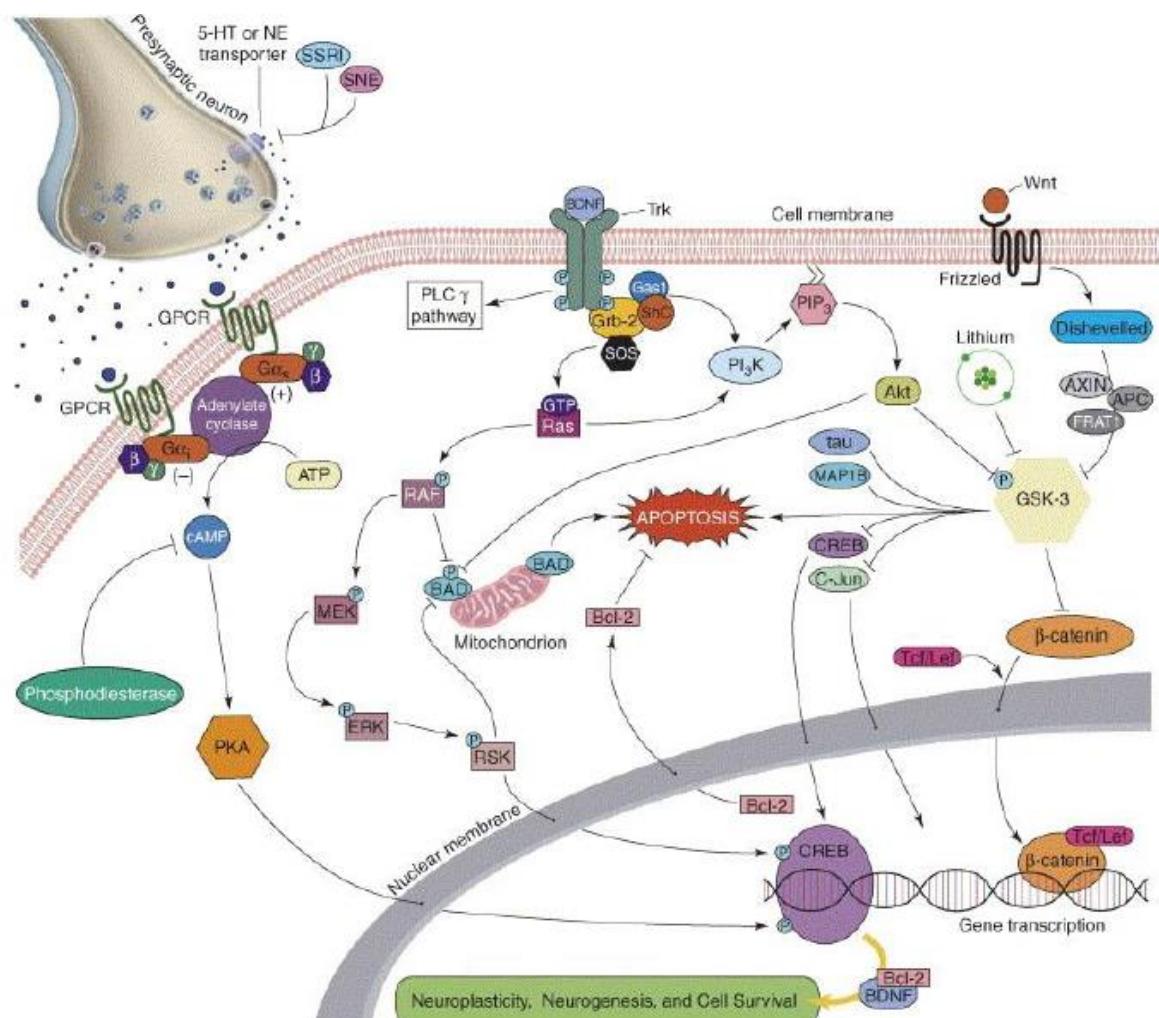


Los antidepresivos actúan aumentando niveles de neurotransmisores que a su vez aumentan niveles de factores neurotróficos, siendo estos los que revierten la atrofia neuronal. Funcionan a partir de las cascadas de monoaminas.

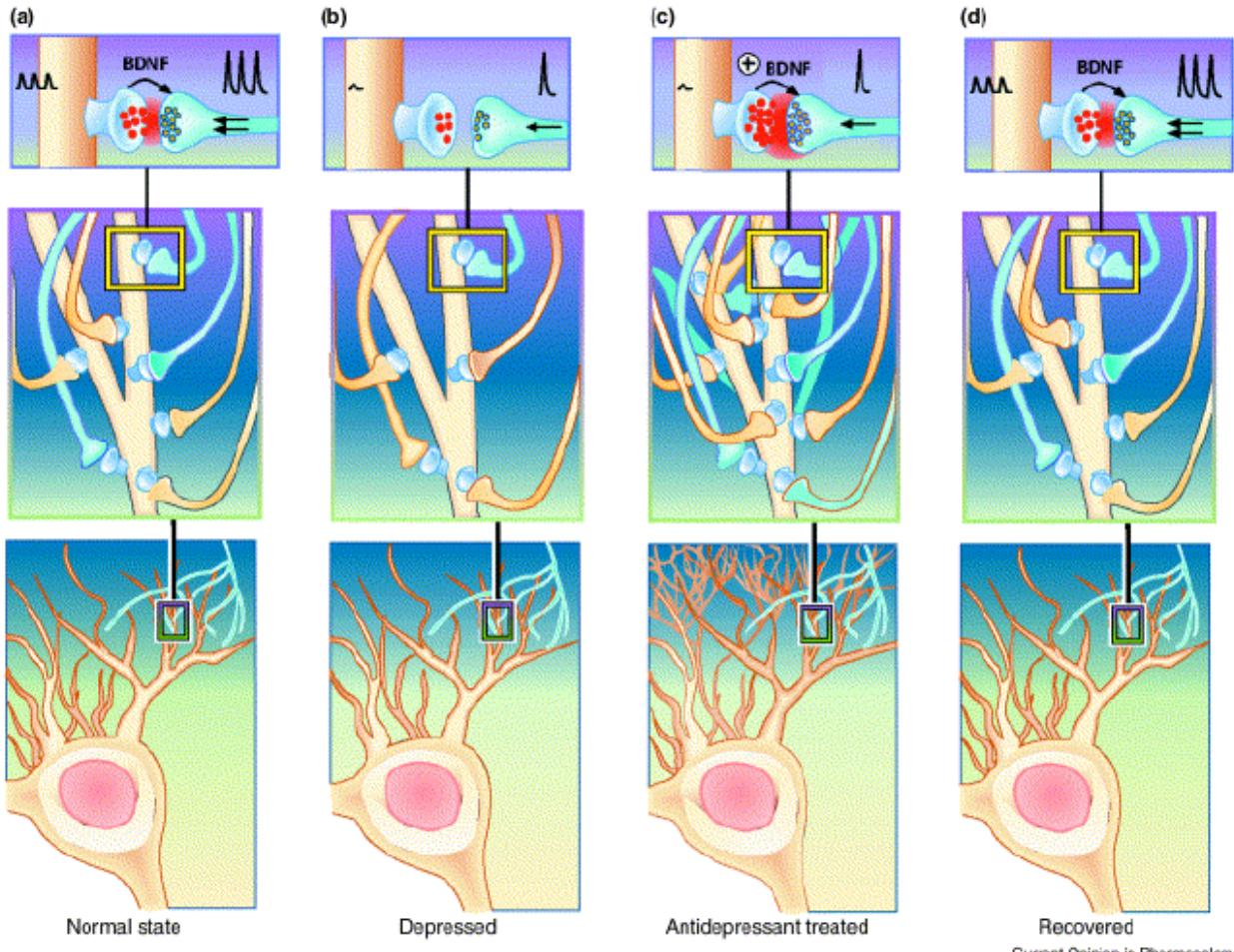
El prozac es un inhibidor de la recaptación de serotonina. Esto, activa receptores y a través de una vía de transducción de señales, se activan una serie de factores de transcripción que llevan a la activación de la expresión de ciertos genes, entre ellos genes de factores neurotróficos, BDNF.



El BDNF aumenta la extensión de dendritas, formación de sinapsis, etc. Se ha llegado a plantear que el BDNF podría ser el mediador crucial en el efecto de los fármacos antidepresivos. En una situación normal, habría una producción normal de BDNF que mantiene las sinapsis funcionales.



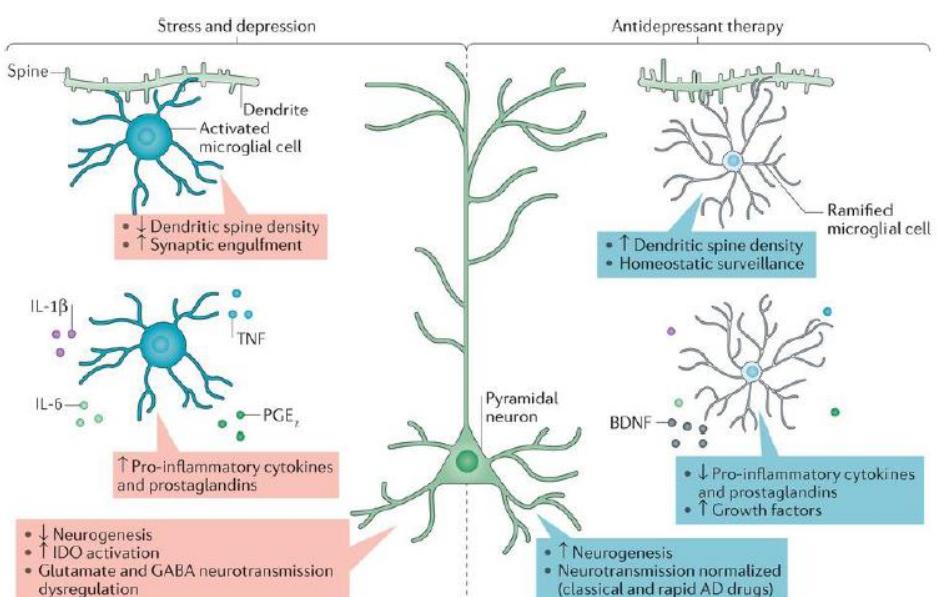
En un paciente en estrés tendría una pérdida de BDNF. Cuando tratamos con antidepresivos, estos incrementarían niveles de neurotransmisores y BDNF y las sinapsis se recuperarían, y con un paciente recuperado habría una recuperación de la señalización de BDNF.



Current Opinion in Pharmacology

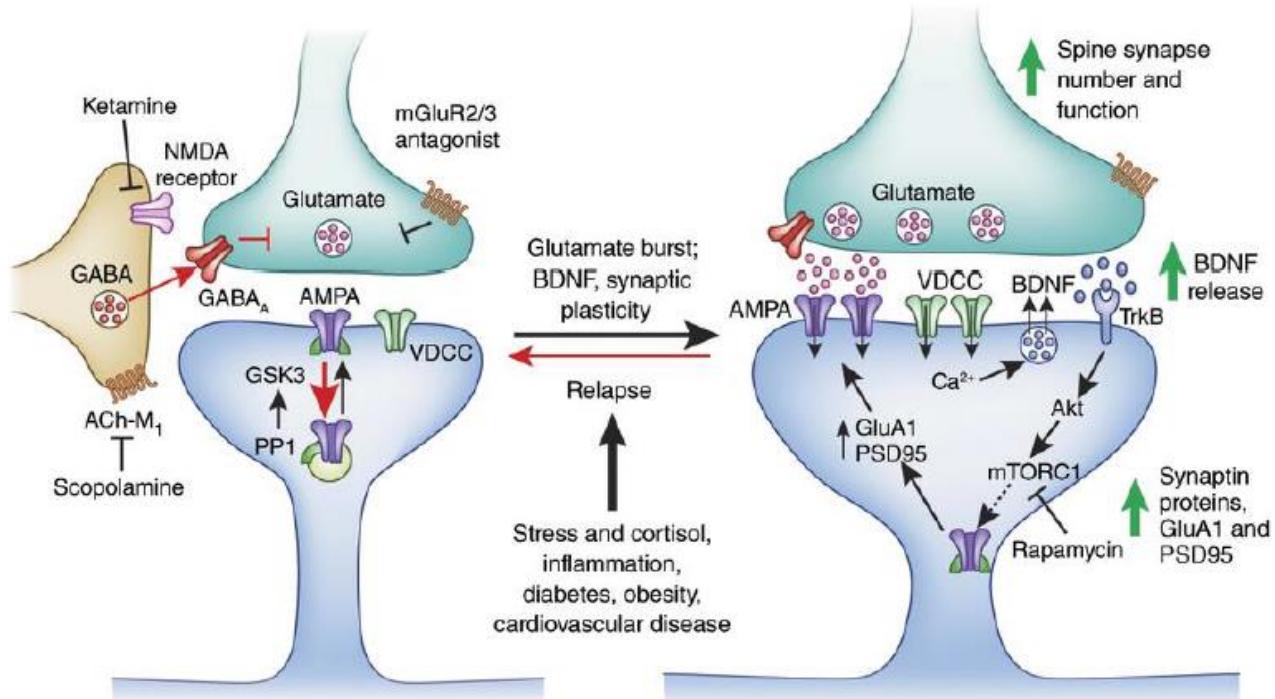
Otros factores implicados son la **microglía**. La **microglía juega un papel importante en esta atrofia neuronal que ocurre en la depresión**. En pacientes deprimidos, hay un aumento de citoquinas proinflamatorias y una activación de la microglía que fagocita sinapsis, facilitando la fagocitosis de sinapsis.

Con fármacos antidepresivos, la **microglía secreta factores neurotróficos** en lugar de mediadores **proinflamatorios**, teniendo un papel importante en cambios en el metabolismo estos últimos.

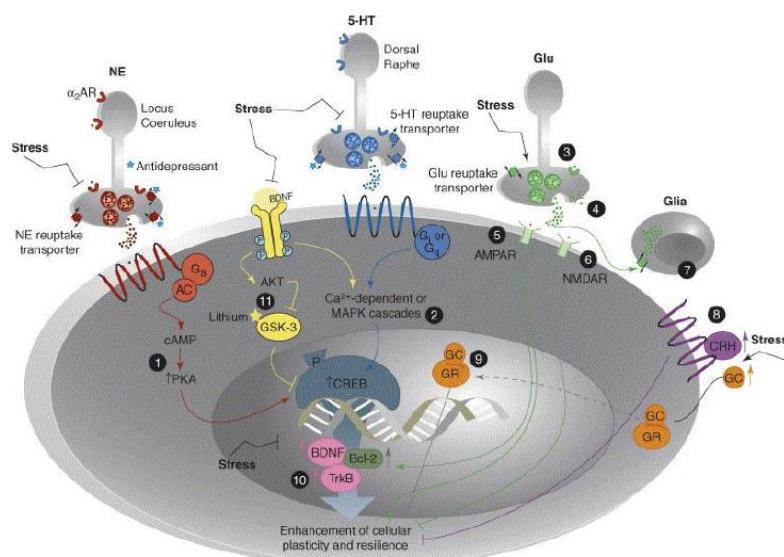


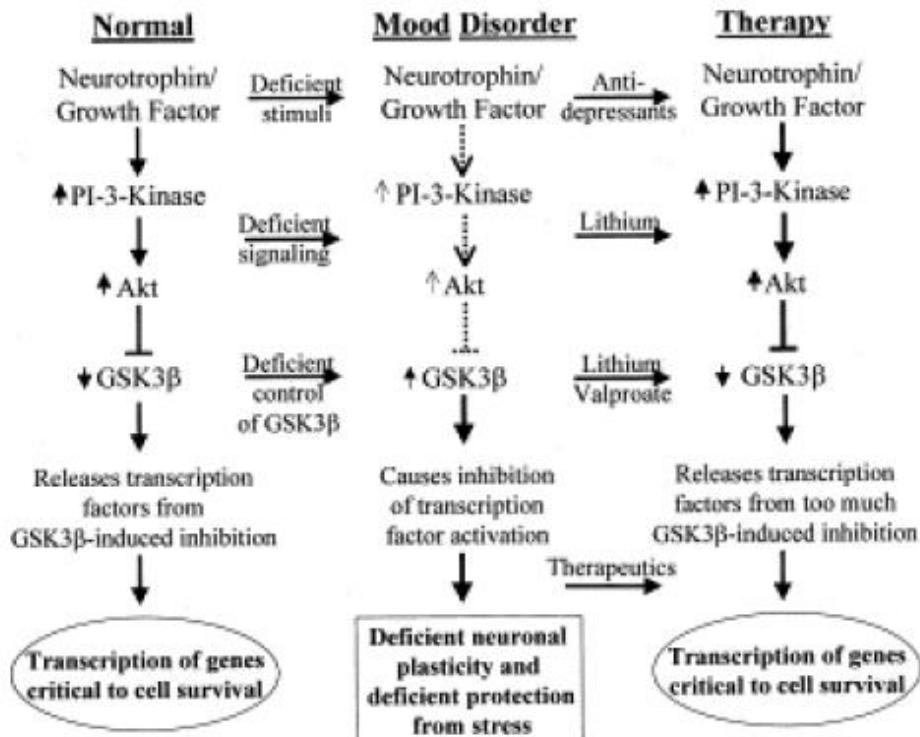
Una de las cosas más importantes es que todos estos estudios sobre la depresión en modelos, nos han proporcionado una información molecular sobre posibles vías que están implicadas, aumentando el número de dianas terapéuticas:

- Antagonistas de estas citoquinas proinflamatorias podrían tener un efecto
- Agonistas de receptores de factores neurotróficas
- Hay ciertas similitudes entre depresión y enfermedades neurodegenerativas. No es infrecuente que una persona tiene una depresión y posteriormente se desarrolla Parkinson.

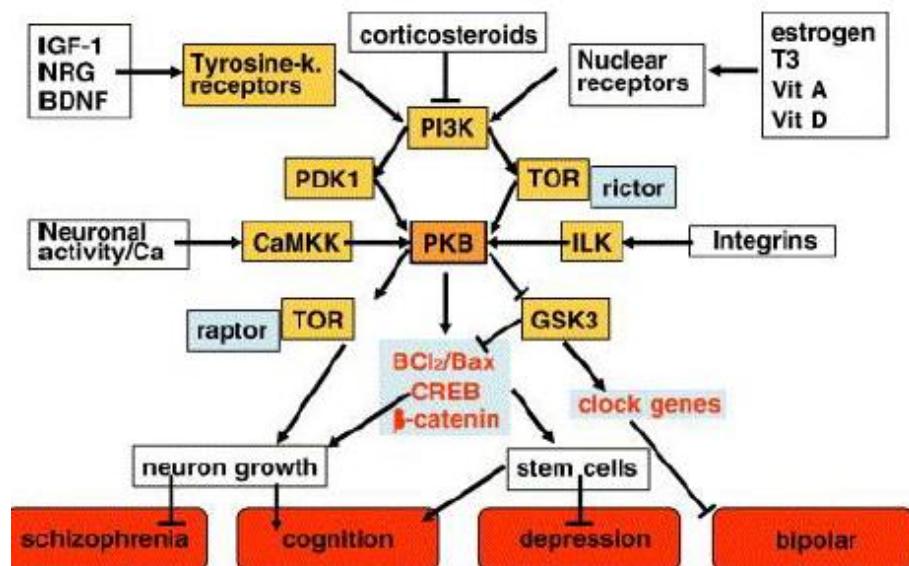


Con respecto al litio, inhibe distintos enzimas, entre ellos la GSK3β, que está en el mecanismo de acción de las neurotrofinas (que también inhiben a la GSK3β). La GSK3 también está implicada en la hiperfosforilación del tau que sucede en la enfermedad de Alzheimer y otras tautopatías.

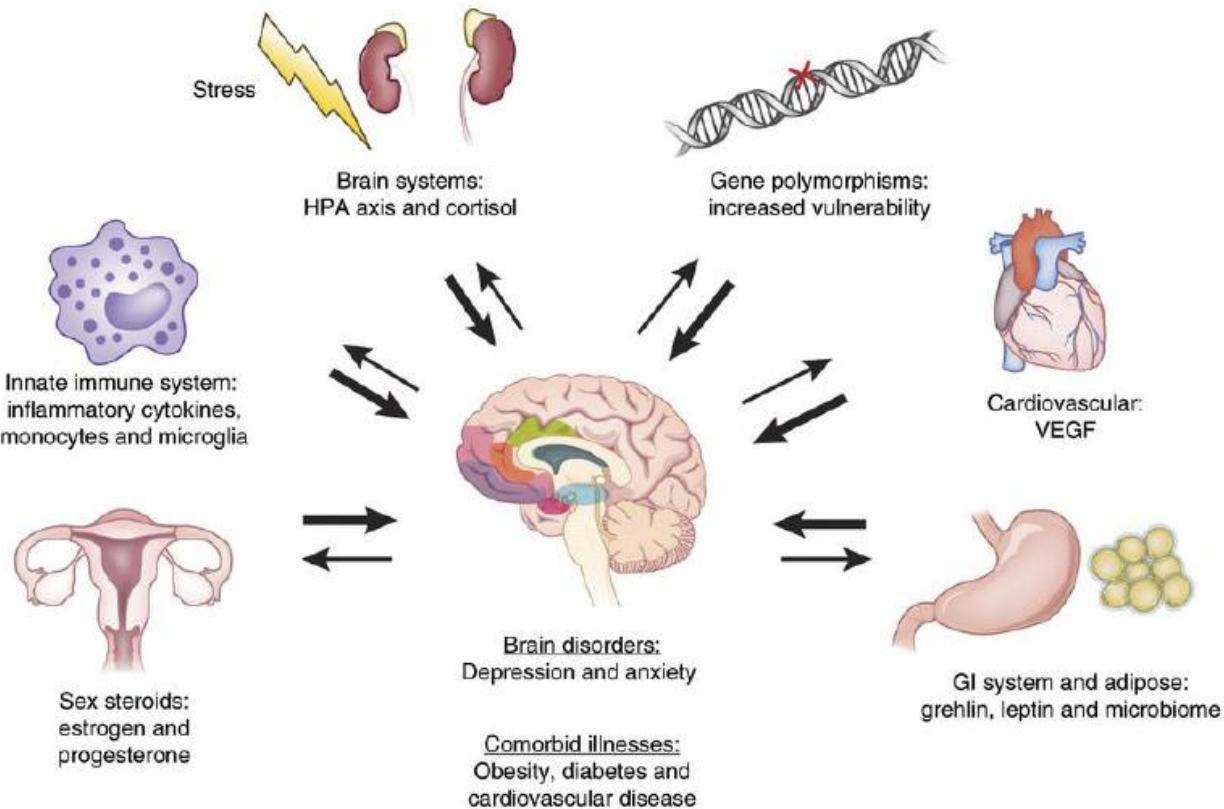




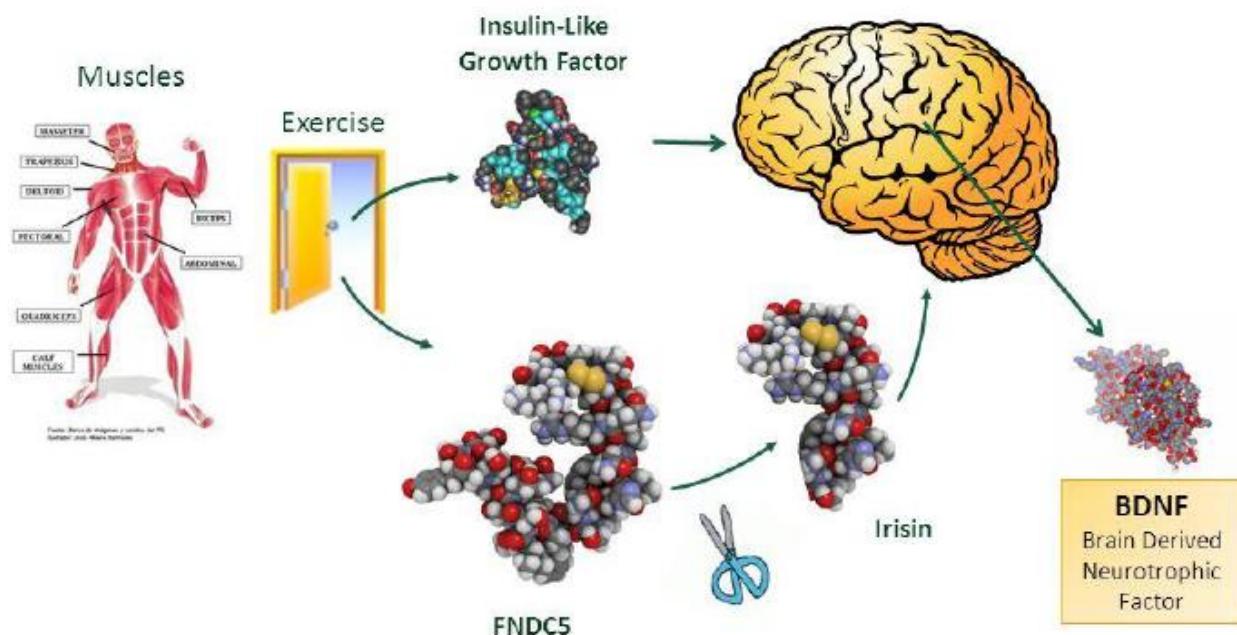
Es curioso que la vía de la PI3K no sólo tiene que ver con depresión sino también está alterada en otros trastornos psiquiátricos.



La depresión es muy heterogénea, y hay muchos mecanismos que influyen en ella, por lo cual nos hace falta una visión más integrada de todo lo que afecta al trastorno depresivo. El ejercicio físico disminuye los problemas depresivos y la vulnerabilidad a la depresión.

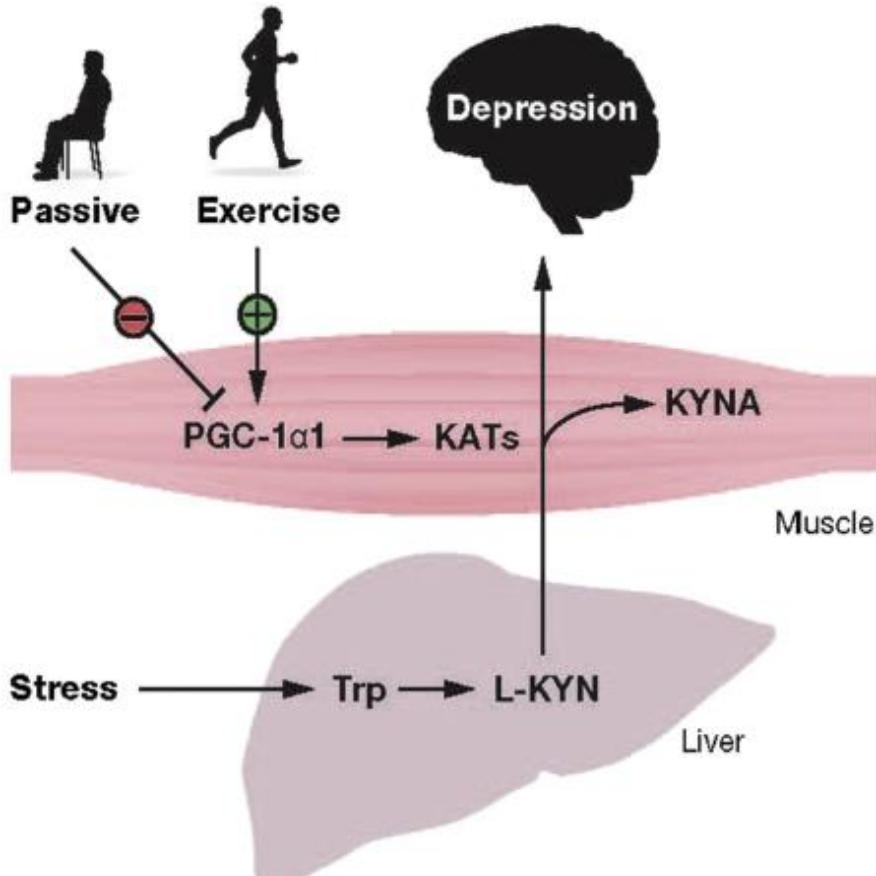


Hay mecanismos moleculares que explican esto. El músculo produce una serie de factores, la **irisina**, que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y estimular la producción de **BDNF**. Otro de los factores implicados podrían ser la expresión de IGF-1, que inducen BDNF.



El ejercicio físico tiene un efecto sobre las kinureninas, moléculas que resultan del catabolismo del triptófano, que es el precursor de la serotonina. Cuando este se transforma en serotonina, induce factores neurotróficos.

En condiciones donde hay muchas citoquinas proinflamatorias se activan una serie de enzimas que transforman al Trp en kinureninas y ácido quinolínico, neurotóxico, pues activa microglía, activa receptores de Glu... Esta toxicidad puede acelerar cambios en las neuronas.



Existe una vía alternativa que lleva al ácido **kinurénico**. Si se inhibe la vía del ácido quinolínico, podría ayudar?. En situación de ejercicio físico, **en nuestro hígado, el estrés induce la producción de kinureninas que entran en el cerebro y ejercer acción neurotóxica**.

El ejercicio físico producen la inducción de las KATs, que trasforman el ácido kinurénico, pero no pasa la barrera hematoencefálica. Aún así, estamos reduciendo la producción de ácido quinolínico.

Hay ciertas bacterias de la microbiota que producen kinureninas, pudiendo influir.

Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades metabólicas – 11-03-2019

Las enfermedades raras comprenden a las **enfermedades metabólicas hereditarias**. Con casi 1000 enfermedades metabólicas hereditarias descritas, **la escasa incidencia de enfermos afectados de patologías individuales y la enorme variabilidad clínica, bioquímica y genética**, son factores que pueden **retrasar enormemente el diagnóstico y con ello la búsqueda de opciones terapéuticas adaptadas**.

Debido a lo raro de estas enfermedades, en ocasiones, **el diagnóstico se retarda años**. Hay múltiples clínicos implicados, muchas técnicas invasivas para llegar al diagnóstico final y con ello una carga emocional enorme. **El impacto emocional es alto, y desde el punto de vista económico, el coste médico sube.**

A lo largo de estos años, se ha dado un impulso al diagnóstico de las enfermedades raras. Esto permite en un principio que se pueda hacer un diagnóstico más efectivo.

Enfermedades metabólicas hereditarias

Las **enfermedades raras (1/2500)** tienen un subgrupo, las enfermedades **metabólicas hereditarias**. Incluso en este grupo, también ha cambiado mucho el concepto de enfermedad metabólica hereditaria. **Hay aproximadamente unas 1000, pero este número es muy cambiante entre distintas fuentes.**

Todas son de escasa incidencia, lo cual dificulta el diagnóstico, identificación del fenotipo (presentación clínica de estos pacientes) y tienen una enorme variabilidad clínica, bioquímica y genética. Muchos de estos casos, **tienen tratamientos sintomáticos**.

El concepto de enfermedad metabólica hereditaria **ha ido evolucionando desde el siglo XIX a la medicina de precisión**. Por otro lado, también ha cambiado nuestra aproximación diagnóstica. En la aproximación clásica, nos encontramos con dos ramas: sintomatológica o, para algunas patologías, el diagnóstico preclínico dependiendo de los niveles de distintos metabolitos (**análisis metabólico dirigido**).

En un futuro, **podríamos dejar de utilizar el fenotipo, usando el análisis genético**. Otra **aproximación es la aplicación de las aproximaciones ómicas (transcriptoma, metaboloma, genoma...).**

En cuanto al tratamiento, **hay dos visiones**. La visión tradicional se trata de una **intervención dietética dirigida a paliar el desbalance metabólico**. En otras ocasiones, se hace una terapia de **reemplazo enzimático (enfermedades lisosomales, por ejemplo; terapia génica)**. Por otro lado, en un futuro se haría un estudio sobre el mecanismo molecular de las mutaciones, con **otras opciones terapéuticas**. Estos tratamientos últimos están en estudios clínicos.

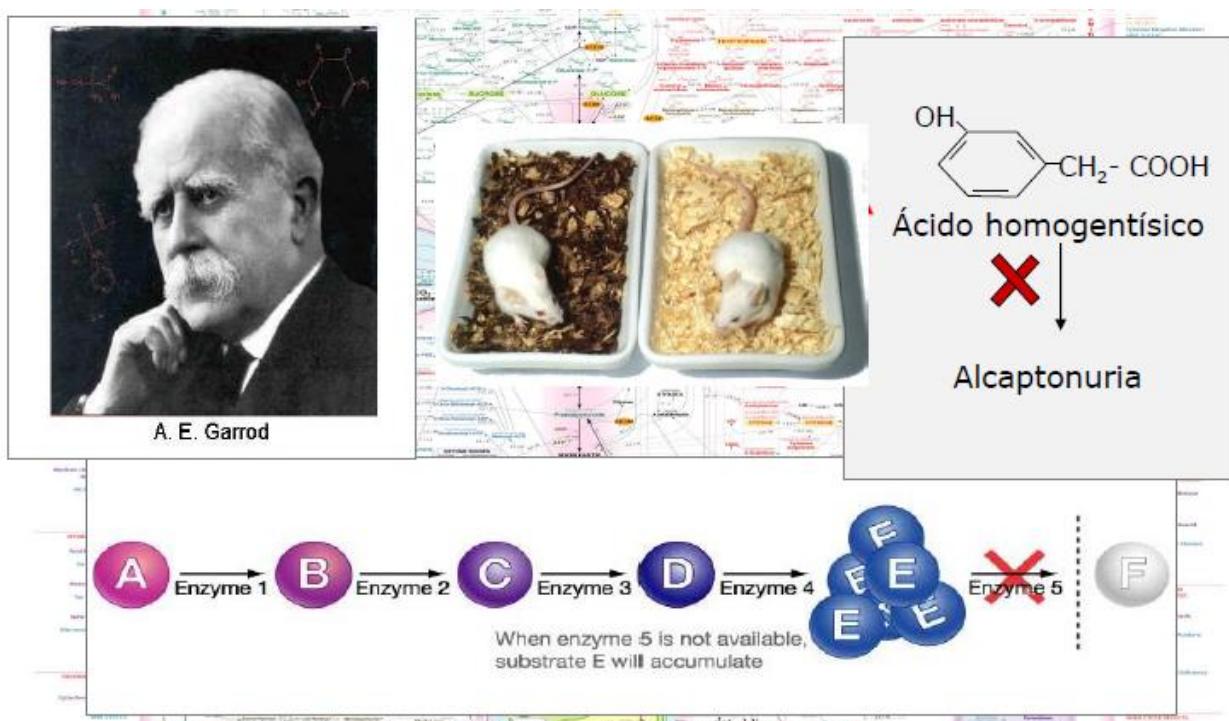
Definición de una EMH

Enfermedad **genética, monogénicas/mendelianas**, que afectan a una enzima implicada en una ruta metabólica. Son diagnosticables por un cambio en el patrón de metabolitos que presenta. En un **fluido biológico, se podría ver una afectación.**

Son enfermedades **muy graves en general, en una tasa alta de morbi-/mortalidad**. Muchas de ellas se **manifiestan en la infancia**, incluso en periodo neonatal y pre-natal. Muchas de las enfermedades **afectan a varios sistemas, y en más de 70% de los casos, el SNC.**

Hay enfermedades con características diversas que hacen que no se ajusten tan claramente a este perfil.

Una EMH representa la manifestación clínica de una alteración en un flujo metabólico normal. Este planteamiento ya se veía en el siglo XX. **Garrod define un error innato del metabolismo, como una situación extrema de un comportamiento químico con variaciones individuales.** Cada individuo sería desde el punto de vista clínico un patrón individual, que cuando se altera produce patología.



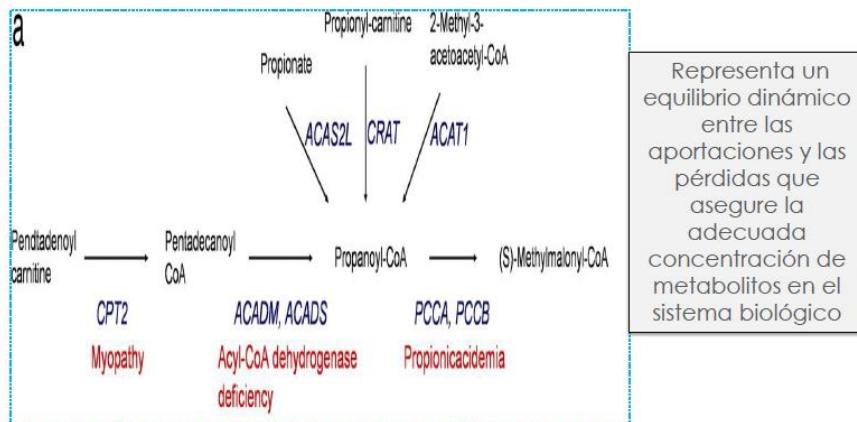
“cada persona es una individualidad química resultante de la actividad de los distintos enzimas que operan de igual forma en el metabolismo”

Cada persona individualmente dependiendo de su nutrición y background genético, tiene unos **valores homeostáticos de los distintos niveles de metabolitos, con un patrón individual biológico.**

Muchas rutas confluyen en la generación de ciertas moléculas. Los niveles de un metabolito **dependen de inputs y outputs, y alteraciones en estas enzimas son las que producirían un desbalance.**

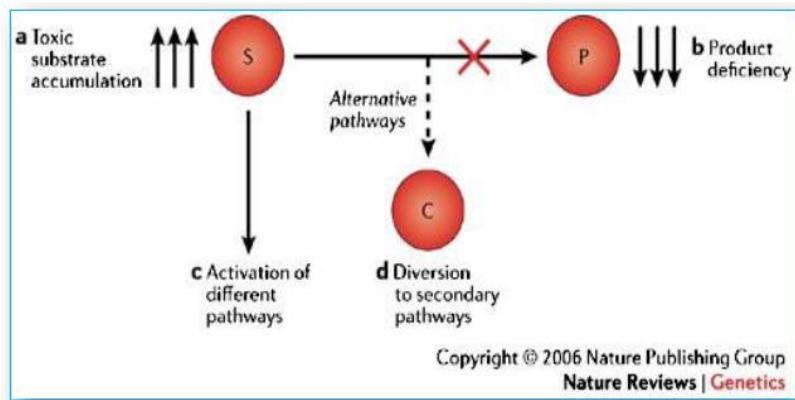
Así, **hay distintas vías de alteración en un flujo metabólico:** se puede dar patología tanto por exceso de sustrato, como por falta de producto como por **divergencia del sustrato a vías secundarias que genera productos tóxicos.**

No es tan sencilla la identificación de la enfermedad a partir de los metabolitos, pues no aparece un metabolito incrementado cuando hay un bloqueo, sino que puede haberse reconvertido en otros que no están en el paso anterior de la vía metabólica.

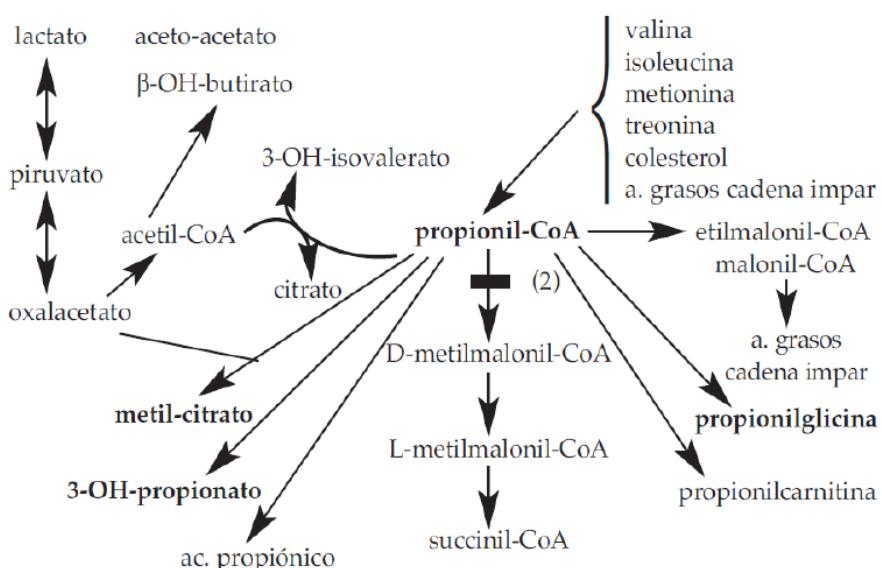


¿De qué depende el flujo neto?

Eso nos puede llevar a que haya un fenotipo muy variado que afecte a muchos tejidos o rutas metabólicas diferentes.

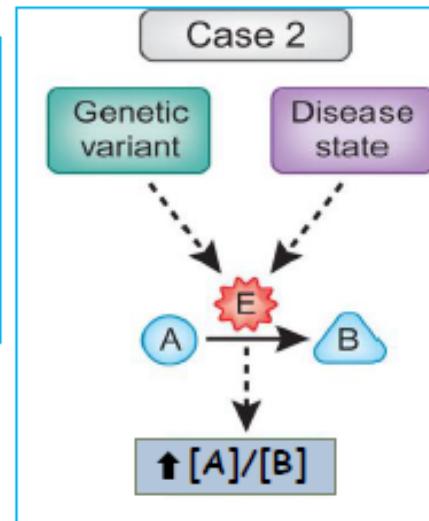


Acidemia propiónica: algunos metabolitos asociados al bloqueo

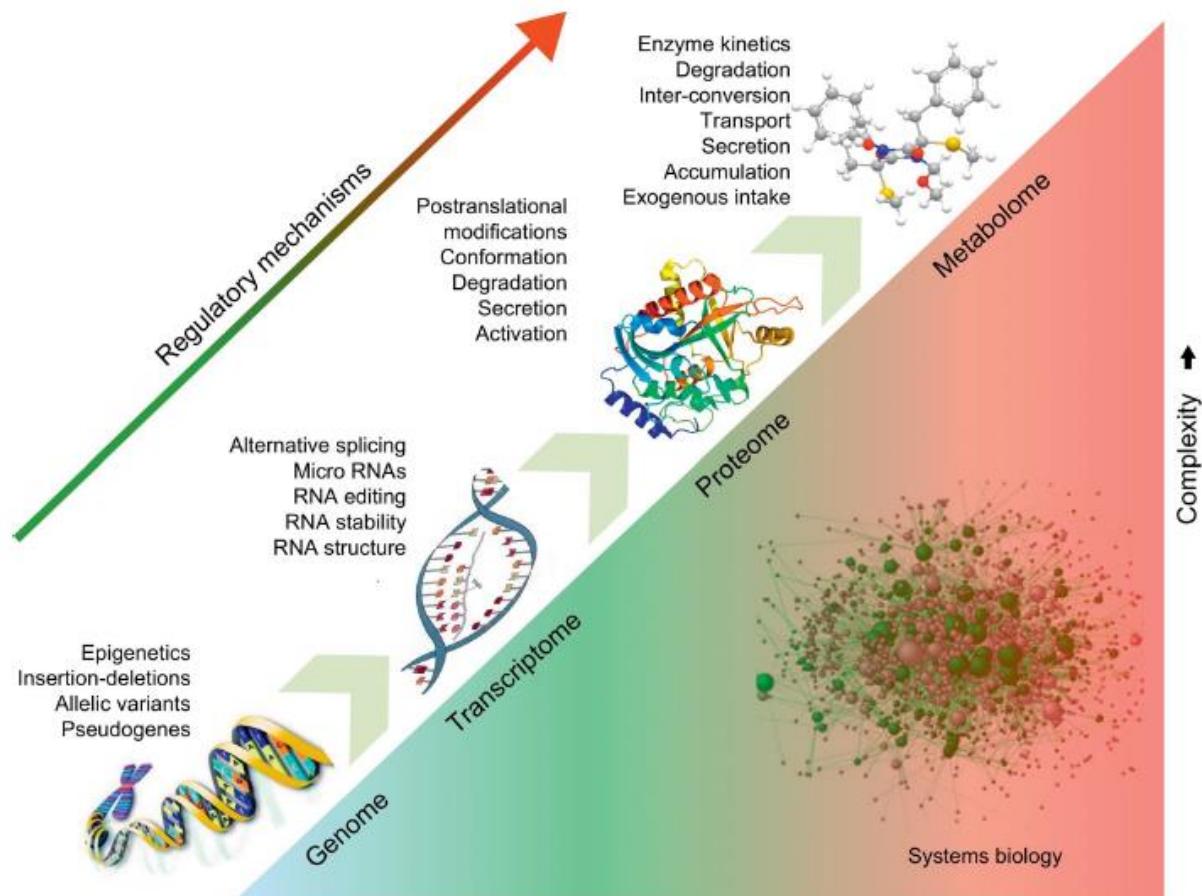


FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR AL FENOTIPO DE PATOLOGÍA

Ej. La gran variabilidad fenotípica de la hipercolesterolemia familiar es en buena medida el reflejo de la existencia de variantes genéticas no patogénicas que afectan a la expresión de genes modificadores del fenotipo (por ejemplo expresión de ApoE)



El defecto en la enzima puede venir de múltiples causas, pues una proteína es el reflejo de todo el metabolismo celular que va por detrás. Dentro de esto, tenemos el genoma, el transcriptoma, proteoma (la proteína no es funcional), interactoma (muchas subunidades de complejos multienzimáticos se desmentelan si falta una subunidad)...



Hay un aspecto importante también, que es la **epigenética**. Las modificaciones epigenéticas hacen que en un momento determinado un gen se expresa o no, habiendo variantes que pueden producir metilaciones de genes.

Los errores innatos del metabolismo son una aproximación atractiva para abordar la medicina de precisión, debido a que tienen una diana concreta. En la medida en la que vamos conociendo las EMH, vemos que hay distintos sistemas que pueden afectar al fenotipo de la patología (variante genéticas que afectan a la expresión de genes modificadores de genotipo). Este efecto se ve en la hipercolesterolemia familiar, pues hay muchas variantes genéticas que modifican el fenotipo.

En muchos casos, estas enfermedades tienen un problema de diagnóstico, sobre todo cuando el fenotipo patológico sale de lo habitual. Así, es necesario cambiar la estrategia diagnóstica. En muchos casos, la estrategia diagnóstica es larga en el tiempo.

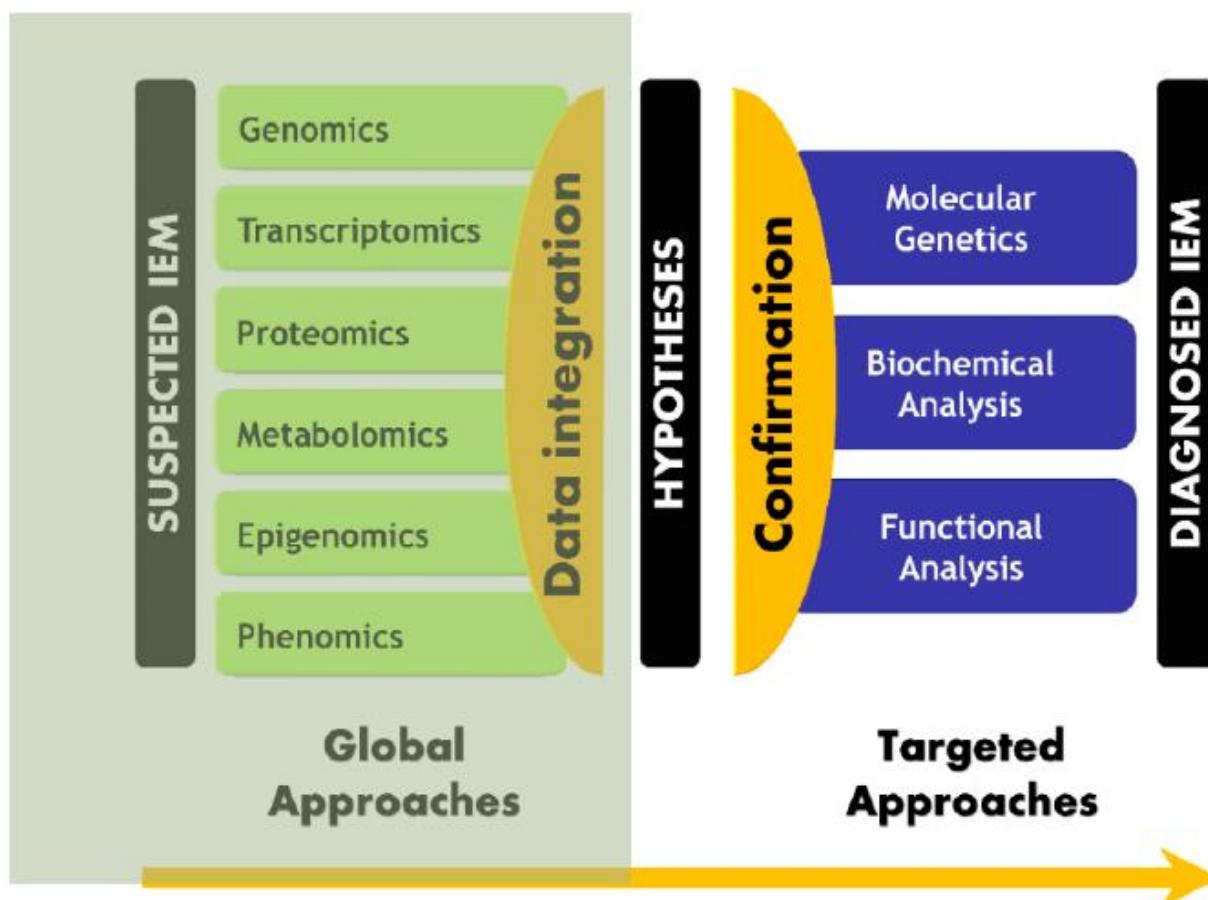
La medicina del siglo XXI tiene que ser una aproximación ómica, que mida la conjunción de todos los factores que afectan directa e indirectamente sobre el individuo.

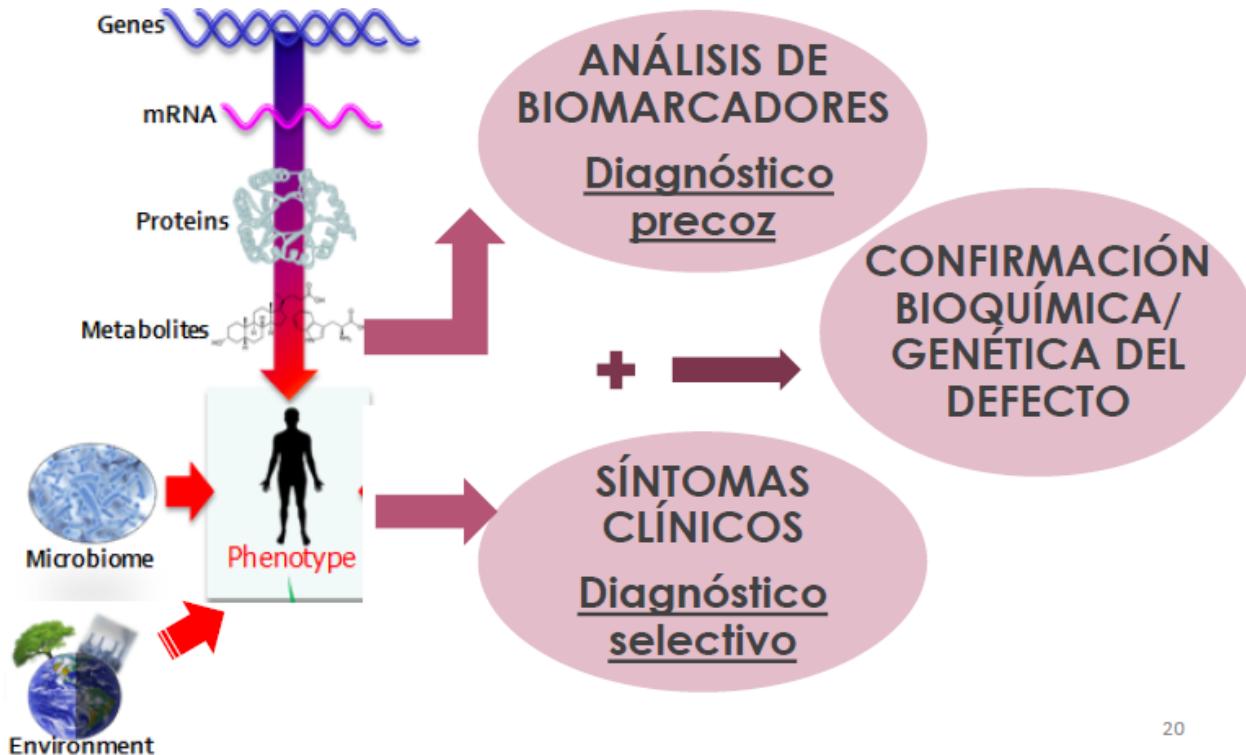
- **Aproximación dirigida.** Se basa en el fenotipo, requiriendo un diagnóstico molecular, bioquímico y de función.

Ahora mismo, se realiza una determinación del fenotipo del paciente y a partir de este fenotipo (síntomas clínicos del paciente) vamos a buscar cual es la causa de la enfermedad.

Una vez que se tienen tipificados los síntomas, se determina la alteración metabólica y con ello la causa genética.

Junto a esta, se encuentra la medicina preventiva o diagnóstico precoz (no se valora el fenotipo, pero se miran alteraciones en biomarcadores para establecer el diagnóstico).





20

En este caso, el clínico tiene que categorizar bien al paciente:

- **Categoría 1.** Patologías que implican únicamente un único sistema funcional. En general, los **síntomas son muy uniformes**.
- **Categoría 2.** Si una lesión bioquímica afecta a una **ruta metabólica común** a un gran número de células u órganos, hay **una multitud de síntomas**. Muy a menudo implican al SNC, estando todas aquellas que afectan al metabolismo intermedio.
 - **Grupo 1. Enfermedades que resultan de la alteración en la síntesis o catabolismo de moléculas complejas.**
 - Enfermedades de esfingolípidos provocadas por su acumulación dentro del lisosoma por defectos de hidrolasas, por ejemplo.
 - Enfermedades donde falla la glicosilación de proteínas.

Los síntomas son **permanentes, progresivos e independientes de otros eventos intercurrentes (no relacionados con la alimentación)**.

- **Grupo 2. Enfermedades del metabolismo intermedio que provocan intoxicación aguda o progresiva.**

Por acumulación de compuestos tóxicos como consecuencia del bloqueo. Hay períodos libres de síntomas. Se tratan de **enfermedades clásicas como la PKU, la alcaptonuria...**

Puede verse **exacerbada por la alimentación**. Cualquier alteración inmunológica provoca un incremento en la tasa catabólica, por lo cual se puede producir un daño agudo. **Muchos de estos pacientes tienen picos agudos de daño debido a fenómenos intercurrentes.**

- **Grupo 3. Enfermedades del metabolismo intermedio con síntomas que provocan una deficiencia en la producción o utilización de energía.**

Entre los síntomas más comunes están las **hipoglucemia, hipotonía generalizado, miopatía y cardiomielopatía...**

Defecto de ácidos grasos → hipoglucemia (tira de glucosa) sin cetosis.

Grupo 1: Enfermedades que resultan de la alteración en la síntesis o catabolismo de moléculas complejas. Los síntomas son permanentes, progresivos, e independientes de otros eventos intercurrentes y no relacionados con alimentación. **Defectos de Glicosilación, Enfermedades lisosomales**

Grupo 2: Enfermedades del metabolismo intermedio que provocan intoxicación aguda o progresiva por acumulación de compuestos tóxicos como consecuencia del bloqueo. Todas las condiciones en este grupo presentan similitudes clínicas, incluyendo intervalos libres de síntomas. **Acidurias Orgánicas, Jarabe de Arce**

Grupo 3: Enfermedades del metabolismo intermedio con síntomas que provocan una deficiencia en la producción o utilización de energía. Entre los síntomas más comunes incluyen hipoglucemia, hipotonía generalizada, miopatía y cardiomielopatía. **Defectos de oxidación de ácidos grasos. Enfermedades mitocondriales**

Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades metabólicas – 12-03-2019

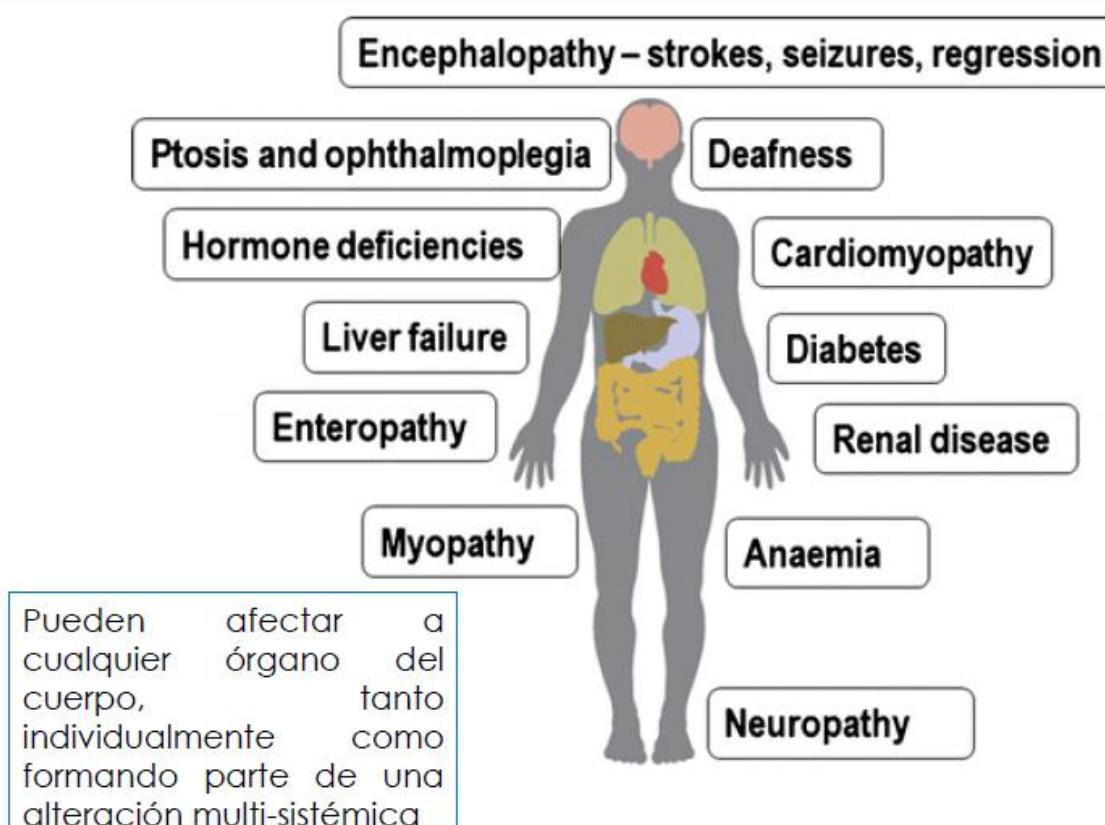
Uno de los aspectos importantes es la **clasificación clínica de los pacientes**. Todas las que vamos a ver están dentro de la categoría II, teniendo en muchos casos una patología que afecta a muchos órganos y tejidos.

Un defecto en la ruta de síntesis de urea, sería múltiple. Es decir, en muchas ocasiones, **la ruta de la síntesis puede ser de un órgano, pero los efectos ser globales produciendo daño múltiple**. La clasificación así, no siempre es tan sencilla.

Es difícil encuadrar muchas enfermedades. Por ejemplo, **la categoría 3 (disfunción energética), puede tener múltiples expresiones patológicas (como en defectos mitocondriales)**. En enfermedades mitocondriales, hay presentaciones clínicas muy variadas dependiendo de si el DNA afectado es mitocondrial o nuclear, la localización del defecto, etc.

Además, es necesario tener una visión clara sobre el fenoma del individuo.

Complejidad clínica de las enfermedades mitocondriales



Consideraciones clínicas generales

- Síntomas antenatales.

- **Malformaciones verdaderas** (esqueléticas, cardiopatías congénitas, aplasias viscerales, defectos del tubo neural, anencefalias), **displasias** (quistes) y **signos funcionales** (retrasos en el crecimiento intrauterino, microcefalia)

Las malformaciones irreversibles sólo se observan en enfermedades peroxisomales, O-glicosilación, defectos de la cadena mitocondrial.

Sin embargo, no siempre la malformación externa nos permite aproximarnos al diagnóstico.

La mayoría de trastornos de tipo intoxicativo no interfieren ni con el desarrollo embrionario ni con el desarrollo fetal.

- Circunstancias clínicas

- **Presentación aguda de síntomas en periodo antenatal y neonatal, como el distress metabólico.** Muchos niños nacen y tienen un problema al principio.
Algunos síntomas pueden ser neurológicos (ausencia de succión), respiratorios (falta de respiración...)
- **Presentación aguda (y recurrente) de síntomas de comienzo tardío (coma, ataxia, vómitos, acidosis, intolerancia al ejercicio)**
- **Síntomas neurológicos progresivos asociados a un daño agudo, algo que les provoca daño**
- **Síntomas específicos y permanentes de órganos y sistemas.**

- Edad de presentación de los síntomas

La presentación de la enfermedad tiene relación con la gravedad de la misma. Dependiendo de la tardanza de los síntomas, **se relacionaría con una distinta gravedad y en muchos casos con la mutación causante.** Sin embargo, muchas veces hay diferencias entre individuos de la misma mutación, pues el fondo genético/ambiental sobre el que aparece esta mutación es distinto en cada individuo.

Por otro lado, hay enfermedades que se producen más tarde **porque se manifiestan asociados a la maduración del órgano principal al que afecta la patología.**

Definición tradicional de las EMH

Las enfermedades **metabólicas hereditarias son un subgrupo de enfermedades monogénicas mayoritariamente raras y que afectan a la biosíntesis o rotura de metabolitos en rutas metabólicas específicas.** Es por ello que se asocian a unos perfiles bioquímicos concretos, que pueden ser usados para su diagnóstico.

Diagnóstico

Antes de buscar el patrón metabólico alterado, se han intentado clasificar bioquímicamente las enfermedades. Esta clasificación es intrincada.

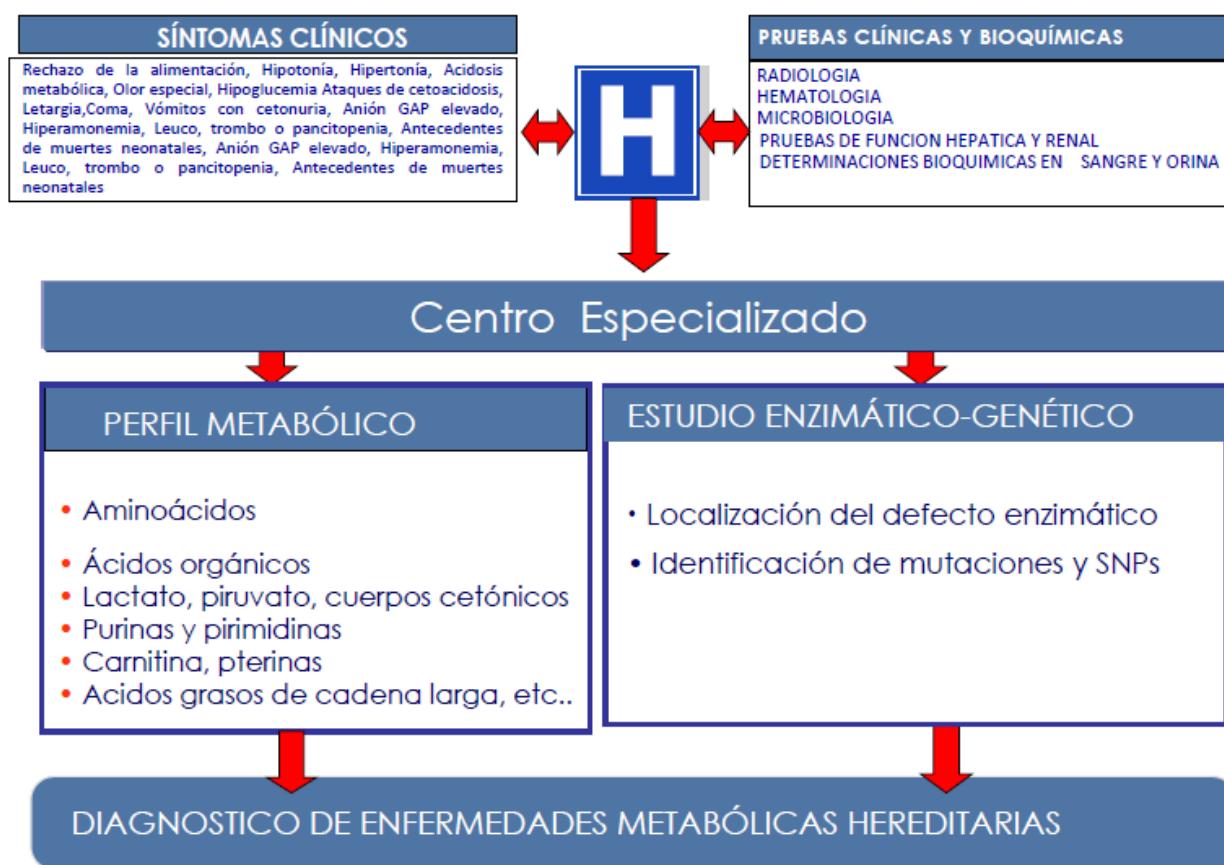
Work-flow

El work-flow a la hora de diagnosticar una enfermedad metabólica hereditaria pasa por varios puntos. En un primer momento, el paciente llega a un hospital donde se hace una valoración de su sintomatología clínica y se le hacen una serie de pruebas clínicas y bioquímicas.

El clínico, bajo la sospecha de enfermedad metabólica hereditaria, deriva el estudio del paciente a un centro especializado donde se hace un perfil metabólico y un estudio enzimático-genético, que se puede cotejar para realizar el diagnóstico de la enfermedad metabólica hereditaria.

La sospecha diagnóstica conlleva hacer una metabolómica dirigida. Dentro de todos los metabolitos del organismo, se intentan buscar determinados bloques de metabolitos que podrían estar modificados. Así, se estudian aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, purinas y pirimidinas, etc. Es decir, se hace un barrido por las rutas metabólicas generalistas.

Con este perfil metabólico, se intenta localizar cuál es la ruta metabólica que puede estar afectada y con ello se haría un estudio enzimático y genético.



Sospecha de EMH basados en los síntomas clínicos

SÍNTOMAS	ALTERACIÓN METABÓLICA	POSIBLE DEFECTO
1 Progresivos Independientes de ingesta DISMORFIAS	Síntesis o degradación moleculas complejas	Enf. Peroxisomales CDG
2 Intoxicación aguda Intervalos libres de síntomas: Relación con ingesta	Acumulación de metabolitos tóxicos	Aminoacidopatías Enf. ciclo de la urea Acidemias orgánicas
3 Hipotonía: Miopatía; Cardiomiopatía Hipoglucemia Acidosis Láctica	Defecto en la producción de energía	Defectos de β -oxidación de ácidos grasos Glucogenosis Def. en cadena respiratoria

38

La metabolómica dirigida consiste en una serie de técnicas que se pueden aplicar para ver metabolitos:

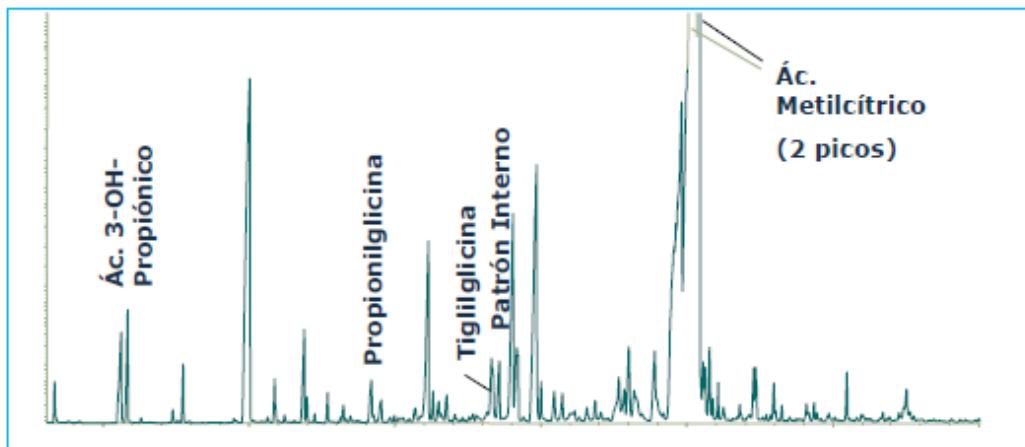
- Espectrofotometría
- Espectrometría de masas en tandem
- Cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC/MS)
- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
- Autoanalizador de aminoácidos

Como ejemplo podemos tomar el diagnóstico por metabolitos de la academia propiónica. En un principio, este diagnóstico puede estar basado en:

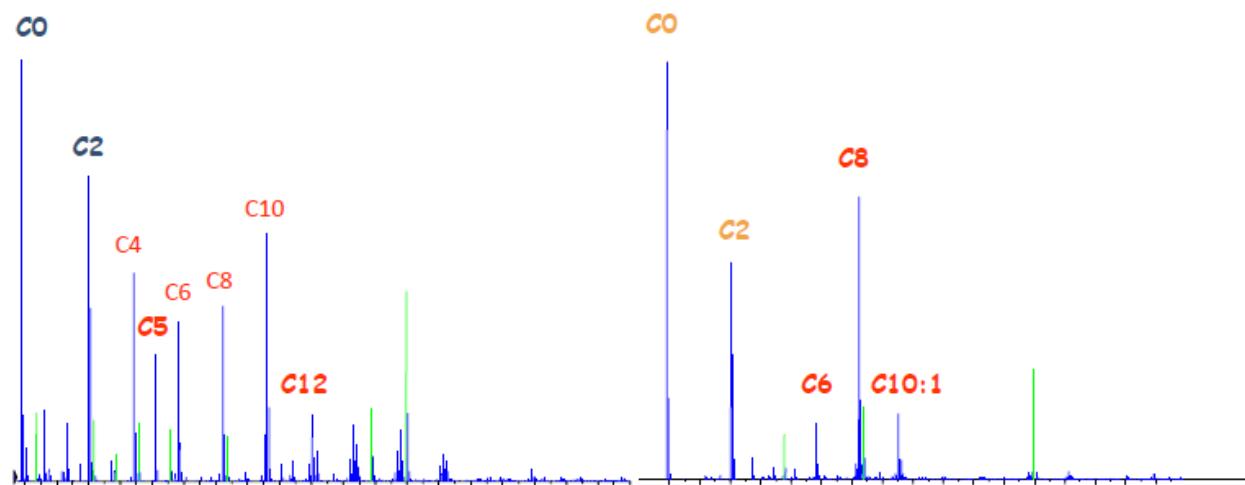
- Alteraciones analíticas inespecíficas.
En academia propiónica se produce cetoacidosis metabólica, hiperamonemia, hiperglicinemia e hiperglicinuria, hipocarnitinemia, acidosis láctica e hipoglucemia.
- Alteraciones de metabolitos específicos en fluidos específicos:
 - Sangre. Aumento de ácido propiónico, OLCFA y propionil carnitina.
 - Orina. Ácido 3-OH propiónico, metilcitrato, propionilglicina, tigliglicina...

La hipocarnitinemia se produce porque cuando **hay un ácido dentro de la mitocondria, este se intenta detoxificar por medio de la vía de la carnitina**. La poca cantidad de carnitina en sangre indica que hay una alta utilización de esta, pudiendo ser un tratamiento la incorporación de carnitina como suplemento dietético.

Los pacientes tienen en sangre **propionilcarnitina** y **ácidos grasos de cadena impar incrementados** (lo que podría tener algún efecto sobre la estructura de las membranas). El metilcitrato aparece cuando el exceso de ácido propiónico se compleja con el OAA, depletando de OAA el ciclo de Krebs y pudiéndose producir una depresión energética..



En otros tipos de defectos de β -oxidación, **se hacen diagnósticos basados en LC/MS/MS**. En ellos, **se separan las distintas acilcarnitinas**. Dependiendo del perfil de acumulación de acil-carnitinas, **podemos diagnosticar uno u otro defecto**.



El perfil metabólico nos orienta sobre dónde está el punto de bloqueo, qué metabolitos se han generado y **dónde ha de buscarse el defecto genético**. Otra opción de diagnóstico es el diagnóstico precoz, presintomático. En este caso, elegimos primero qué enfermedades vamos a intentar diagnosticar precozmente y cuáles son los marcadores de esta enfermedad.

Para algunas enfermedades metabólicas hereditarias se puede hacer un cribado neonatal. **Se hace búsqueda de algunos biomarcadores de patología.** En principio, pueden cribarse aquellas enfermedades que tengan tratamiento y aquellas que tengan una tasa de aparición alta, y donde haya biomarcadores útiles y con servicios de seguimiento.

La realidad es que se criba dependiendo de las comunidades. La espectrometría de masas en tandem ha permitido cribar muchas enfermedades rápidamente (30 enfermedades, por ejemplo). Se puede cambiar el curso natural de la enfermedad con tratamiento.

Técnicas tradicionales

Un análisis- un metabolito- una enfermedad

- Fenilcetonuria
- Hipotiroidismo congénito
- Hiperplasia adrenal
- Galactosemia



Espectrometría de Masas en Tandem (ESI-MS/MS)

Un análisis-varios metabolitos-varias enfermedades

- Aprox. 30 enfermedades simultáneamente partiendo de la misma muestra
- **rapidez y automatización:** 500 muestras/ día, 2 min/ análisis
- **seguridad:** alta sensibilidad, especificidad y precisión

Una de las bases es que muchas de estas enfermedades cambian los niveles de acil-carnitinas. El uso de la determinación de acil-carnitinas nos permite cribar 30 acil-carnitinas diferentes en una única determinación. Para ello, así, se pueden cribar enfermedades de degradación de aminoácidos ramificados, β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, algunas enfermedades con ácidos orgánicos normales...

Casi todas las enfermedades cribadas en Galicia tienen periodos asintomáticos/sintomáticos en los que se producen daño y podemos prevenir la aparición de los síntomas. En otros, mejoramos el curso de la enfermedad.

Una vez descubierto un cambio de patrón, se hace un estudio fino.

En el caso de una enfermedad mitocondrial el proceso de alarga mucho y los pacientes no llegan al diagnóstico.

ENFERMEDADES DETECTABLES POR MS/MS

AA: Aminoacidopatías

- Def. CPS
- Def. OTC
- Citrulinemia
- Argininosuccínico aciduria
- Argininemia
- PKU/HFA
- Tirosinemia tipo I-tipo II
- MSUD
- Hiperglicinemia no cetósica
- Homocistinuria

AO: Acidemias orgánicas

- Ac. propiónica
- Ac. metilmalónica
- Defectos de cobalaminas
- Ac. glutárica tipo I
- Ac. isovalérica
- Def. HMGCoA liasa
- Def. Holocarboxilasa sintetasa
- Metilcrotonilglicinuria
- Ac. Metilglutacónica
- Def. Cetoliolasa

FAO: Defectos en la β -oxidación de ácidos grasos y ciclo de la carnitina.

- LCHAD/Proteína Trifuncional
- VLCAD
- MCAD
- SCAD
- MADD
- Def. transportador de carnitina
- CPT I
- CPT II/ carnitina-acilcarnitina traslocasa

36

En el presente, podemos usar secuenciación masiva, haciendo un análisis de exoma e identificamos las mutaciones. Hoy en día, se hacen basándose en el fenotipo clínico, fenotipo bioquímico o un exoma clínico (genes del OMIM, asociados a patología). Como la mayor parte de estas enfermedades son autosómicas recesivas se pueden hacer filtrados.

Muchos pacientes se quedan sin diagnóstico porque muchas veces las mutaciones no están en los exomas, sino en el intrón. Se va pasando a hacer seq de genoma completo o RNAseq. Es decir, hoy en día no se pasa por diagnóstico enzimático.

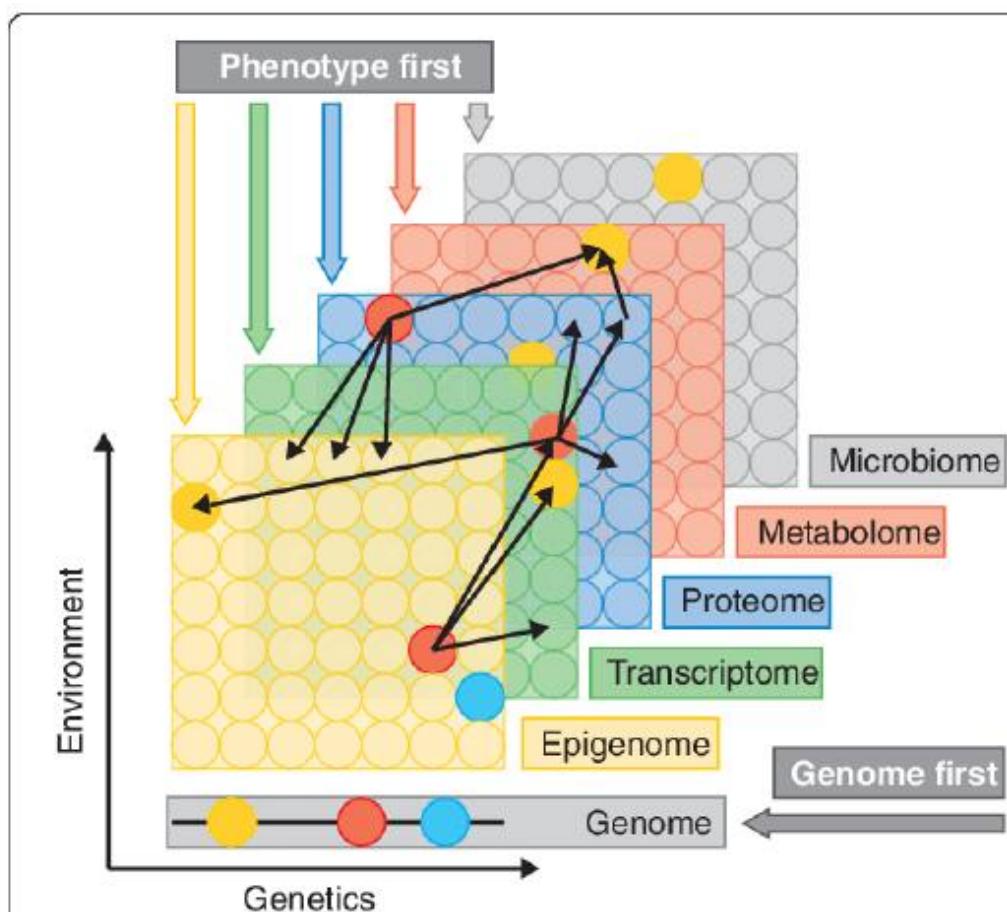
Una enfermedad mitocondrial que tradicionalmente se relacionaba con un defecto, a medida que tenemos a más pacientes, vemos cómo hay un aumento en los genes implicados en patología. En ocasiones, por ejemplo, la PKU puede estar provocado no por defectos en la PAH sino en una de sus chaperonas.

Todas estas consideraciones han hecho que poco a poco se haya ido cambiando la definición de enfermedad metabólica hereditaria hacia una definición más integradora:

La clasificación de una enfermedad como una enfermedad metabólica hereditaria requiere solamente que haya una disfunción de enzimas específicas o vías bioquímicas que sea intrínseca al mecanismo patológico. Así, la presencia de un metabolito anormal ya no es un prerrequisito para que un defecto de este tipo sea reconocido como una enfermedad metabólica hereditaria.

Aquella que puede influir sobre enzimas de la ruta. Esto lleva a una aproximación ómica. El primer problema para hacer un diagnóstico adecuado del paciente es que el primer problema que tenemos es que hay que tener claro el fenotipo clínico del paciente. Resulta que los pacientes vienen de sitios muy diversos y cada clínico evalúa el daño del paciente de una forma diferente. Es

necesaria una estandarización de esos datos. En la Human Phenotype Ontology se promueve la utilización de unos términos HPO que catalogan los síntomas de los pacientes en los pacientes.



Bases Moleculares de la Patología

Hiperfenilalaninemias - PKU y defectos de la BH4 – 13-03-2019

Historia

Descrita como **idiocia fenilpirúvica**. En 1947, Jervis describe que es un defecto en el catabolismo de la fenilalanina.



Fenotipo: al nacimiento normal, retraso mental visible a los pocos meses, olor característico de la orina

Borgny Egeland, madre de los dos primeros PKU diagnosticados

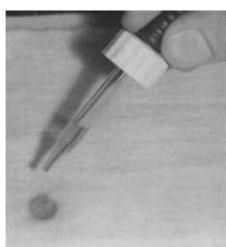


Asbjörn Fölling
describe la idiocia
fenilpirúvica en 1934

- Localización del defecto metabólico (Jervis, 1947)

Bickel restringe la ingesta de proteínas. Los casos de hermanos de PKU, se identificaban por el test del pañal (cloruro férrico). El test diagnóstico de cribado masivo fue finalmente la prueba del talón por Guthrie, cuantificando **por inhibición del crecimiento bacteriano por Phe**.

Eficacia del tratamiento dietético



Bickel, 1954
(<https://www.youtube.com/watch?v=Gln5o3eMtvM>)

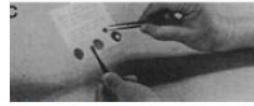
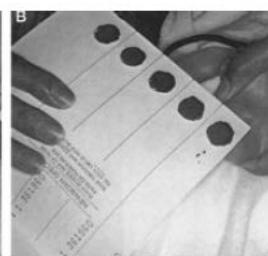
La adición de cloruro férrico a la orina en los PKU produce una mancha verde (test del pañal)



**Test diagnóstico para cribado masivo (Guthrie 1963)
Prueba del talón**



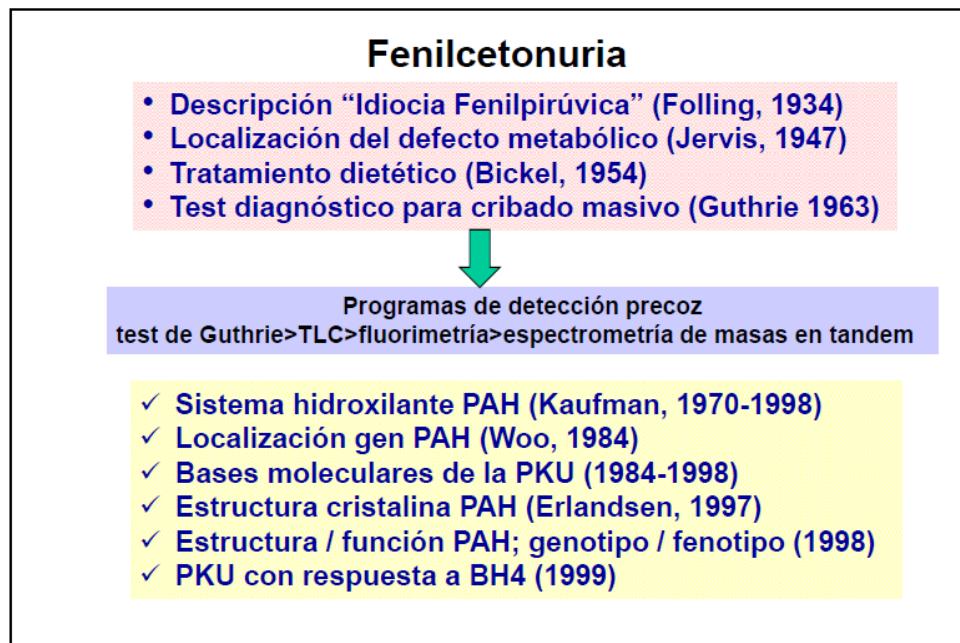
'phenisticx dipstick



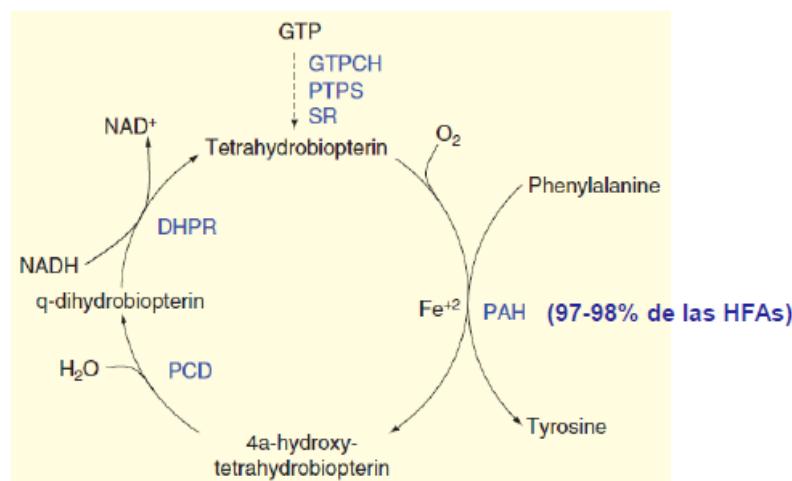
Test de Guthrie; inhibición del crecimiento bacteriano por Phe

Los pasos en el estudio de esta enfermedad han sido:

- Estudio del sistema hidroxilante
- Localización del gen de la PAH
- Bases moleculares de la PKU
- Estructura de la PAH, enzima causante de la enfermedad cuando está mutada
- Estructura y función de la PAH. Relación entre el genotipo y el fenotipo.
- PKU con respuesta a BH4



Mutaciones en la PAH representan la mayoría de las HPA (hidroxifenilalaninemias), pero para que la reacción ocurra es necesaria BH4. La BH4 ha de regenerarse, sintetizándose en las células por tres pasos por tres enzimas a partir de GTP y se regenera la forma reducida necesaria para la reacción de la PAH por otras dos enzimas.

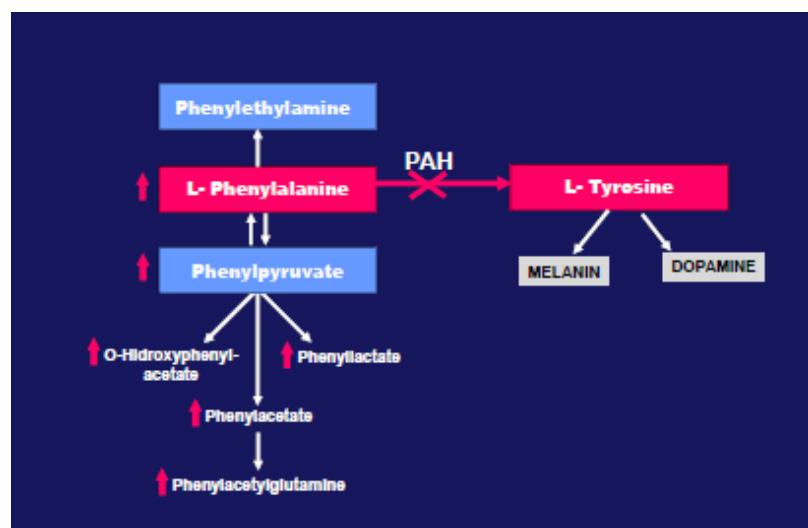


Tetrahidrobiopterina (BH4) : cofactor de la PAH. Los defectos en BH4 representan el 2-3% de las HFAs

Si no hay BH4, la reacción no se puede dar. Por lo tanto, **hay casos de hiperfenilalaninemias que son defectos en BH4**. La BH4 no solo es cofactor de la PAH, sino también de la triptófano hidroxilasa y tirosina hidroxilasa, que están en la ruta de síntesis de la dopamina y serotonina.

Bases

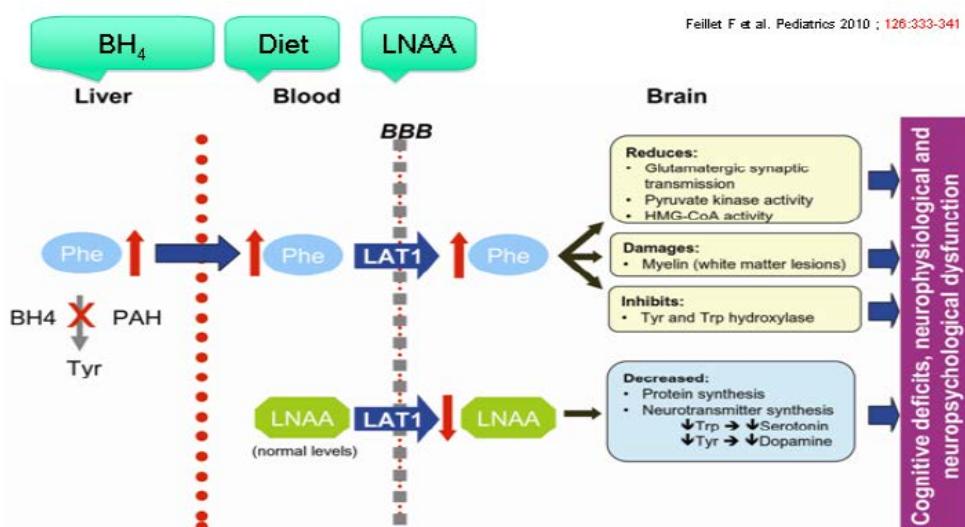
Se llama PKU por la **producción de fenilcetonas** (fenilpiruvato, fenillactato, fenilacetato y feniletilamina). Además, este paso es de Phe a Tyr, siendo un precursor de la síntesis de dopamina y melanina.



Cuando falla la PAH, también hay una **hipopigmentación**. La PAH es una enzima de expresión **exclusivamente hepática**. Esto causa un problema de desarrollo neurológico porque la Phe entra en el cerebro utilizando el transportador LAT1.

Ocurren dos cosas:

- Este transportador también es utilizado por otros aminoácidos, **por lo cual se dará un paso competitivo. Esto producirá una bajada en la síntesis de proteínas y neurotransmisores**. Es decir, el exceso de fenilalanina utilizando el transportador desplazará a los otros aminoácidos en mucha mayor medida, produciendo un déficit de los mismos en el SNC.
- Los niveles de Phe son tóxicos, interviniendo en mielinización, transmisión sináptica e inhiben las hidroxilasas.**



Parecería haber líneas de investigación donde se apunta a que los acúmulos de fenilalanina serían capaces de formar una especie de filamentos capaces de agregar y producir un daño neurológico activo.

Fenotipos de PKU

La fenilcetonuria, dependiendo de la mutación (si deja o no actividad residual) tiene un fenotipo variante. Hay un continuo desde formas más suaves a formas más severas. Las formas más severas tienen una Phe en plasma más elevada y las formas más suaves, menor nivel.

FENOTIPOS PKU

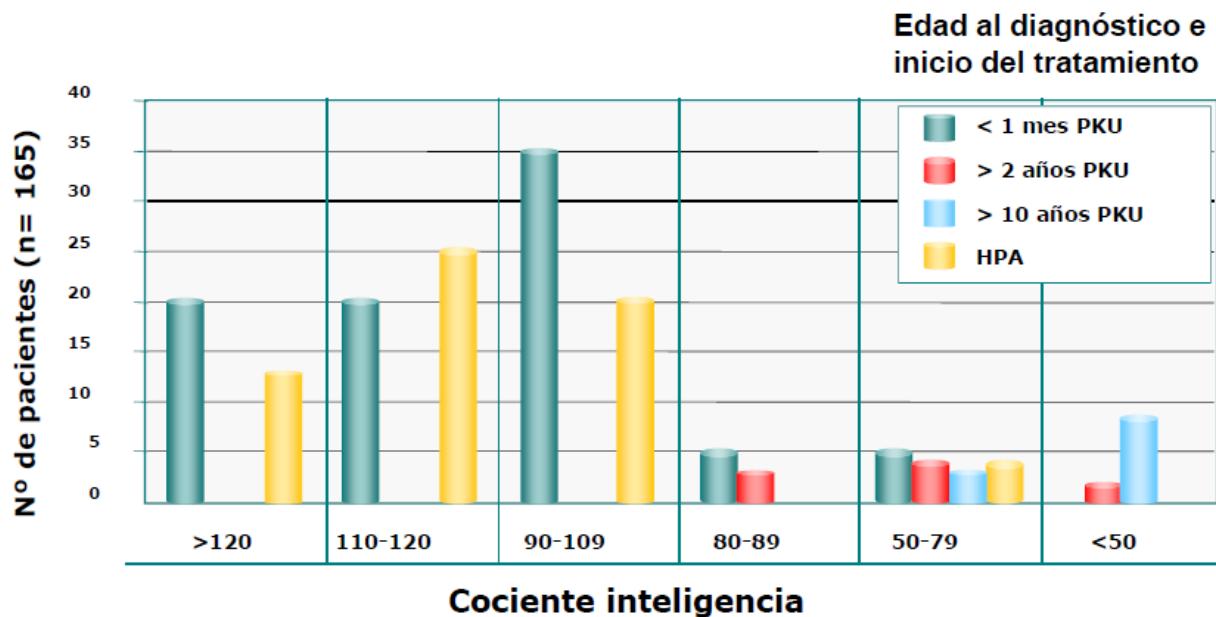
	<u>Phe plasma</u>	<u>Tolerancia Phe (mg/dia)</u>
PKU severa	1800 µM (30 mg/dL)	< 400
PKU moderada	1200-1800 µM (20-30 mg/dL)	400-500
PKU suave	600-1200 µM (10-20 mg/dL)	500-1000
HFA benigna	120-600 µM (2-10 mg/dL)	> 1000 (dieta normal)

La HFA benigna es una serie de defectos en PAH muy leve que tendrían una Phe alta y que pueden tomar dieta normal, porque los valores que tienen entrarían dentro de los tolerados para un desarrollo cognitivo normal. La tolerancia a la Phe define cuanta proteína puede tomar por día para mantenerse.

La dieta hay que mantenerla toda la vida, pues adultos que dejan la dieta tienen diversas alteraciones de comportamiento, problemas psiquiátricos, etc. Es muy eficiente, pero las dietas son muy estrictas. Hay que suplementar con todos los aa esenciales, sin embargo.

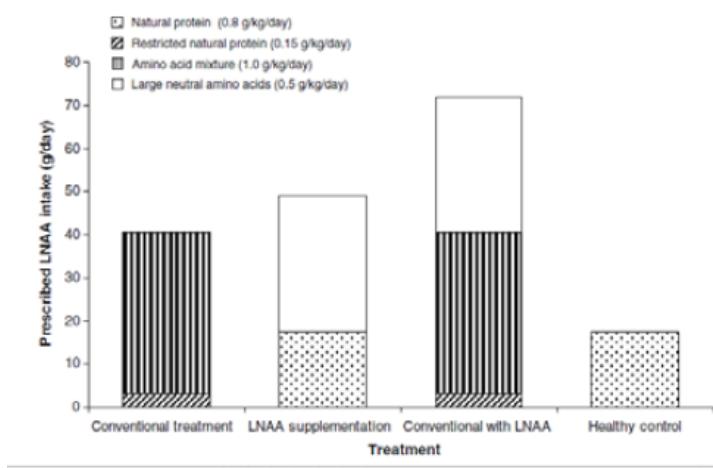
Se está investigando mucho el glicomacropéptido, una proteína natural carente de fenilalanina que podría ser utilizado como suplemento alimentario. La cantidad adecuada de fenilalanina en cada paciente es la que permite mantener los niveles de fenilalanina en concentraciones menores a 6 mg/dL, es decir, en su rango de tolerancia. El seguimiento es de por vida, viendo los niveles de fenilalanina en sangre, haciendo revisiones periódicas clínicas y evaluando el desarrollo psicomotor junto con el peso y talla.

El tratamiento dietético tiene gran éxito a la hora de prevenir el retraso mental cuando se inicia en la edad temprana, mientras que no tiene tanto éxito si el inicio del tratamiento es más tardío.

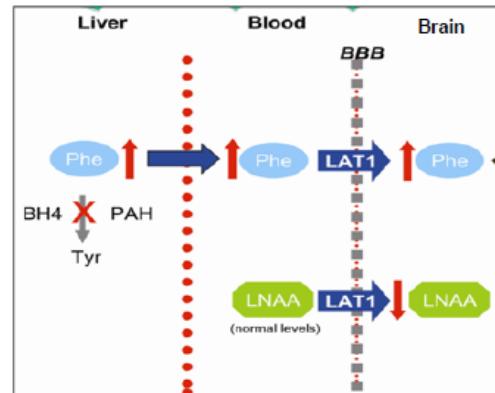


Un tratamiento novel en investigación podrían ser aumentar los niveles de suplemento de otros aminoácidos largos neutros. Esto pretendería:

- Disminuir los niveles de Phe en cerebro
- Aumentar niveles de LNAA en cerebro
- Aumentar síntesis de neurotransmisores como dopamina y serotonina
- Disminuir niveles Phe en sangre (se reduce la absorción intestinal)

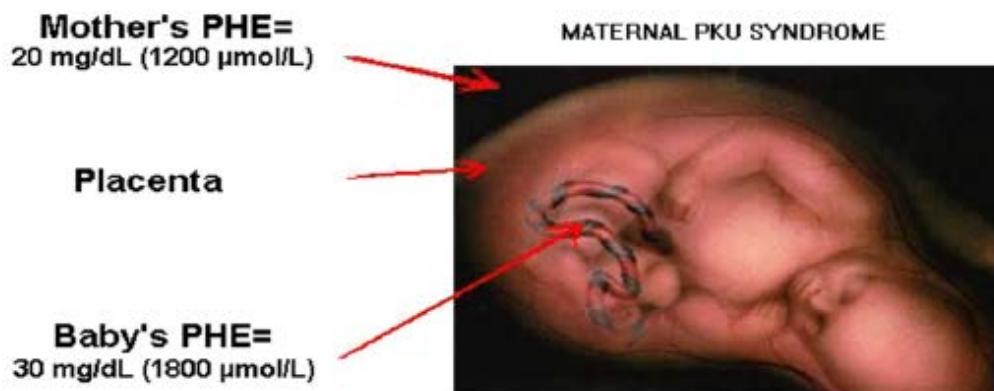


LNAA: tyr, trp, thr, met, val, ile, his



Hiperfenilalaninemia materna

Cuando la madre tiene niveles altos de Phe en sangre, se produce un gradiente transplacentario. En madres no tratadas, estos niveles altos de fenilalanina son nocivos para el feto. Esto depende de cómo de alta sea la fenilalanina, cuanto más alta, mayor porcentaje de esta fenilalanina.



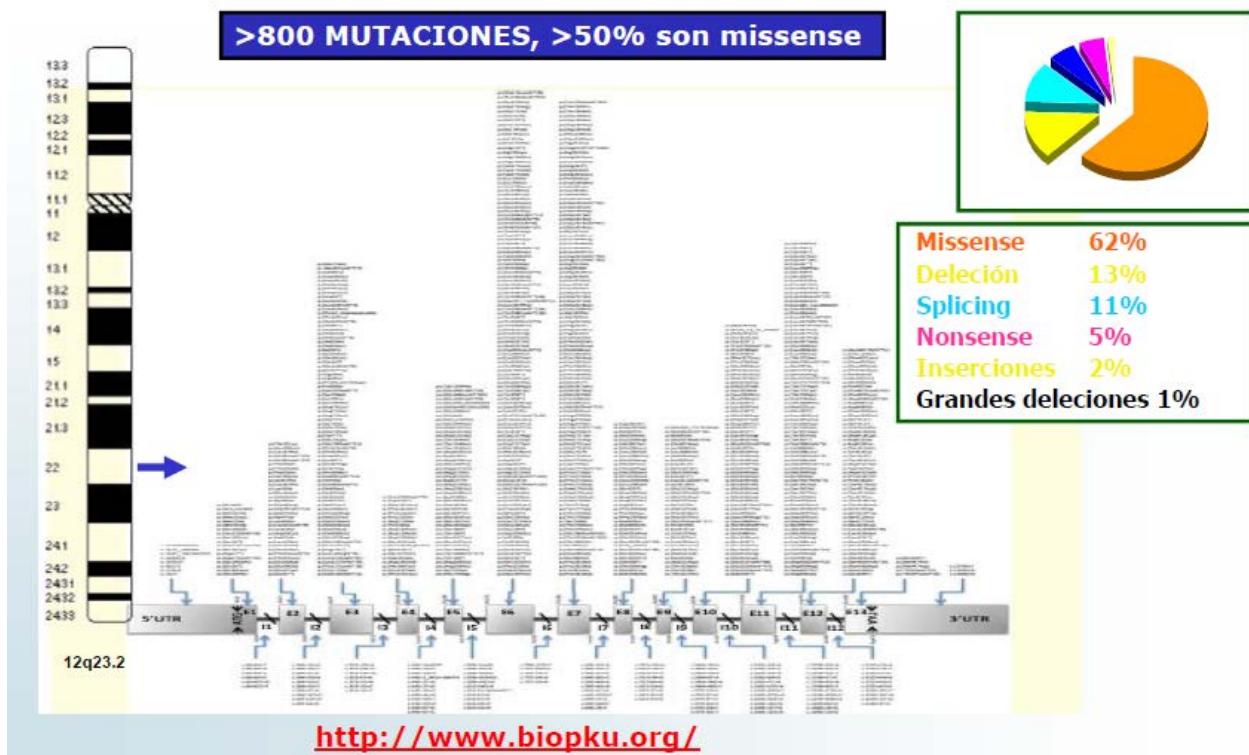
Las madres HFA pueden tener problemas con sus hijos, porque no siguen dieta y no están en seguimiento. Si no se controlan durante el embarazo, sus hijos pueden tener problemas como malformaciones.

HIPERFENILALANINEMIA MATERNA

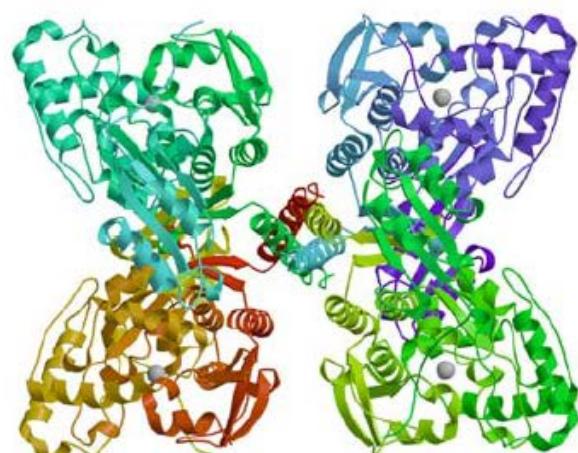
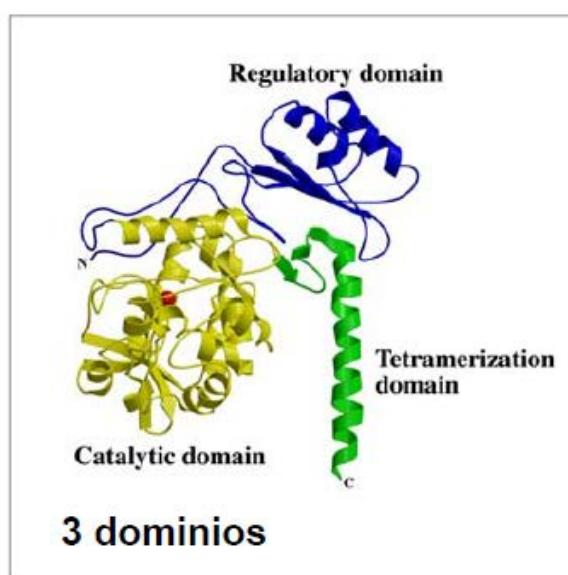
ANOMALÍAS en el recién nacido	FENILALANINA en sangre materna (mg/dL)				
	>20	15-20	10-15	2-10 HFA	<2 (NORMAL)
RETRASO MENTAL (%)	92	73	22	21	3
MICROCEFALIA (%)	73	68	35	24	5
CARDIOPATÍAS (%)	12	15	6	0	0.8
BAJO PESO AL NACER (%)	40	52	56	13	10

Bases moleculares

La enfermedad tiene una incidencia de 1/10.000 recién nacidos, siendo una enfermedad rara. Es muy heterogénea genéticamente, habiendo más de 800 mutaciones descritas.



La mayoría de estas mutaciones es de tipo miss-sense. La proteína activa es un tetrámero, con cada monómero con un dominio catalítico y un dominio de tetramerización que interaccionan entre sí para formar el tetrámero activo. Se regula por L-Phe, activándose y teniendo una cooperatividad positiva. La BH4 actúa en su inhibición y estabilización. Por otro lado, se regula por fosforilación activadora en la serina 16, que sinergiza con la activación por L-Phe.

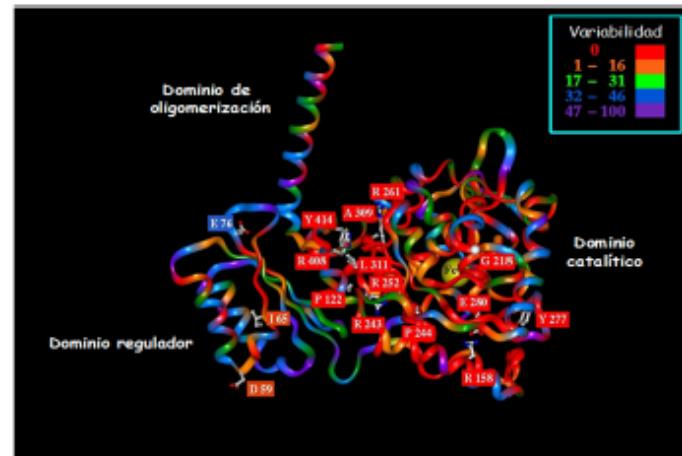
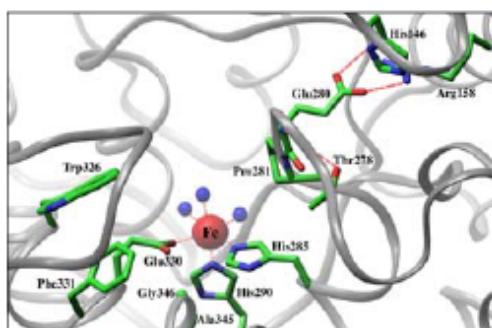


La forma activa es un tetrámero

La mayoría de las mutaciones son cambios de un aminoácido por otro. Muy pocas en el centro activo, la mayoría está **afectando al plegamiento de las proteínas**. Las mutaciones de tipo miss-sense están afectando a la estructura de la proteína, es decir, afectan al **proceso de que la proteína se pliegue directamente a la estructura nativa de la proteína**.

Localización de las mutaciones PKU (missense)

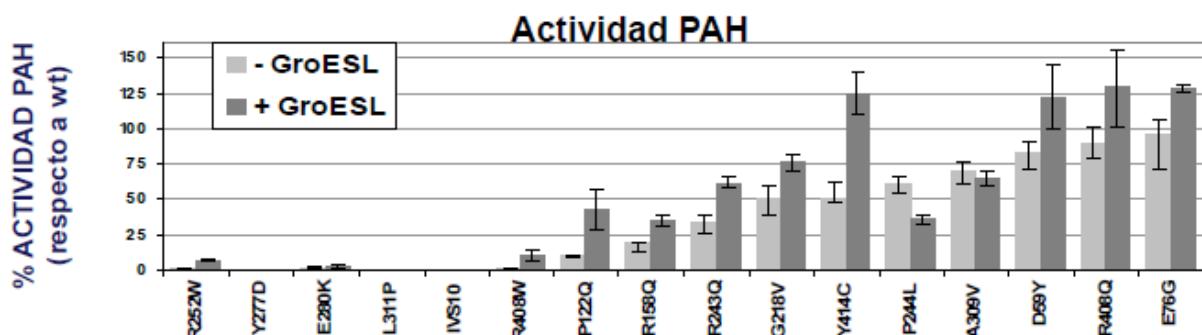
Muy pocas se localizan en el centro activo



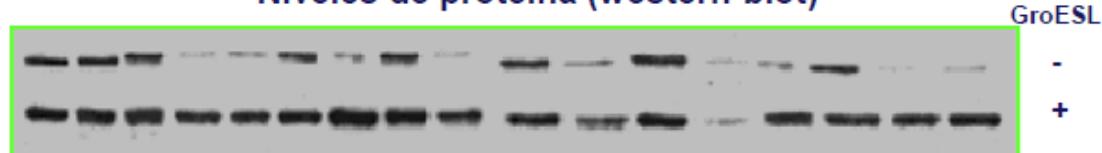
- La mayoría afectan a residuos muy conservados en el dominio catalítico, fuera del centro activo
- Son mutaciones de “folding”, importantes para el plegamiento y mantenimiento de la estructura de la proteína

Esto es importante por las terapias. Se ha descubierto que cuando se expresaban *in vitro* esas proteínas, se produce una menor cantidad de proteína y se degrada.

In vitro, se ve cómo si se coexpresa la chaperonina bacteriana, recuperamos la cantidad de proteínas y aumenta la actividad. Son así mutaciones de folding, siendo causa de enfermedades conformacionales.



Niveles de proteína (western-blot)



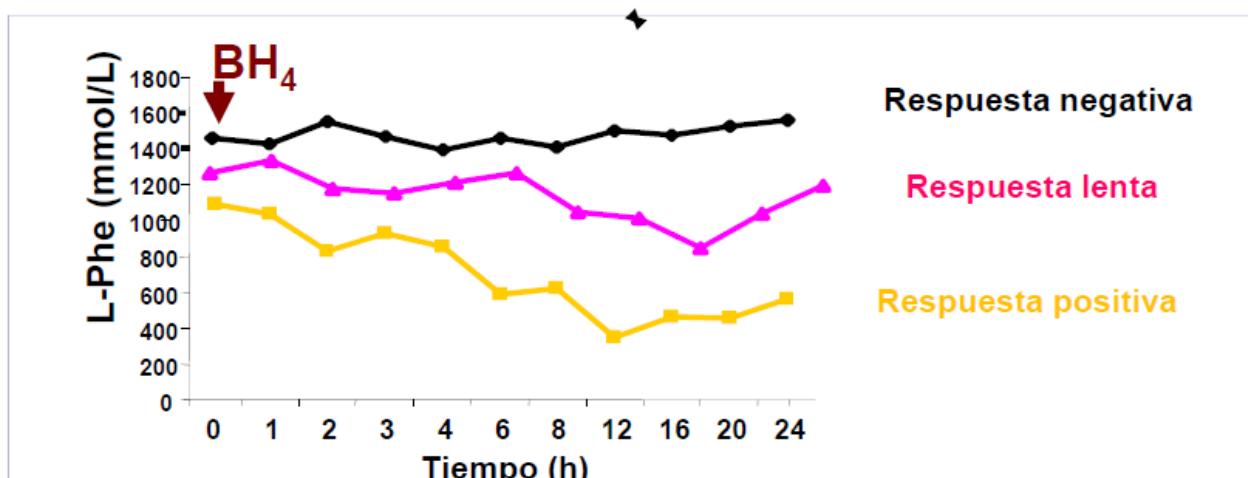
MUTACIONES DE FOLDING

- Actividad/niveles de proteína/tetrámero reducidos
- Degradación acelerada, mayor inestabilidad térmica
- Se rescata proteína y actividad con chaperonas, demostrando que son mutaciones de plegamiento

Si consiguiéramos plegarlas correctamente, recuperaríamos algo de actividad. Hoy en día, los PKU no sólo se tratan con dieta, sino también con BH4. El cofactor al unirse a la PAH ayuda al plegamiento, estabilizando la estructura, siendo una chaperona farmacológica. Un 30% de los pacientes son tratables.

Se están buscando otros compuestos químicos que funcionen como chaperonas farmacológicas.

En Japón, dieron BH4 a pacientes fenilketonúricos y midieron los niveles de Phe. Vieron cómo un grupo de pacientes tenían niveles de Phe más bajos. Hasta un 30% de los pacientes responden.



Sólo en algunos casos las mutaciones afectan al sitio de unión de BH4 y si echamos exceso compensamos. En la mayoría, la BH4 está actuando como chaperona promoviendo o facilitando el plegamiento correcto de la proteína.

Se están buscando otras chaperonas farmacológicas:

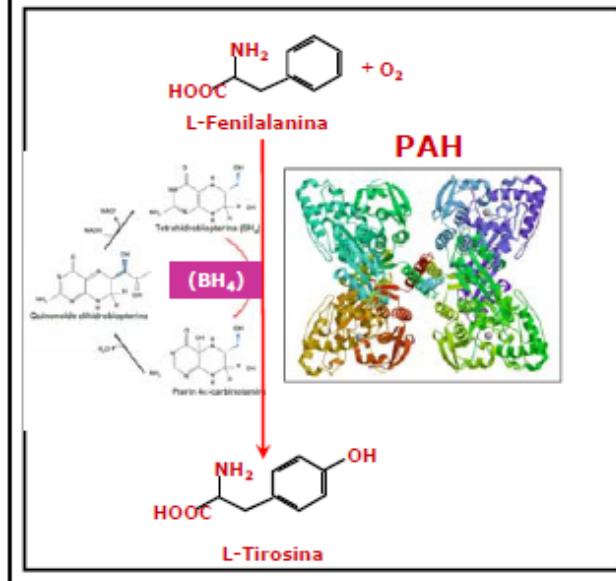
- Por screenings de librerías de compuestos químicos. 10.000 compuestos p.ej.
- Análogos de BH4. Chaperonas parecidas a concentraciones bajas.

Otras terapias son:

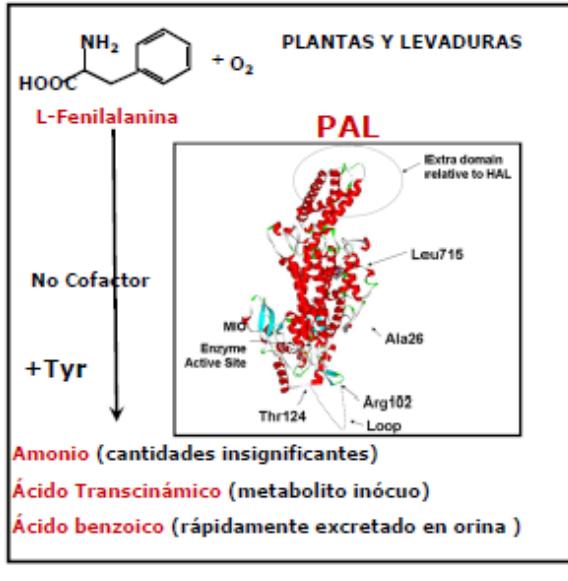
- **Reemplazo enzimático.** La PAH es un tetrámero, precisa el cofactor... Es complicado.
- **Sustitución enzimática.** Se sustituye la PAH por una enzima capaz de metabolizar la Phe. Usado la PAL, fenil alanina amonio liasa, que rinde: ácido transcinámico, amonio y ácido benzoico. Es monomérica y no precisa cofactor. Haría falta suplementar con tirosina en esta aproximación.

TERAPIA ENZIMÁTICA EN PKU

REEMPLAZO ENZIMÁTICO PAH humana



SUSTITUCIÓN ENZIMÁTICA Fenilalanina amonio liasa(PAL)

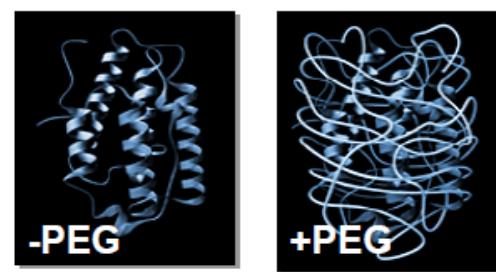


Se suministra con polietilenglicol para recubrir y tapar los determinantes antigenicos y estabilizar. La **PEGILACIÓN** debería ir hacia **disminuir la inmunogenicidad por mutagénesis y un sitio de pegilación definido**.

PEGILACIÓN

Unión covalente de derivados del polietilen glicol para mejorar y prolongar el efecto de la molécula terapéutica

- Reducir inmunogenicidad
- Aumentar la estabilidad



PAL ENGINEERING:

Modificación química o evolución dirigida por mutagénesis para producir una molécula funcional más estable con inmunogenicidad reducida y sitios de pegilación definidos

Se están investigando **PAL orales**, mediante screenings high-throughput de PALs que sean resistentes a proteasas. Modificación de la proteína mediante PEGylación, modificación química o hidrogeles podrían aumentar y mejorar la resistencia a proteasas.

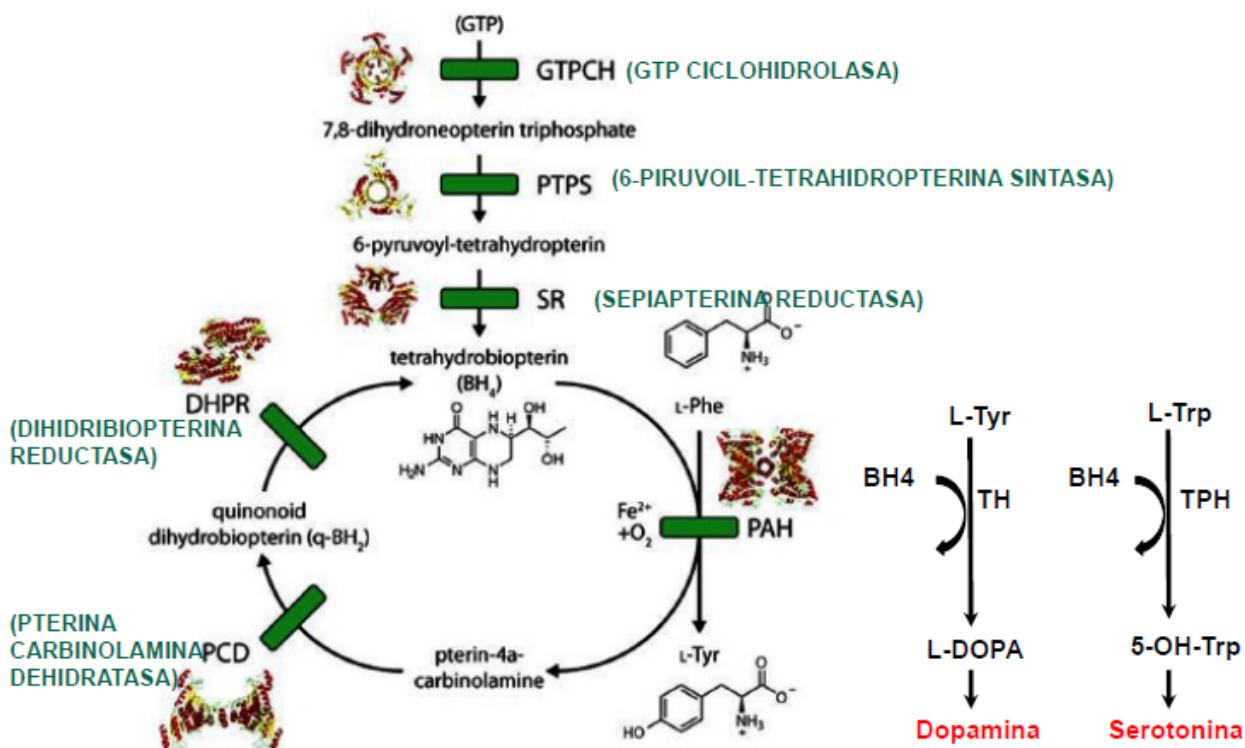
Otras causas de HPA

Son los llamados **defectos de BH4** normalmente, aunque **DNAJC12** (una chaperona) también puede ser diana de mutaciones. El fenotipo y tratamiento de los defectos de BH4 son diferentes a los de la fenilcetonuria.

La BH4 se sintetiza a través de la GTP por:

- **GTP-ciclohidrolasa**
- **6-piruviol BH4 sintasa**
- **Sepiapterina reductasa**

BIOSÍNTESIS Y REGENERACIÓN DEL COFACTOR BH4



La serotonin interviene en:

- Control de la temperatura corporal, presión sanguínea, secreción endocrina, apetito, comportamiento sexual, movimiento, emesis, dolor

La dopamina interviene en:

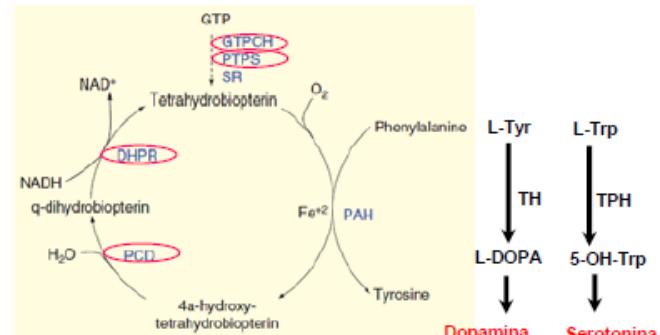
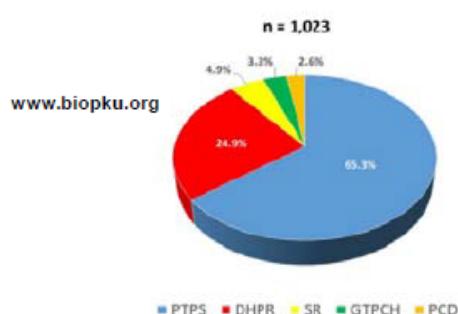
- Emoción, actividad, comportamiento, conducción nerviosa, liberación de hormonas (prolactina), movimiento, procesos cognitivos (memoria, atención)

Defectos de BH4 que cursan con hiperfenilalaninemia

Se componen de defectos de la GTPCH (mutaciones autosómicas recesivas), PTPS y DHPR.

Los síntomas neurológicos comienzan a ser **defectos del movimiento junto con otra pléthora de síntomas (retraso mental, distonía, hipertermia, estrabismo, microcefalia...)**. También se da HPA. Sólo hay dos enzimas de síntesis que están implicadas y una de reciclaje. El paso de la SR da lugar a déficit neurológico (no hay vía alternativa como en otros tejidos).

Se trata **con BH4 en hígado y cerebro**. Se dan también **los precursores de dopamina y serotonina, L-DOPA y 5-OH triptófano**.



Def. en PCD: hiperfenillaninemia transitoria, sin síntomas clínicos

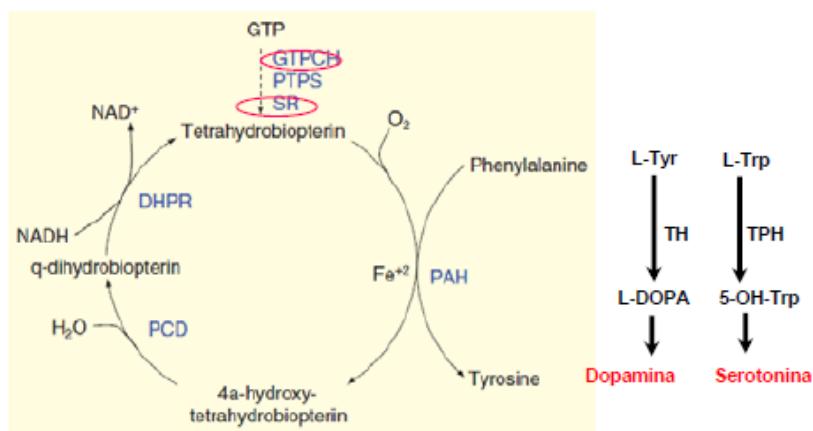
Hay formas suaves en los cuales se puede producir algo de BH4. Como las Kd para la BH4 en las distintas hidroxilasas difieren, si la deficiencia de BH4 es baja, pueden haber actividad.

Defectos de BH4 sin hiperfenilalaninemia

Los defectos de BH4 sin HPA se dan por SR y GTPCH (esta última con forma dominante). Los síntomas clínicos son **distonías, parkinsonismo, fluctuación diurna de los síntomas, desarrollo intelectual normal**.

Son distonías que presentan respuesta a DOPA, pues responden muy bien al tratamiento con esta.

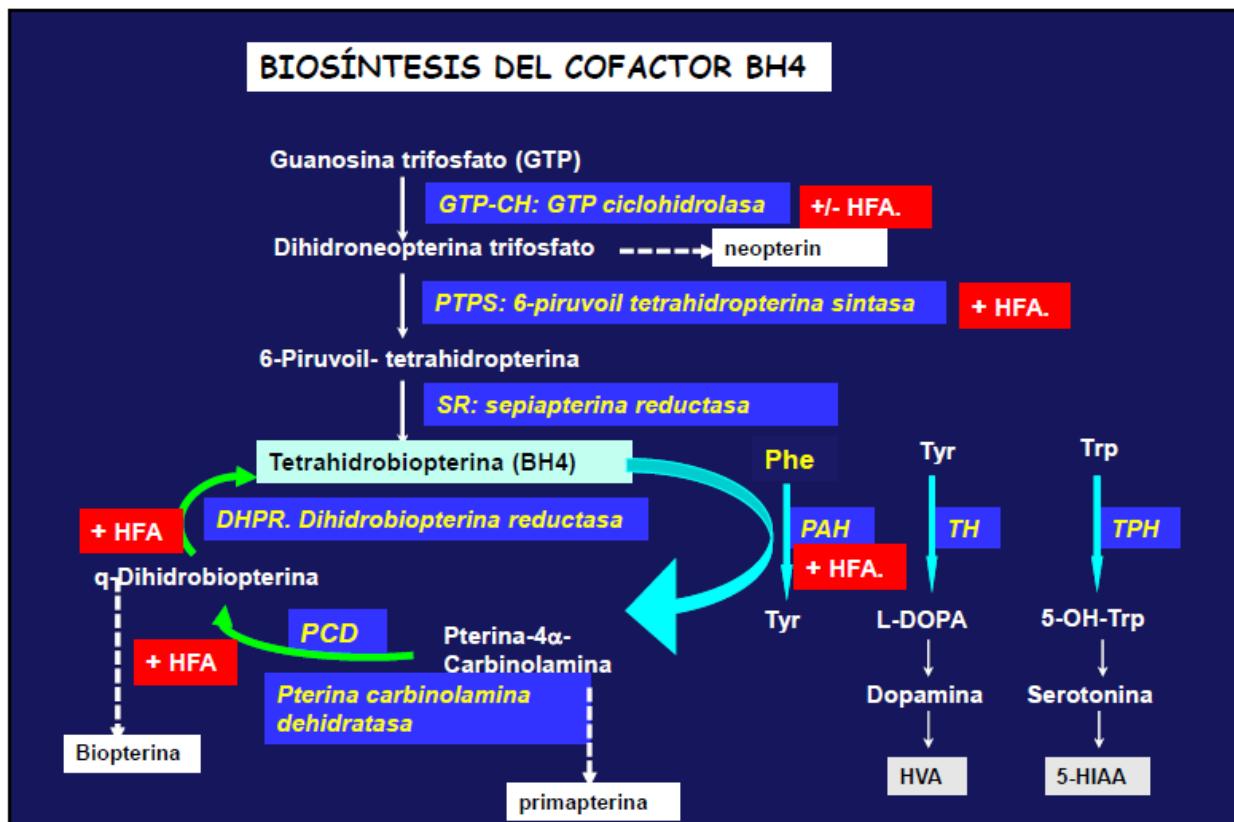
DEFECTOS DE BH4 SIN HFA (GTPCH forma AD, SR)	Distonia con respuesta a DOPA (junto con deficiencia en TH)
<p><u>Síntomas clínicos</u></p> <ul style="list-style-type: none">•Distonía•parkinsonismo•Fluctuación diurna de los síntomas•Desarrollo intelectual normal	<p><u>Tratamiento</u></p> <ul style="list-style-type: none">• L-Dopa/carbidopa



Diferenciación

Se hace un diagnóstico diferencial bioquímico. Como en todos los pasos enzimáticos, se acumula lo que está por arriba y disminuye lo que está downstream. En el laboratorio se miden **neopterina**, **primapterina** y **biopterina**.

- La acumulación de **neopterina** implica defectos en la **PTPS**, pues deriva de la dihidroneopterina trifosfato
- La acumulación de **primapterina** implica defectos en la **PCD**, pues proviene de la **pterina-4 α -carbinolamina**
- La acumulación de **biopterina** implica defectos en la **DHPR**, pues proviene de la **dihidrobiopterina**



Se hace un análisis de pterinas y esto nos dicen el paso donde está parado. Todos los defectos en BH4 tienen aumentos en los HVA y los 5-HIAA bajos, pues son productos de degradación de la dopamina y la serotonina que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo. Combinando un análisis de pterinas, neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo se puede mapear el origen del defecto.

Para el diagnóstico:

- Phe alta y Tyr baja
- Medir pterinas y actividad de DHPR.
 - pterinas normales → defectos de PAH o DNAJ
 - pterinas altas → do the maths
- Medir en CSF 5HIAA y HVA.

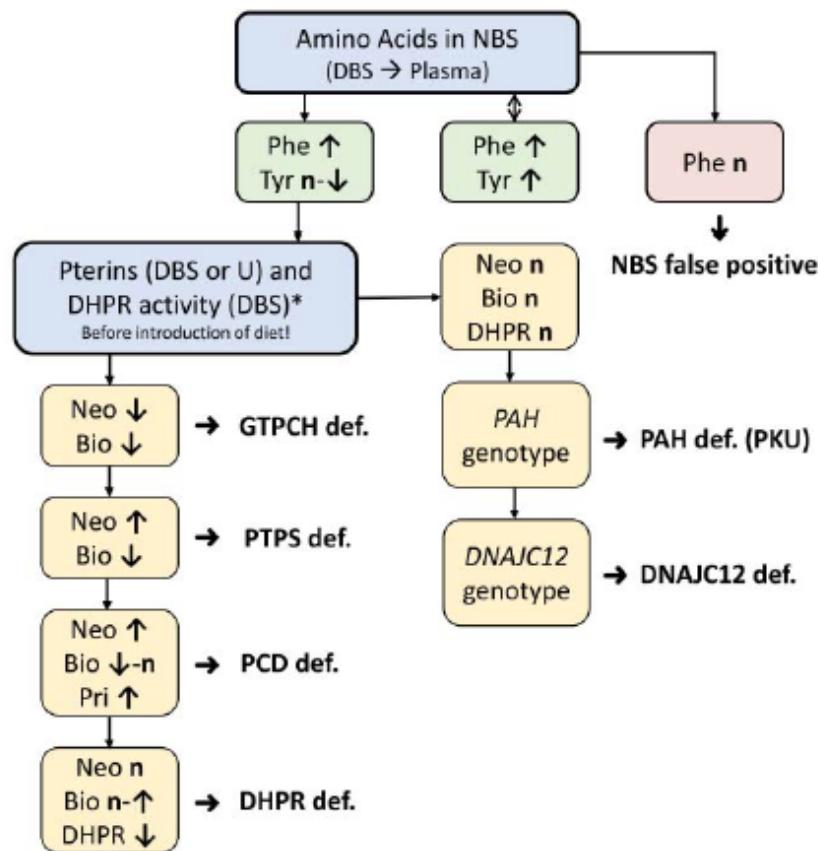


Table 2 Inherited disorders of BH₄ metabolism and biochemical markers for differential diagnosis

↑, elevated; ↓, lowered; 5HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; Bio, biopterin; HVA, homovanillic acid; n, normal; Neo, neopterin; OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man; Phe, phenylalanine; Pri, primapterin (7-biopterin); Sep, sepiapterin.

Disease	OMIM number	Blood	Urine			Cerebrospinal fluid					
			Phe	Neo	Bio	Pri	Neo	Bio	Sep	5HIAA	HVA
GTPCH deficiency (autosomal recessive)	233910	↑	↓	↓	n	↓	↓	n	↓	↓	n
PTPS deficiency	261640	↑	↑	↓	n	↑	↓	n	↓	↓	n
PCD deficiency	264070	↑	↑	n-↓	↑	n	n	n	n	n	n
DHPR deficiency	261630	↑	n	n-↑	n	n	↑*	n	↓	↓	↓
GTPCH deficiency (autosomal dominant; DRD)	128230	n	n	n	n	↓	↓	n	n-↓	↓	n
SR deficiency	612716	n	n	n	n	n	↑*	↑	↓	↓	n

*7,8-dihydrobiopterin

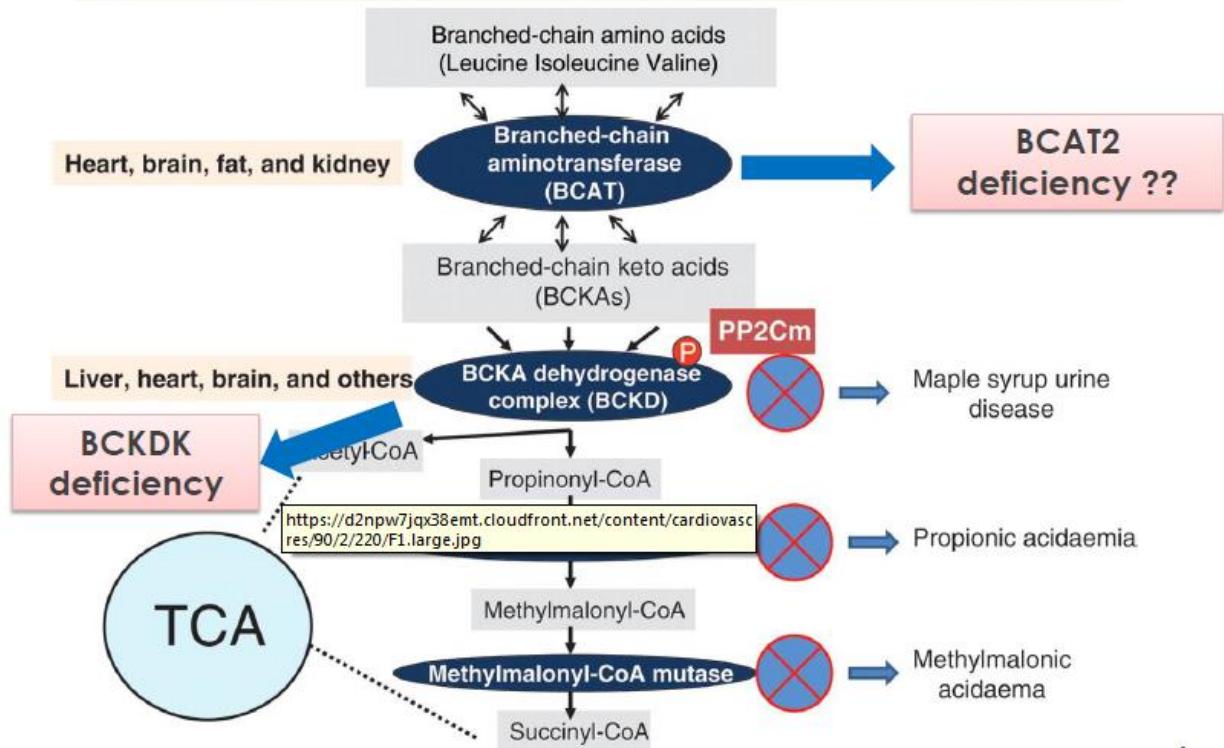
Es imprescindible realizar el diagnóstico diferencial en todos los casos de hiperfenilalaninemia detectados en el cribado neonatal, para diferenciar entre los defectos de Biopterna y la deficiencia de PAH.

Es necesario determinar pterinas y derivados de dopamina y serotonina en líquido cefalorraquídeo en aquellos pacientes con problemas neurológicos de causa no aclarada para descartar un defecto en el metabolismo de la biopterna

Bases Moleculares de la Patología II

MSUD y relacionadas – 15-03-2019

Catabolism of branched-chain amino acids



1

Metabolismo de aminoácidos ramificados

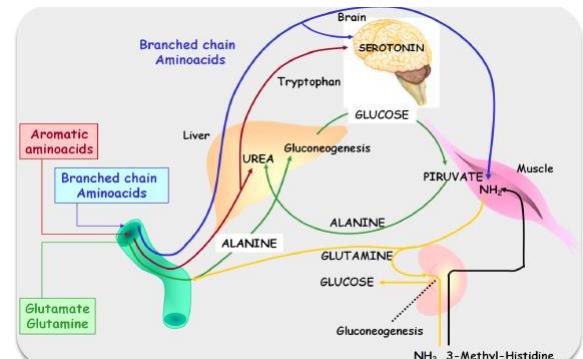
Valina, leucina e isoleucina son **aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas**. En mamíferos, son **aminoácidos esenciales** que constituyen entre el 20-40% de las proteínas de la dieta y suponen el 60% de los aminoácidos en sangre tras la ingestión.

Su catabolismo es **muy activo en el hígado, riñón, músculo y cerebro**, donde son utilizados como fuente de energía. Una parte importante de los aminoácidos absorbidos en el intestino delgado bypassea el hígado hacia otros tejidos, incluido el **cerebro**.

El tejido adiposo y el músculo utilizan el acetil-CoA procedente de la degradación de la leucina para generar **ácidos grasos y colesterol**.

Alteraciones en su catabolismo causan **patologías importantes**, por lo que su homeostasis ha de ser **importante para la vida**. Pueden producir alteraciones cognitivas, cardiológicas, etc.

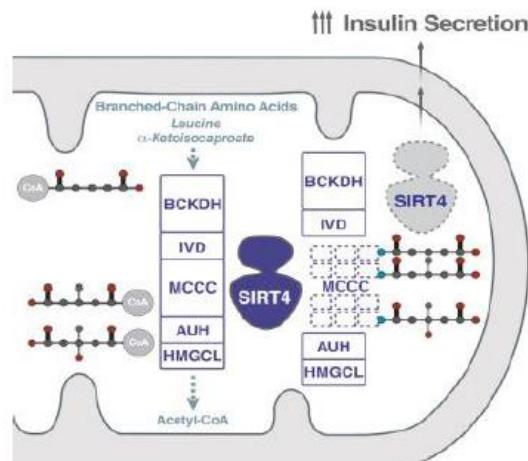
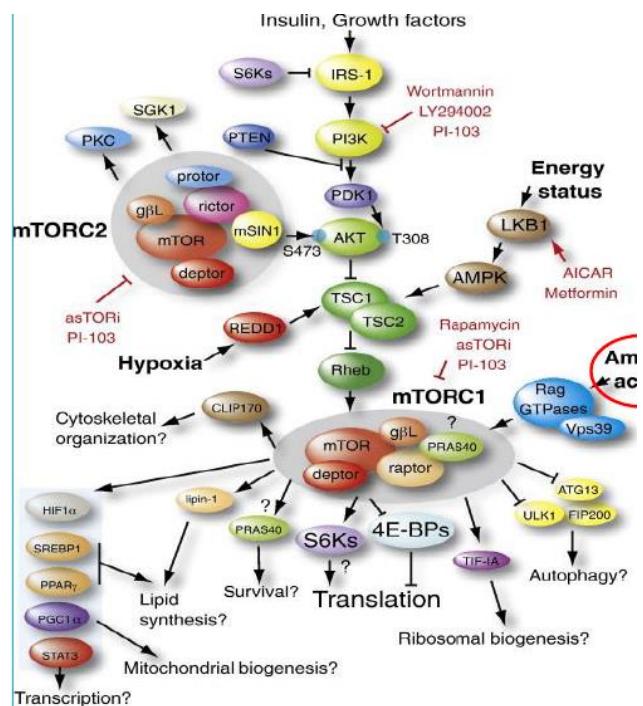
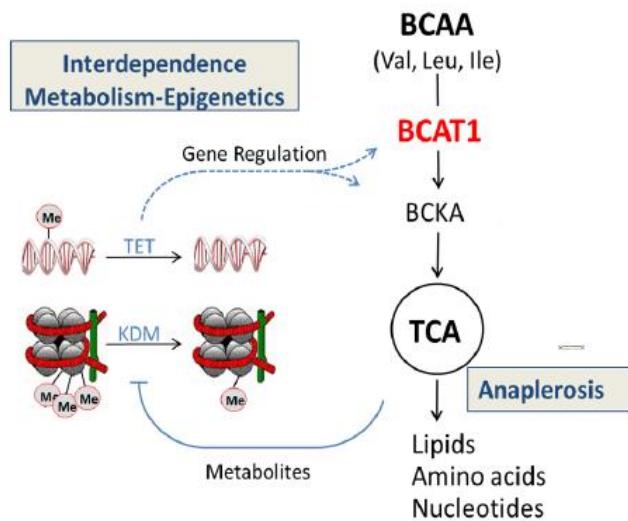
A parte de poder ser utilizados como fuente de energía o de nitrógeno para la síntesis de nuevos aminoácidos, los **aminoácidos ramificados tienen un papel como señalizadores**. Constituyen un nexo entre los nutrientes y la señalización celular.



- Los aminoácidos pueden **modificar la activación de las Rag GTPasas**
- Parece que un **aumento de los niveles de leucina** causa un **aumento en la señalización por mTORC**, lo cual está relacionado con un **aumento en la biogénesis de la mitocondria** y con un **aumento de la resistencia a la insulina**.

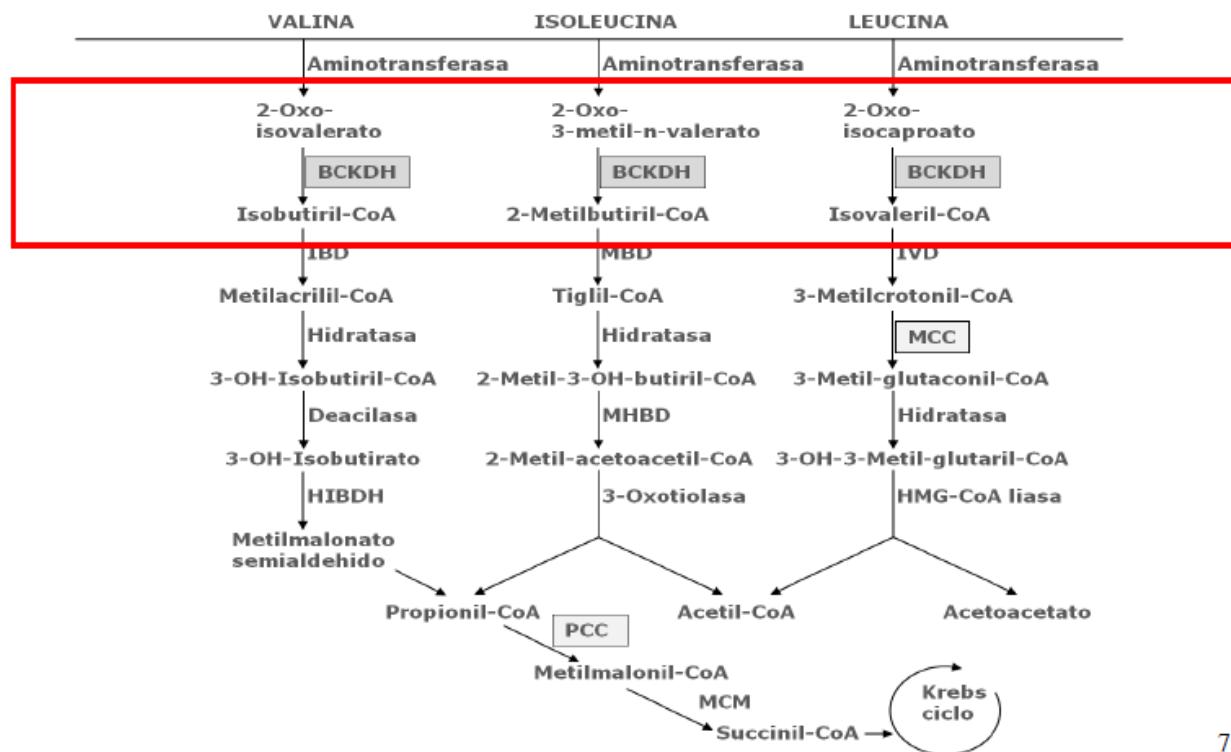
Además, los aminoácidos ramificados están **relacionados con modificaciones epigenéticas**. En la ruta de degradación de la leucina, se producen metabolitos capaces de **modificar la expresión de proteínas** que participan en la regulación de la propia ruta de degradación.

Además, parece estar implicada la expresión de **Sirtuinias** y la regulación de la respuesta a insulina.



Complejo multienzimático BCKD y enfermedad

Defectos en el metabolismo de los aminoácidos ramificados **causarán enfermedades serieas**, dado que al tratarse de aminoácidos esenciales, **la única forma de controlar su concentración en el metabolismo es mediante su degradación.**



7

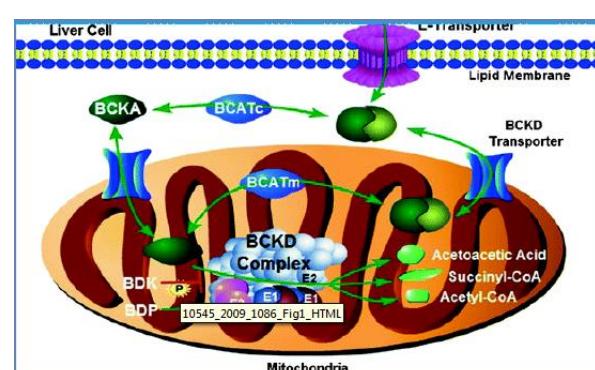
Cada aminoácido ramificado tiene una ruta diferente de degradación.

- La **valina** da lugar a **propionil-CoA**, siendo un aminoácido gluconeogénico.
- La **isoleucina** da lugar a **propionil-CoA y acetil-CoA**, siendo un aminoácido **mixto**.
- La **leucina** da lugar a **acetil-CoA y acetoacetato**, siendo un aminoácido **cetogénico**

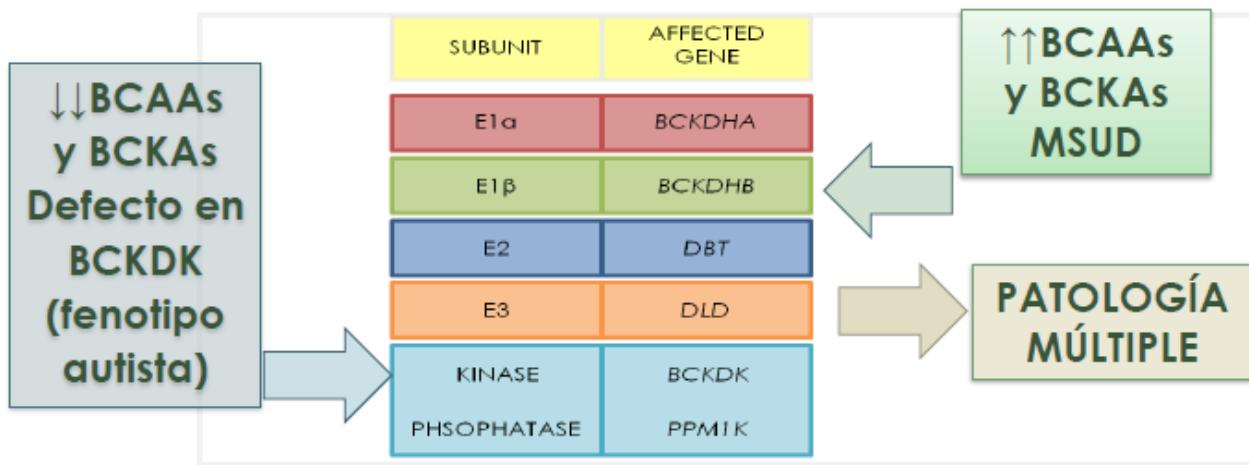
El punto común de control de todas las rutas es el complejo **α -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa**, que se piensa que regula el flujo de las vías.

Los aminoácidos ramificados entran en la célula por un transportador independiente de sodio de tipo L, **desde donde entrarán a la mitocondria para ser procesados.**

Se ha visto que diferentes patologías que afecten al complejo causarán distintos patrones metabólicos. El no fucionamiento del complejo no solo causará un aumento de aminoácidos ramificados en sangre, **sino también un aumento de los α -cetoácidos correspondientes mediante reacciones de transaminación con el glutamato.**

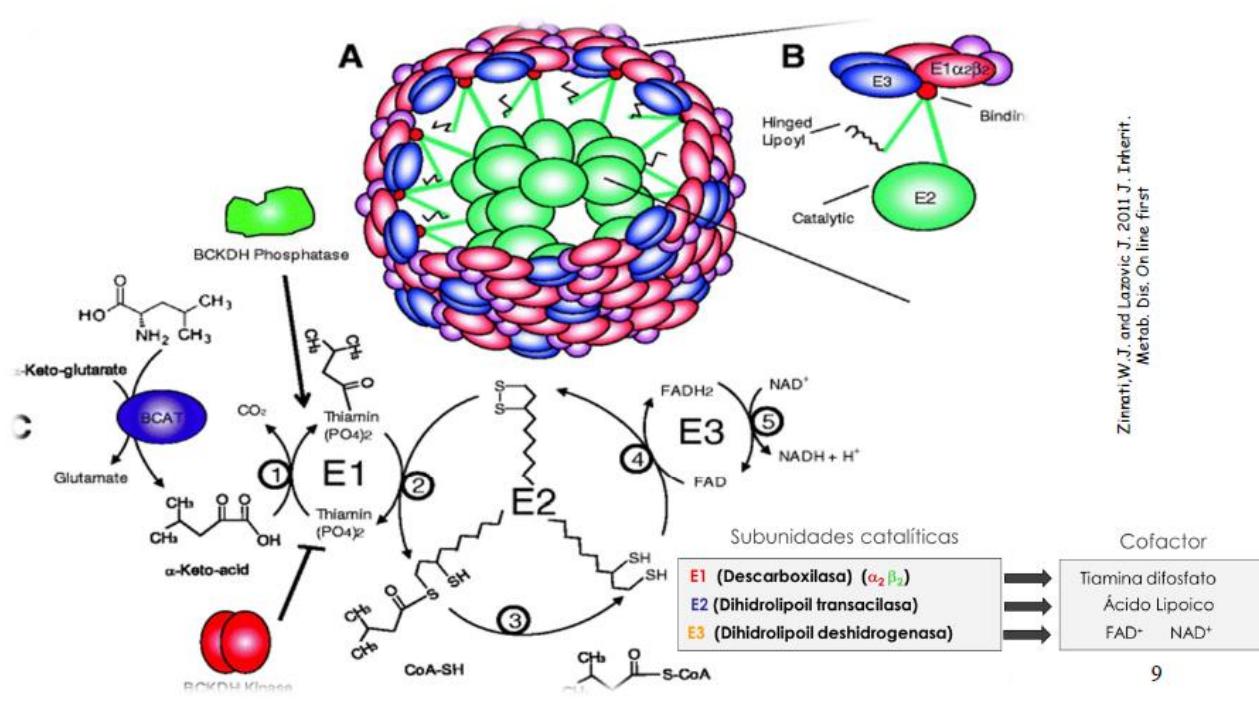


Anteriormente, se pensaba que era un aumento de los niveles de aminoácidos ramificados lo que resultaba tóxico, pero es la **alteración de sus niveles lo que resulta patológico**. Se han detectado casos en los que se detecta una **disminución en la concentración de los aminoácidos y α -cetoácidos**, relacionados con ciertos tipos de autismo.



Otras patologías complejas que se han relacionado con el metabolismo de aminoácidos ramificados son la **diabetes de tipo II**, **patologías cardiovasculares**, **enfermedad hepática crónica**, **cáncer...**

El complejo BCKD tiene un funcionamiento similar a la **piruvato deshidrogenasa**, y comparte con ella la subunidad E3. Está formado por **múltiples copias** de las subunidades E1 α y E1 β , E2 y E3, con los cofactores **tiamina**, **ácido lipóico**, **FAD**, **NADH** y **CoA**. Alteraciones en cualquiera de estos componentes podría causar la **patología**, lo cual amplía mucho las posibles causas de enfermedad.



El complejo BCKD está **regulado por fosforilación**:

- Una quinasa lo fosforila, **inactivándolo**
- Una fosfatasa lo defosforila, **activándolo**

Dicha fosforilación se produce sobre la **subunidad E1 α** , en el **residuo S292**. Alteraciones en la quinasa que cataliza esta reacción también podrían ser causa de enfermedad.



La subunidad E3 es común a otros complejos multienzimáticos mitocondriales.

- Piruvato deshidrogenasa
- α -cetoglutarato deshidrogenasa
- Complejo escisor de la glicina, deficiente en la hiperglicinemia no cetósica

Defectos en esta enzima afectará a todos los complejos, causando una enfermedad más compleja con un mayor número de efectos. De la misma manera, defectos en la síntesis de todos los cofactores afectarán a una gran cantidad de vías metabólicas (por ejemplo, el ácido lipoico tiene una síntesis mitocondrial y defectos en su biosíntesis dará lugar a enfermedades con defectos múltiples).

¿PODRÍAN EXISTIR DEFECTOS MÚLTIPLES, ES DECIR QUE AFECTARAN AL FUNCIONAMIENTO DE TODOS LOS COMPLEJOS?

Dichos complejos también comparten coenzimas comunes

Ácido lipoico, es común a los cuatro
Tiamina solo en PDH, α -KGDH y BCKD

Por otro lado, defectos en las enzimas E1 y E2 causarán defectos específicos de la ruta en la que participan, pues son propias a cada complejo multienzimático.

Enfermedad de jarabe de arce (MSUD)

La enfermedad de la orina con olor a Jarabe de Arce (MSUD, en inglés,) es una alteración autosómica recesiva rara del catabolismo de los aminoácidos ramificados. Está causada por la deficiencia de alguna de los componentes catalíticos del complejo de la BCKD. Puede estar producida por mutaciones en cualquiera de los componentes, excepto de la subunidad E3.

El bloqueo del complejo, resulta en una acumulación de α -cetoácidos de cadena ramificada y sus correspondientes aminoácidos en todos los tejidos y fluidos corporales.

Los pacientes afectados tienen alteraciones neurológicas que incluyen edema cerebral y atrofia, cuya patofisiología no está completamente establecida aún. La incidencia media mundial de MSUD es de 1 en 185.000 nacimientos, pero:

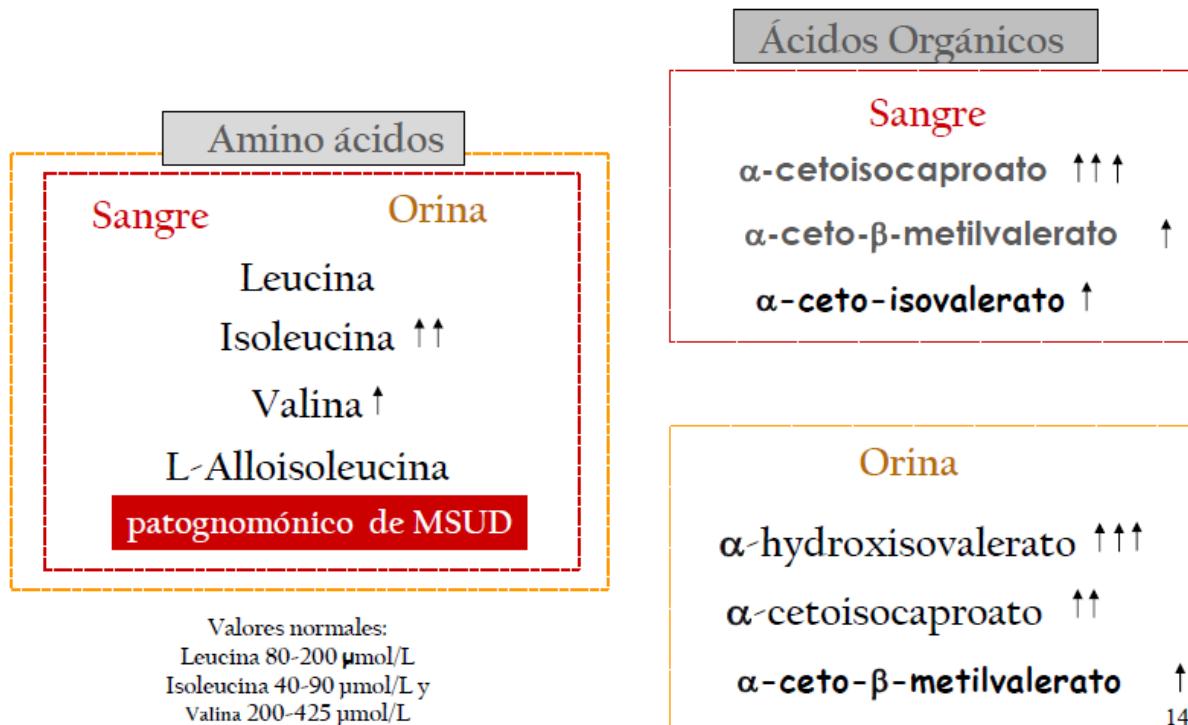
- En España, la incidencia está en torno a 1:40.000 nacimientos
- En un grupo de Menonitas en USA se llega a valores de 1 en 176 nacimientos, debido a un alto grado de endogamia.

Su detección está dentro del cribado neonatal, al poderse detectar gracias a los aumentos en los aminoácidos ramificados en sangre. Tiene tratamiento, basado en la dieta. Hay que tener cuidado con la eliminación de la dieta de aminoácidos ramificados, debido a que si se realiza en exceso puede causar problemas en el crecimiento y en el sistema inmune.

Firma metabólica de la enfermedad

Los pacientes con orina con olor a jarabe de arce **son detectados en el cribado neonatal debido a que presentan altos niveles de aminoácidos ramificados en sangre y orina**. Especialmente, además, presentan **niveles elevados de L-alloisoleucina en sangre**, una alteración específica de los enfermos de MSUD.

Esta se produce al poder producirse otras descompensaciones del metabolismo que también cursan con un aumento en los niveles de aminoácidos ramificados.



Por otro lado, también podrán detectarse en sangre y orina los α -cetoácidos correspondientes de los aminoácidos ramificados, oxidados o reducidos (en este último caso, por el riñón).

Fenotipo clínico y bioquímico

Se pueden diferenciar **cinco fenotipos clínicos de MSUD**:

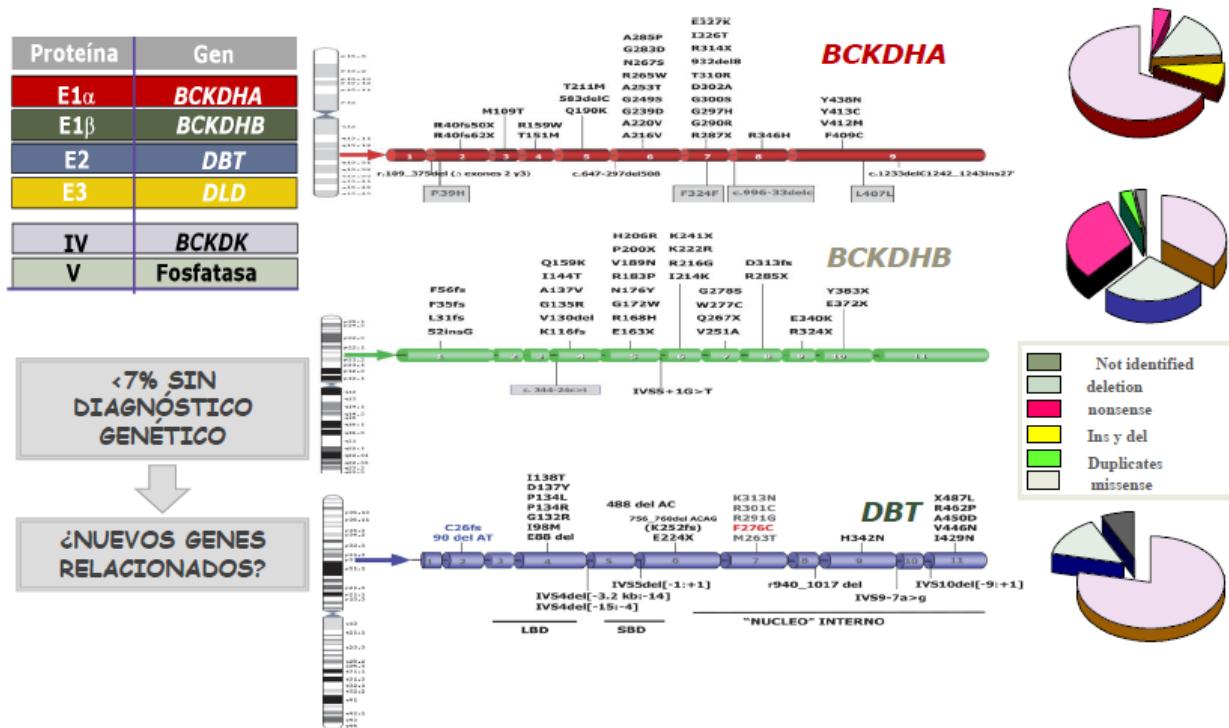
- **Fenotipo clásico.** Es la forma **más grave**, afectando al **70% de los pacientes**.
 - Tiene una presentación **neonatal**, con síntomas típicos de patología de tipo **intoxicativo agudo**. Presentan **vómitos, letargias, hiper o hipotonía, cetoacidosis, convulsiones...**
 - Los síntomas en sí mismos son **muy poco específicos**.
- **Fenotipo intermedio.** Debuta más tarde. Se caracteriza por **problemas respiratorios, cetoacidosis leve y un retraso en el desarrollo**.
- **Fenotipo intermitente.**
 - Los síntomas aparecen **asociados a infecciones o a cambios en el ambiente o la dieta**.
 - Se produce un **desarrollo temprano normal con episodios atáxicos, letargia, cetoacidosis precipitada por infecciones, etc.** Los síntomas **indican exceso catabólico inespecífico**.
- **Dependiente de tiamina.** Similar a las formas intermedias o intermitentes de MSUD.
 - En este caso, **el suministro de tiamina ayuda a aumentar la actividad del complejo**.
- **Deficiencia en E3.**
 - Es la **deficiencia más grave**, al producirse una mezcla de síntomas asociados a las diferentes rutas metabólicas en las que participa la subunidad.
 - Se producen problemas respiratorios, hipotonía, acidosis láctica, retraso en el desarrollo, alteraciones de movimiento y deterioro progresivo.

Se está estudiando si hay algún **fenotipo bioquímico** que permita diferenciar entre los diferentes **fenotipos clínicos de MSUD**, en función de la actividad residual del complejo. Se han podido ver estas diferencias en función del **fenotipo clínico**:

- Los pacientes con **fenotipo intermitente** son **asintomáticos** en ausencia de estrés metabólicos. Son los casos menos graves, afectando solo el **fenotipo en situaciones de daño por aumento inespecífico del catabolismo**.
- Los pacientes dependientes de tiamina **presentan un fenotipo clásico hasta ser tratados con esta**.

FENOTIPO	BIOQUÍMICA	ACTIVIDAD DESCARBOXILANTE % del control
Clásico	Incremento aloisoleucina; BCAAs y BCKAs muy altas (Leu>2.000 µmol/L)	0-2
Intermedio	Aumento moderado de aloisoleucina, BCAA y BCKA (Leu entre 400-2.000 µmol/L)	3-30
Intermitente	BCAA normal cuando están asintomáticos	5-20
Dependiente de tiamina	Con tiamina niveles de BCKA y BCAA bajos	2-40
Deficiencia en E3	Incrementos moderados de BCAA, BCKA, α-cetoglutarato y lactato/piruvato	0-25

Se han detectado mutaciones en los 4 genes que codifican proteínas del complejo y en la fosfatasa. Pero, a pesar de ello, hay un 7% de los pacientes que no tienen diagnóstico genético. Estos pacientes presentan formas clásicas de la enfermedad y mediante secuenciación masiva y estudios transcripcionales, se ha visto que podría estar relacionada con una disminución en la expresión de sus genes, por lo que se requiere un análisis epigenético y de los promotores. Además, no se descarta que pudiera haber nuevos genes relacionados con la enfermedad aun desconocidos.



No hay una relación clara entre el gen afectado y el fenotipo clínico de la patología, sino que esta está más relacionada con el tipo de mutación que la ha causado, aunque la correlación no es del todo clara. Esto se debe a que el diferente fondo genético que tienen los individuos modifica el fenotipo, al igual que los factores epigenéticos.

Por otro lado, los fenotipos clínicos no son estancos, sino que hay un espectro de fenotipos intermedios entre los más graves y los menos severos.

Por tanto, el estudio genético no permitirá determinar claramente un fenotipo, pero sirven para:

- Hacer más rápido el diagnóstico neonatal
- Posibilitar el diagnóstico prenatal y de portadores
- En algunos casos, permite realizar una predicción de la evolución de la patología, comparando con los datos de otros pacientes, aunque esto resultado complicado debido al reducido número de pacientes que hay al ser una enfermedad rara.

CLINICAL PHENOTYPE		
Encephalopathy Poor sucking ***	Ketoacidosis Lethargy	Metabolic decompensations associated to stressful situations
75%		
Classical neonatal forms		Variant forms

Los estudios aportan una base para abordar el diseño de terapias basados en el mecanismo molecular de la enfermedad. Por ejemplo, si al enfermedad se produce por paradas prematuras de la transcripción, pueden utilizarse drogas nreadthrough como la gentamicina que hacen que la maquinaria de transcripción se salte la parada. Otros podrían ser oligos antisentido, chaperonas farmacológicas, agentes proteastásicos...

Bases Moleculares de la Patología

MSUD – 18-03-2019

Análisis genético

El diagnóstico genético tiene como ventaja **posibilitar el diagnóstico prenatal y el de portadores**. Permite una **predicción de la evolución de la patología y es una base para el diseño de nuevas terapias**.

Tratamiento de los pacientes con MSUD

La **estrategia terapéutica en MSUD debe adaptarse a la patofisiología de la enfermedad, a la naturaleza multi-sistémica de los daños y al grado de severidad individual**.

Entre las estrategias terapéuticas hay algunas comunes a otros tipos de trastornos de tipo intoxicativo y otras específicas al MSUD.

El objetivo principal es que reinstaurar la homeostasis en el metabolismo intermedio. Lo principal es evitar una alteración a nivel del metabolismo intermedio, **manteniendo a nuestros pacientes en un estado anabólico, no catabólico**. **Las rutas de degradación de aminoácidos ramificados son catabólicas**, por lo que se ha de evitar los picos de intoxicación aguda.

La clave está sobre todo en intentar mantener un estado de **no-catabolismo**. Tiene que ser una **dieta baja en proteínas y enriquecida en azúcares y lípidos, en una situación anabólica**. La dieta ha de adaptarse a la patofisiología (hay que evitar todos los efectos secundarios de la patología).

Tenemos que suministrar algo que **eleve la actividad residual deficiente, si la hay. Si hay efectos tóxicos de los metabolitos habrá que activar rutas de eliminación de tóxicos secundaria**.

El tratamiento ha ido evolucionando en la historia. En un primer momento, **se hizo una restricción de aminoácidos ramificados**. El tratamiento se produce mediante una dieta baja en proteína que se va enriqueciendo en aminoácidos ramificados hasta que la actividad residual ponga un tope.

Hay dos tipos de aproximaciones:

- **Tratamiento en fase aguda.** Eliminar los tóxicos sanguíneos de la sangre para que no produzcan un daño agudo en el CNS. **Se eliminan mediante diálisis peritoneal o hemofiltración venosa**. Depende de la experiencia del hospital en estos casos.
Favorecimiento del anabolismo, evitar deficiencias en aas esenciales. Normalización del pH sanguíneo.
Suministro de tiamina para ver si son capaces de incrementar una actividad residual (algunas formas de BCKD)
- **Tratamiento crónico.** Leches mezcladas con fórmulas adaptadas sin BCAA. **También se debe intentar la administración de dosis elevadas de tiamina.**

Se sabe que hay unos pares de aas que dan lugar a nivel tóxico neurológico → leucina e isocaproico

Además del daño agudo, sabemos que un incremento persistente de α -cetoisocaproico y leucina produce un deterioro crónico en los pacientes. Se pueden tener otros trastornos neurodegenerativos aunque no haya síntomas en la vejez si los niveles de leucina e isocaproico pasan de un umbral.

Nuevas aproximaciones

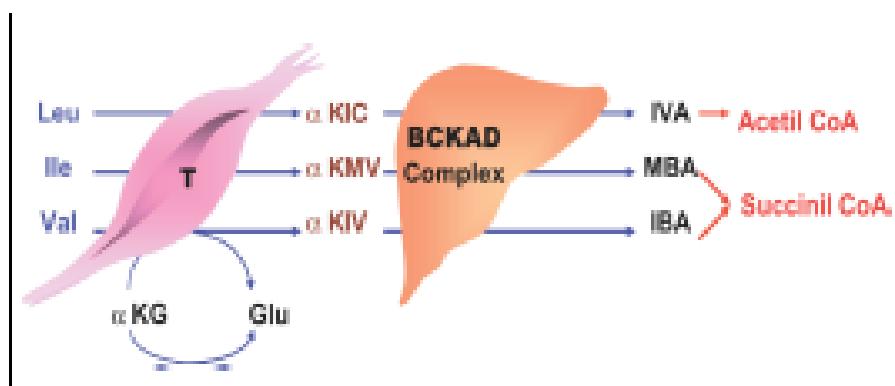
La administración de fenilbutirato se puede usar como tratamiento adyuvante a pacientes de MSUD. Se ha observado que la inhibición de la fosforilación del complejo con fenilbutirato incrementa su actividad. Su utilidad dependerá del impacto de las mutaciones sobre la estabilidad de la E1.

El complejo fosforilado está menos activo, de manera que al inhibir la fosforilación se mantiene un equilibrio hacia la forma no fosforilada. Las mutaciones han de afectar a la estabilidad de E1 pero no debería desaparecer la proteína (missense por ejemplo).

Transplante hepático

Se suele usar en las formas más graves de jarabe de arce. Aunque inicialmente no se había pensado en la opción debido a que la ruta catabólica no es exclusivamente hepática, **se pensaba que transplantar el hígado no iba a ser tan beneficioso para los pacientes.**

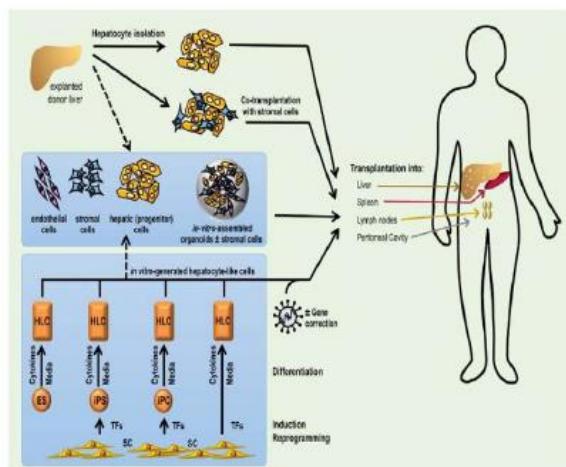
Sin embargo, **la patología mejora con el transplante.** Casi todos los pacientes que tienen formas clásicas están transplantados. Si los niños no mueren por otras razones como el rechazo, **se consigue que pase a una forma variante intermedia. Los niveles de aminoácidos ramificados más bajos pueden tener una dieta proteica algo más alta,** llevando una vida más razonable. Tienen menos crisis agudas, pues el cómputo de intermediarios tóxicos es menor. Transplantar the other way around no generan MSUD.



Se está intentando hacer transplantes de hepatocitos aislados, **modificados o no.**

A nivel experimental, se está usando transplante de tejido adiposo pues tienen metabolismo de MSUD alto.

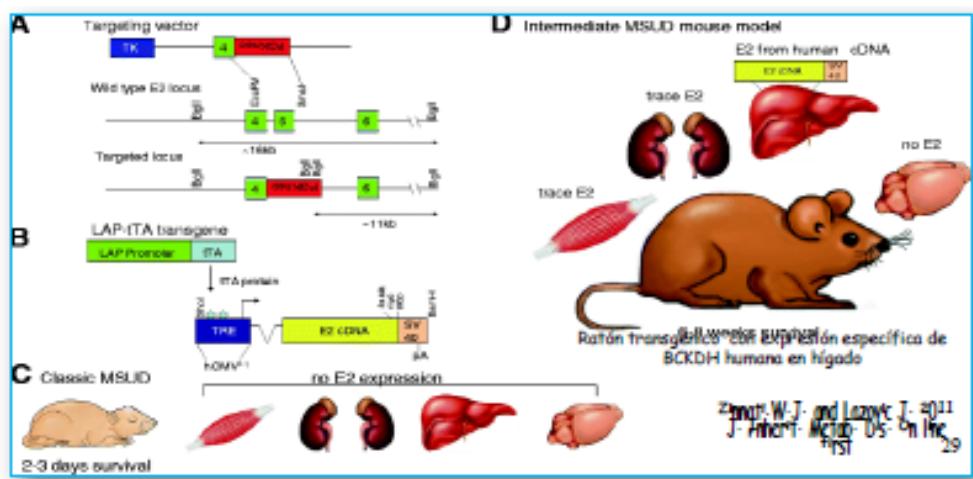
- ✓ Trasplante de hepatocitos y células madre
- ✓ Puesto que el tejido adiposo es una fuente importante de actividad catabólica de aminoácidos ramificados se está ensayando en modelos animales la utilidad del trasplante de adipocitos



Aspectos patofisiológicos

Modelos de ratón

- **KO de E2.** Encuentran que el ratón muere en periodo prenatal o aguanta unos cuantos días de vida: forma clásica de MSUD. Sirvió para ver que la subunidad E2 era importante incluso en periodo prenatal.



- **Ratón intermedio.** A un ratón KO le metieron un transgen con un promotor de hígado.

Encontraron varios tipos de defectos:

- Toxicidad de los metabolitos que se acumulan
- Efectos metabólicos secundarios, relacionados con un desbalance en los procesos de transporte
- Alteraciones a nivel mitocondrial, que tiene que ver con **deficiencia de energía y estrés oxidativo**

La patofisiología de las acidurias clásicas de aminoácidos ramificados es multifactorial. En ella se incluyen aspectos como:

- ✓ Toxicidad de metabolitos acumulados que pueden provocar 'toxicidad intracelular'. Entre los metabolitos derivados de los BCAA parece ser el par leucina/a-cetoisocaproico el más tóxico. Valores superiores a 1 mM de leucina en plasma se asocian a disfunciones cerebrales
- ✓ Efectos metabólicos secundarios incluidos: desbalance metabólico, competencia en los procesos de transporte, deficiencia de intermediarios metabólicos, etc.
- ✓ Alteraciones mitocondriales relacionadas con producción deficiente de energía y estrés oxidativo

30

El incremento de aminoácidos llegaría a la BBB, un transportador dependiente de sodio que transporta aminoácidos ramificados → LAAT1 está interferido por concentraciones altas de aa ramificados.

Cuando analizaron los fluidos fisiológicos de los ratones (CSF y tejidos) encontraron que en determinadas condiciones había aumentos en los niveles de aminoácidos ramificados y disminuciones en otros.

Si bajan los niveles de tirosina intracerebrales, **habrá una reducción en los niveles de dopamina**. Si bajan los niveles de triptófano, bajarán los niveles de serotonina. No tanto el propio aminoácido ramificado, sino el no transporte adecuado de los aminoácidos necesitados, **producen una falta de neurotransmisores**.

El ratón intermitente a los primeros días de vida es normal, **mientras se le dé una dieta baja en proteínas**. Cambiándole la dieta, **se evaluaba cómo se movían los distintos metabolitos**.

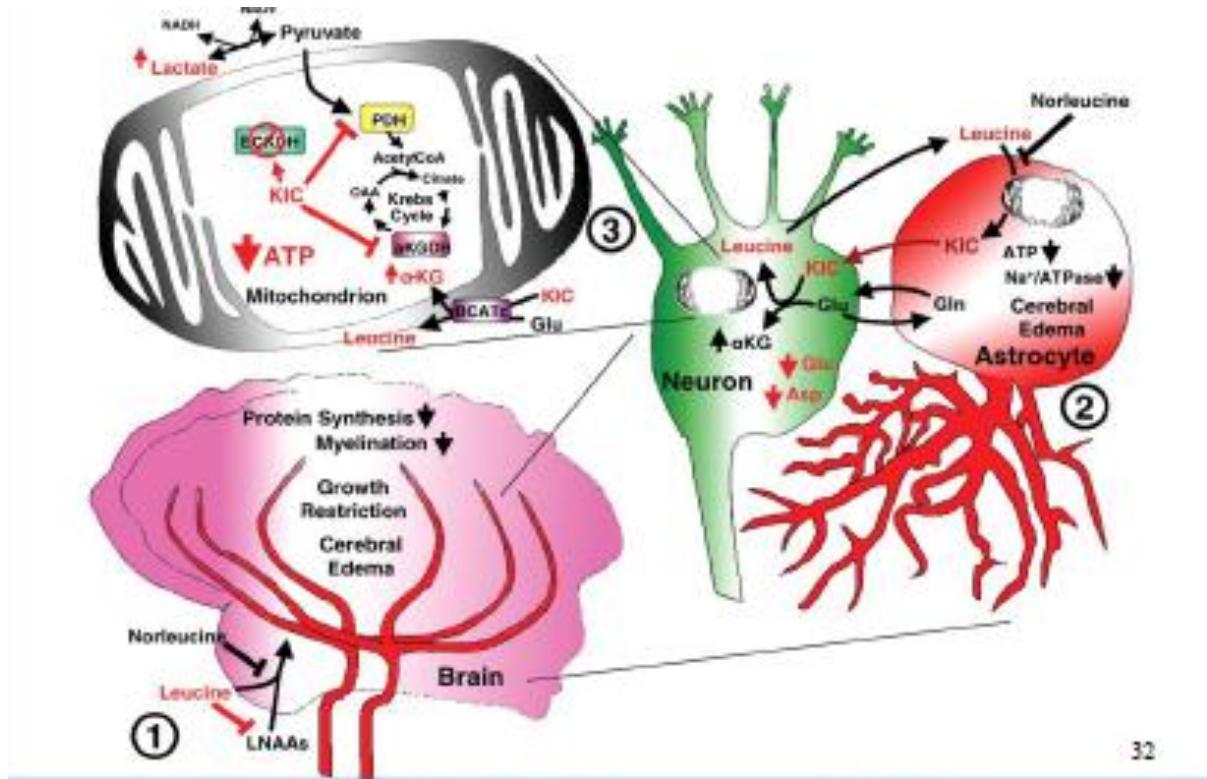
El glutámico baja de forma significativa, pues esta ruta transamina a α -cetoglutarato. El α -cetoglutarato subía. La dopamina baja, el GABA también.

La carga energética tanto en forma de ATP como fosfocreatina, baja. El láctico aumenta, **de manera que hay una disfunción mitocondrial**. Las Na/K ATPasa no son capaces de mantener el gradiente de las células, produciendo apoptosis.

Si no entran aminoácidos en la cantidad adecuada para la síntesis de proteínas cerebrales, **hay una restricción a la producción de proteínas por el cerebro**. Se ha visto una desmielinización bastante severa.

Para sintetizar la mielina, **necesitamos Acetil-CoA**. El desbalance en los niveles de leucina, a nivel de crecimiento del sistema nervioso y de síntesis de proteínas hay una caída importante.

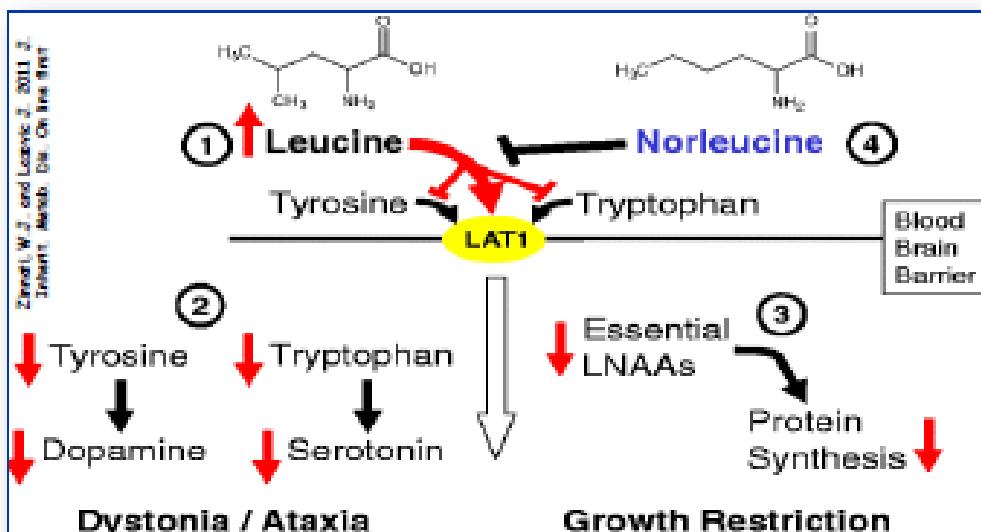
Entre astrocitos y neuronas hay un intercambio de metabolitos, que se podría ver disruptado como resultado del incremento de aminoácidos ramificados.



Tratamiento con NORLEUCINA.

Si el daño neurológico principal tiene que ver por desbalance, una propuesta fue que se diese un aminoácido que bloquee específicamente la entrada de la leucina, dejando el acceso a los demás aminoácidos.

La norleucina funciona a nivel de ratones, pues a nivel de tejido nervioso hay valores normales. A nivel de humanos, no se da esta.



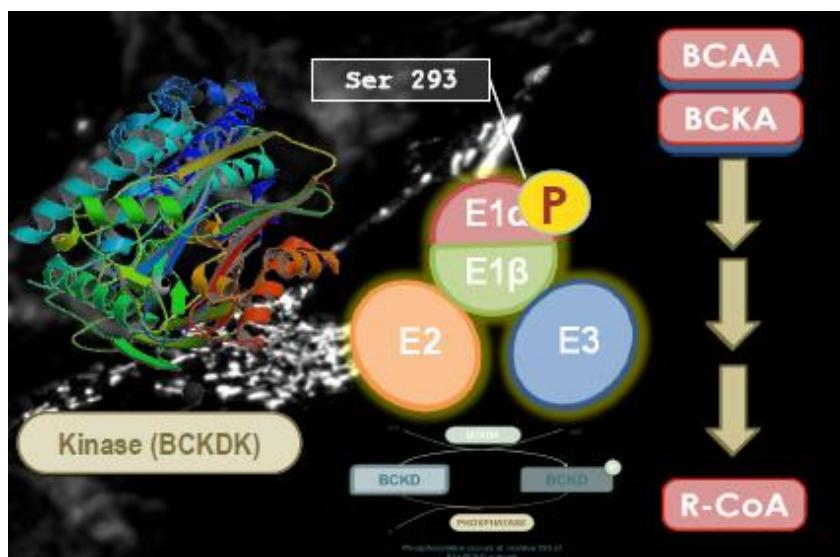
Asociado a la entrada masiva de leucina, se produce una reducción de otros aminoácidos como tirosina y triptófano y reducción de neurotransmisores como dopamina. El Tratamiento con NORLEUCINA bloquearía la entrada masiva de leucina al cerebro y así aumentaría los niveles de los restantes aminoácidos neutros

36

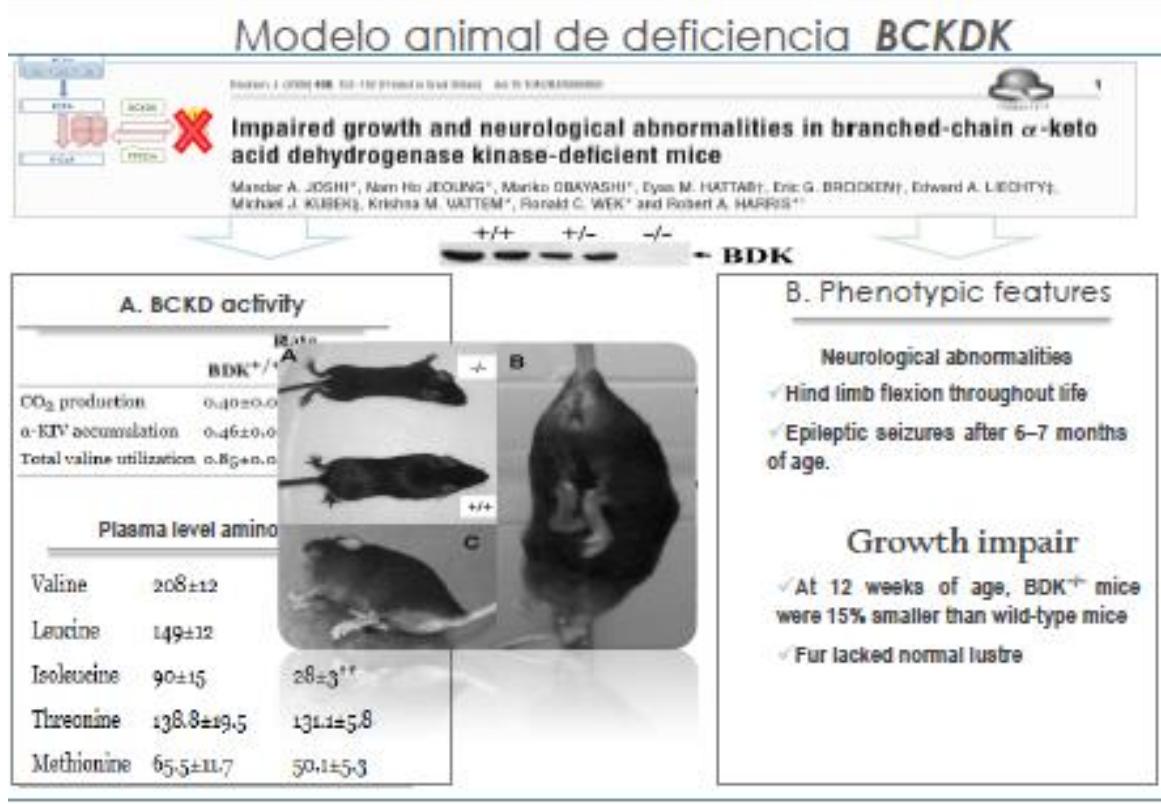
Defectos en proteínas reguladoras

- **Defectos en la fosfatasa.** Debería haber una disminución en la activación del proceso y fenotipo tipo intermedio.

PP2cm está descrita como fundamental en procesos mitocondriales.

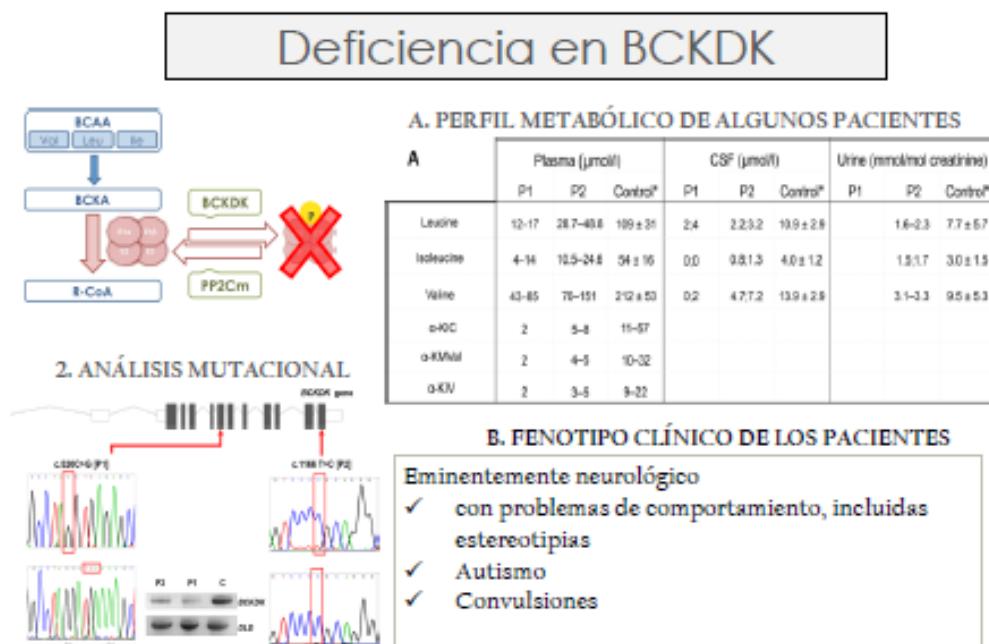


- Defecto en BCKD quinasa. Si hay un defecto en la actividad quinasa, estando mucho más activo. Aumentaría la tasa de degradación.



Los únicos datos que había era un modelo de ratón. Si se hacía un KO en la quinasa, disminuían los aminoácidos ramificados y un incremento en la tasa.

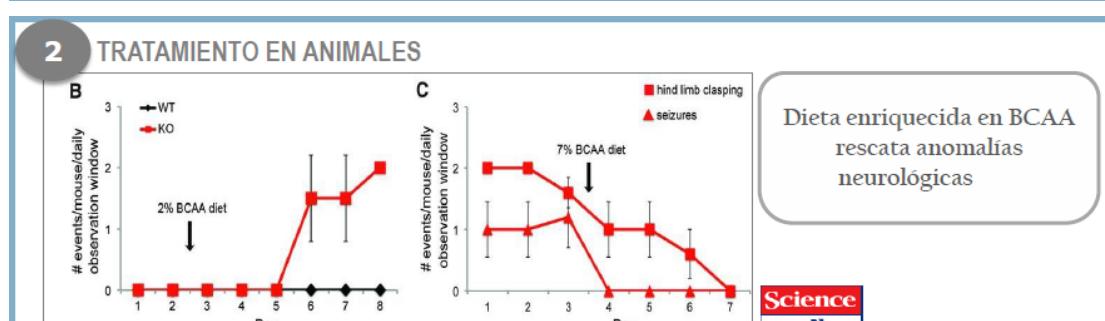
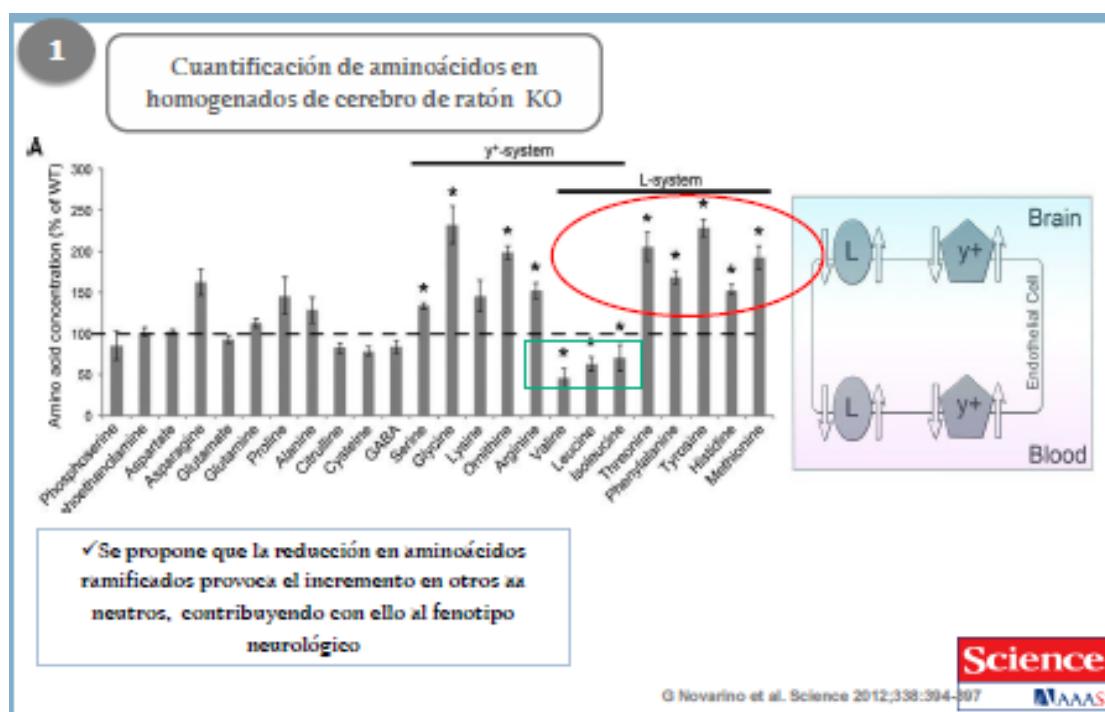
Esos ratones tenían **ciertas anomalías neurológicas**. A partir de los 6-7 meses experimentan brotes epilépticos.



En Estados Unidos, **algunos pacientes con comportamiento autista**, había una **región de homocigosidad** en la que encuentran un gen con mutaciones, la BCKD-K.

Pacientes con decremento de los niveles de aminoácidos ramificados en sangre, **tenían problemas de comportamiento que podrían encuadrarse en el espectro autista**. Esto ha sido relevante porque no solo el incremento, sino también el decremento.

Pacientes de esta deficiencia, **se supone que el tratamiento podría tratarse dándoles aminoácidos ramificados**. Los pacientes recuperaban los niveles de aminoácidos ramificados.



3 TRATAMIENTO EN PACIENTES

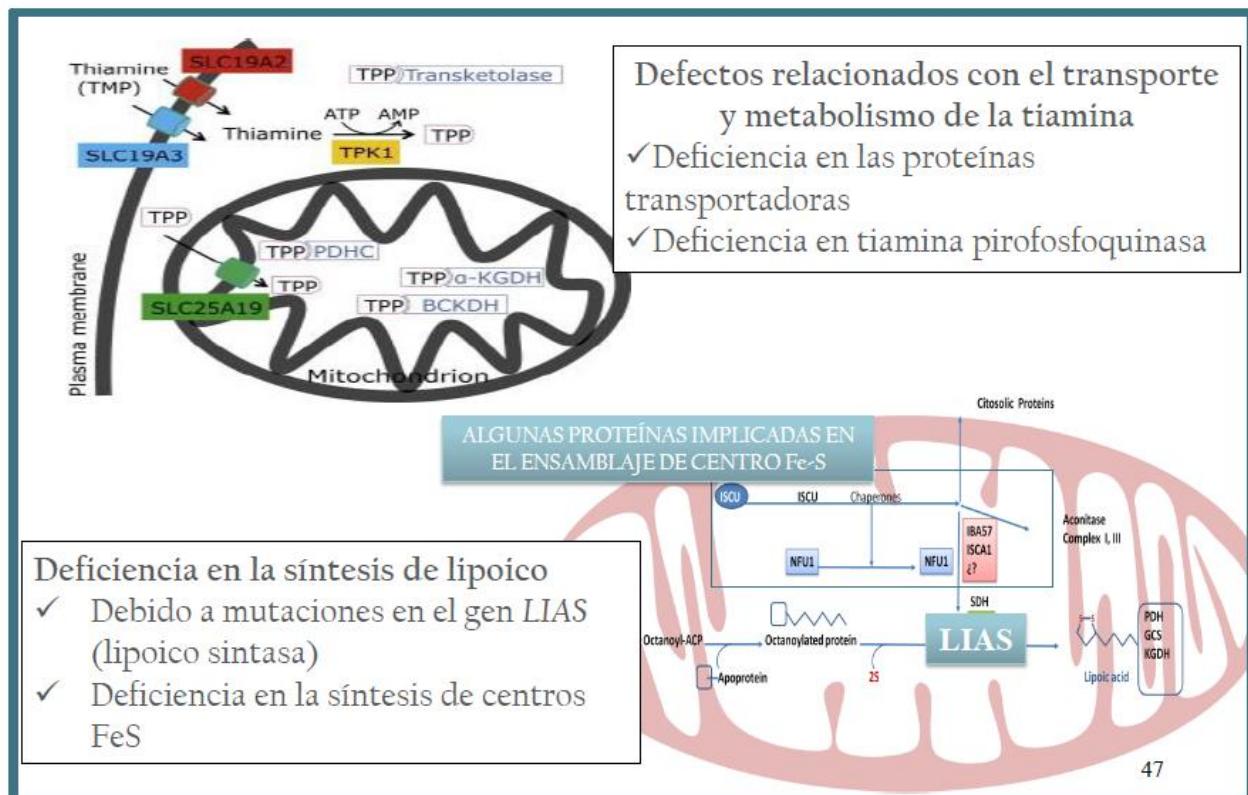
	PLASMA LEVELS ($\mu\text{mol/L}$)		
	P1 BT	P1 AT	Controls
Leucine	12-17	118 [*] -128 ^{**}	108 \pm 31
Isoleucine	4-14	62 [*] -105 ^{**}	54 \pm 16
Valine	43-85	382 [*] -411 ^{**}	212 \pm 53

Dieta enriquecida en BCAA y proteínas recupera las anomalías neurológicas detectadas en la resonancia, y mejor significativamente diversos parámetros de comportamiento y desarrollo psicomotor

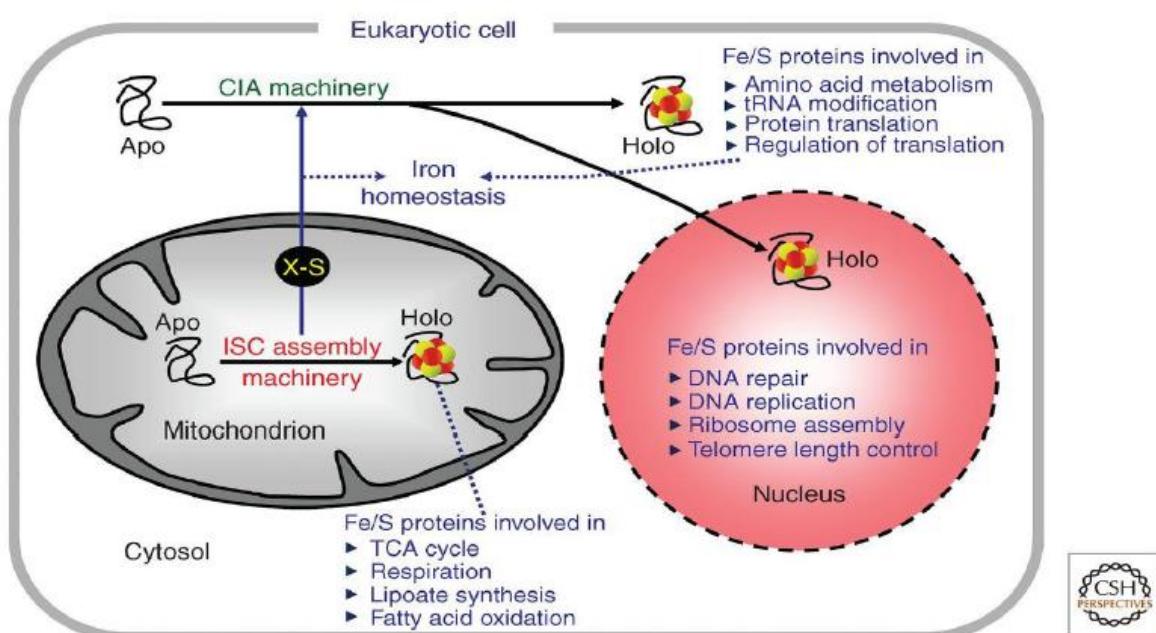
Algunos grupos proponen que el desbalance de aminoácidos en el SNC puede tener origen en la cantidad de aminoácidos que dan lugar a neurotransmisores.

Defectos múltiples

Los problemas también podrían estar en los coenzimas. Se han detectado patologías en relación al ácido lipóico y la tiamina. Todos son tratables mediante la administración de los coenzimas.



The biogenesis of cellular Fe/S proteins in eukaryotes and the links to cellular iron homeostasis, protein translation, and nuclear genome integrity.



Bases Moleculares de la Patología

MSUD – 19-03-2019

Defectos múltiples en coenzimas

Hay una serie de patologías relacionadas con cofactores

- **Tiamina, por ejemplo.** Los pacientes tienen un perfil bioquímico y clínico que se asemeja a enfermedades mitocondriales, como el síndrome de Leigh?
- Ensamblaje de los centros hierro azufre y síntesis del ácido lipóico. El lipóico tiene un proceso de síntesis de localización mitocondrial. En la mitocondria hay una síntesis del **ácido octanoico mitocondrial (a diferencia de la síntesis citosólica)**. Este octanoico debe recoger el centro azufre y luego ensamblarse sobre la E2.

Glicina sintasa, PDH, BCKD y α -KGD

En el ensamblaje mitocondrial de proteínas Fe-S se diferencian tres etapas consecutivas y se han descrito patologías asociadas a proteínas concretas de cada una de estas etapas:

- ✓ Ensamblaje transitorio del centro Fe-S sobre una proteína andamio **ISCU**. El S procede de la conversión de una cys en alanina . Este ensamblaje requiere una cadena transportadora de electrones con NADPH y hierro feroso que ha sido importado dentro de la mitocondria utilizando un sistema de transportadores (mitoferrinas)
- ✓ Liberación de estos centros Fe-S desde el “andamio” y captación por un sistema de chaperonas que incluye **GLRX5**
- ✓ Formación de centros 4Fe-4S por factores ISC adicionales no presentes en la maquinaria inicial (ej **IBA57**)
- ✓ Maduración y envío a apoenzimas específicas para generar la holoenzima activa. Es el caso de **BOLA3 o NFU1** en la proteína **Lipoato sintasa (LIAS)** cuya actividad se requiere para la síntesis de lipoico presente en complejo PDH, α -cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, etc

Una enzima importante en este proceso es la **lipóico sintasa, que produce una falta de ensamblaje del ácido lipóico. A nivel bioquímico tendríamos:**

- **Incremento de lactato**
- **Incremento de glicina**
- **Incremento de α -cetoglutarato**
- **Incremento de aminoácidos ramificados**

Por consiguiente, el defecto podría ser multisistémico.

Para generar el ácido lipóico hay una pequeña cadena de síntesis, pero además se han de ensamblar esos dos azufres que forman el enlace tioester. Resulta, que esta formación del tioester tiene que ver con el metabolismo de centros hierro azufre.

Cuanto más atrás vamos en el defecto, más multisistémico y más compleja es la patología. No se conocen al completo todas las cosas que pueden fallar, sino que se está estudiando el metabolismo del hierro en levaduras.

De alguna manera, se intenta cuadrar tanto este metabolismo del hierro azufre como los casos clínicos. El donador de los azufres sobre el lipóico es un centro de cuatro hierros y cuatro azufres. Por un lado, hay un metabolismo de hierro y por otro, de azufre, mitocondrial.

El ensamblaje tiene una serie de etapas que supone:

- Entrada en forma de hierro ferroso que se transporta por mitoferrinas. El azufre llegaría por alguna cisteína que pasaría a alanina. De alguna manera, por medio de la frataxina, permite ensamblar un primer centro hierro azufre por medio de ISCU una proteína de andamiaje.

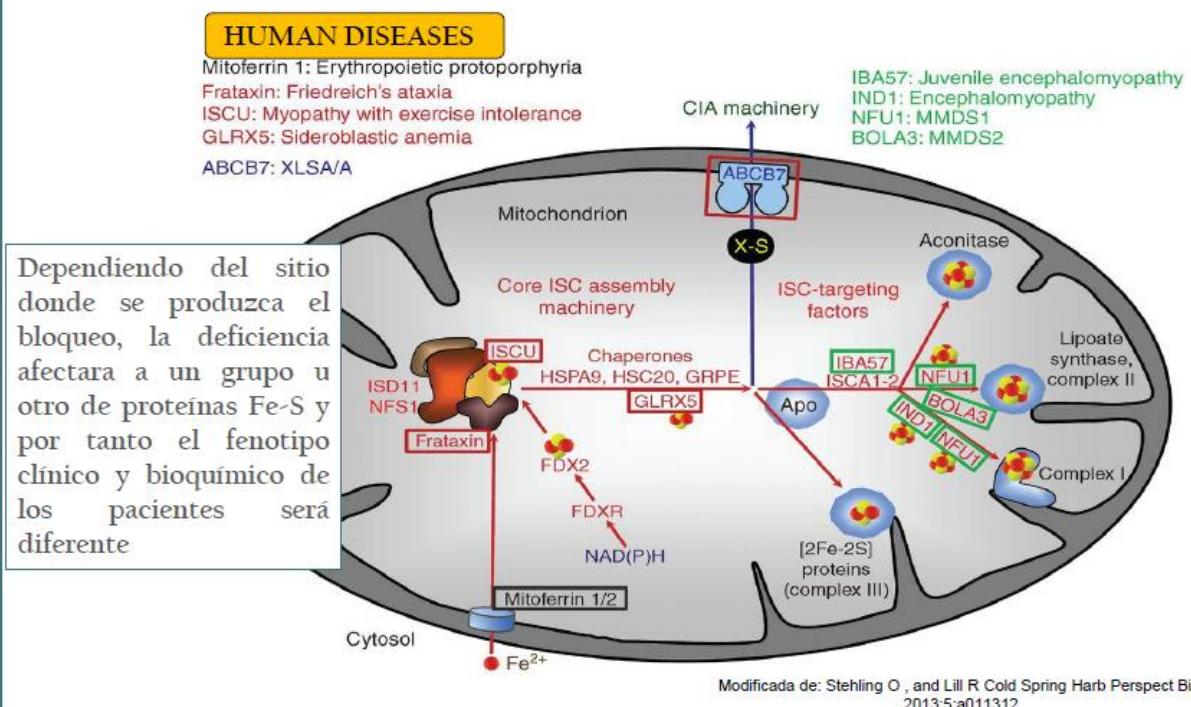
Este primer centro hierro azufre será plegado por chaperonas e irá a formar un centro de hierro azufre doble. Puede sufrir modificaciones y pasar a la forma 4Fe y 4S, donde hay una serie de proteínas por las que pasa.

El cómo se distribuyan a las distintas proteínas no queda claro. Defectos en NFU1 interviene en cómo se suple la lipóico sintasa.

Hay algunos defectos que indican que no se le suple a los cuatro complejos por la misma proteína el centro hierro azufre.

Dependiendo del sitio de bloqueo, la deficiencia afectará a un grupo u otro de proteínas Fe-S y por tanto el fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes será diferente.

Patologías relacionadas con la biogénesis de proteínas mitocondriales conteniendo centros Fe-S



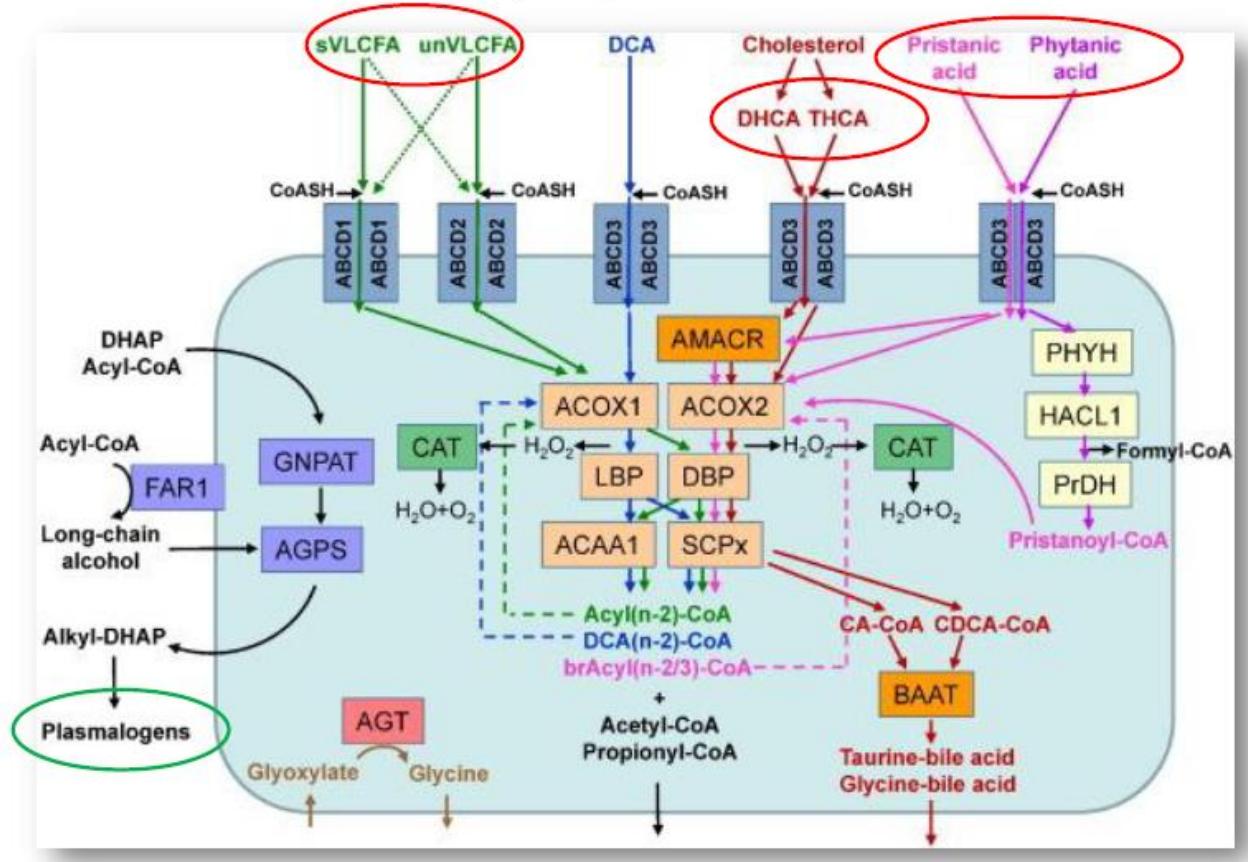
Enfermedades peroxisomales

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares de membrana con una matriz granular y que cumplen funciones fundamentales en el organismo. Son dinámicos e interconectados entre sí y capaces de importar proteínas completamente plegadas.

Su función es múltiple, siendo orgánulos multipropósito. Sus funciones, dependen del organismo, tipo celular o estadío del desarrollo. Entre sus funciones más comunes, están:

- Metabolismo del agua oxigenada
- Oxidación de ácidos grasos de cadena larga y ramificada
- Oxidación de ácidos dicarboxílicos como el pristánico y el fitánico
- Ciclo del glioxilato en plantas
- Biosíntesis de plasmalógenos en mamíferos
- Biosíntesis de ácidos biliares
- También intervienen en la síntesis de leucotrienos y ácido dodecosahexanoico (DHA)

Main metabolic pathways in peroxisomes



Así, el peroxisoma en mamíferos tiene distintas funciones, tanto catabólicas como anabólicas. Separándolas en base a este criterio, tenemos:

- **Funciones anabólicas.**

- Síntesis de **plasmalógenos**.
- Síntesis de **ácidos biliares**
- Síntesis del **ácido docosahexaenoico C22:6, DHA**.

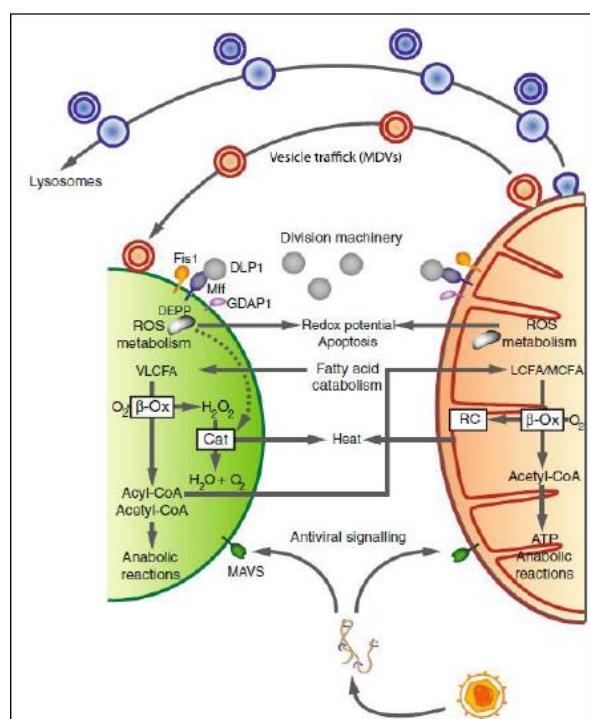
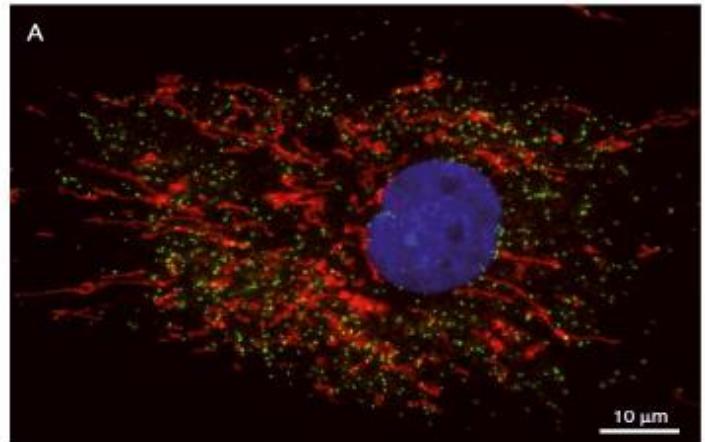
- **Funciones catabólicas**

- **β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA)**
- **β -oxidación del ácido pristánico**
- **α -oxidación del ácido fitánico**
- **Degradación del ácido pipecólico.**

Dependiendo de donde estén los defectos en los pacientes, se acumularán unos u otros metabolitos en sangre. Por ejemplo, si el defecto está en la formación tendríamos acumulaciones de ácidos fitánicos, pristánicos, long chain FA, falta de plasmalógenos...

Los peroxisomas contienen además varias enzimas implicadas en la producción y captación de especies reactivas de oxígeno. Entre ellas, se encuentran la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutation peroxidasa. Es decir, se los puede considerar como contribuyentes importantes al metabolismo de los ROS, la neurodegeneración y la carcinogénesis.

En algunas de estas funciones, también están implicadas las mitocondrias, con las que mantienen una estrecha relación.



Los peroxisomas y la mitocondria son **orgánulos ubicuos, altamente dinámicos con un metabolismo de tipo oxidativo**. Ambos orgánulos tienen una cooperación funcional que **afecta a la salud y al desarrollo**, de manera que esta cooperación incluye una

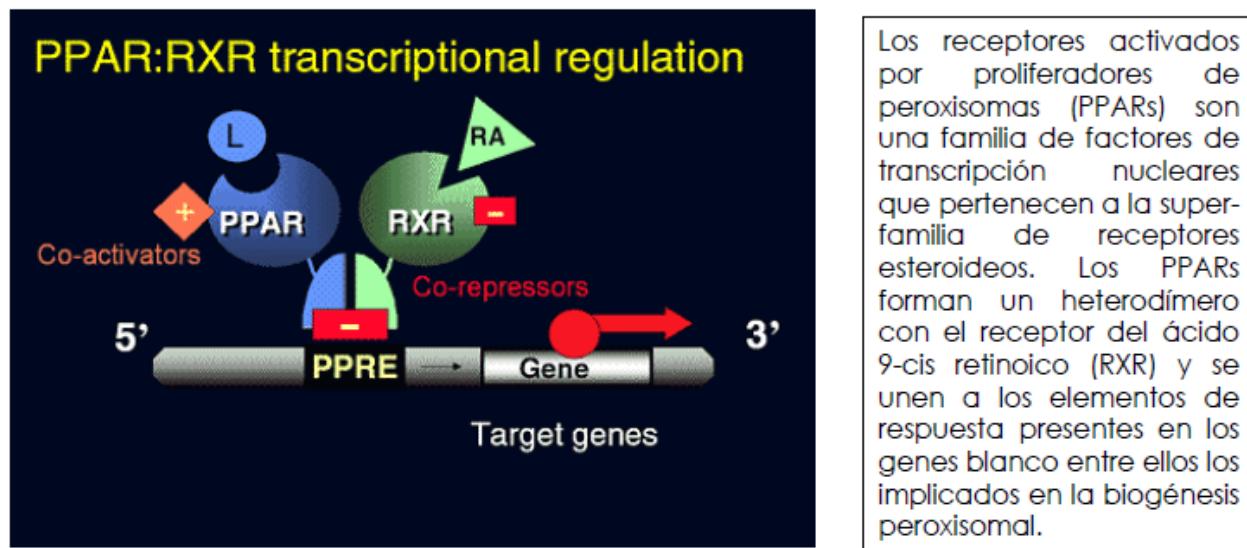
- **Cooperación en el catabolismo de los ácidos grasos**
- **Relación de sensor redox**
- **Solapamiento en la composición de la maquinaria de fisión de membranas**
- **Cooperación en la señalización antiviral y en la defensa contra patógenos.**
- **Emisión de vesículas desde unas a las otras**

Así, se han descrito enfermedades combinadas en las que hay defectos en la división de ambos orgánulos.

Así, son orgánulos subcelulares relacionados íntimamente con otros orgánulos, **desplazándose por medio de microtúbulos**. El desplazamiento es importante para entender el comportamiento patológico.

Sabemos que los peroxisomas pueden variar en número en mamíferos entre menos de 100 y más de 1000. Esto depende de **el frío, el estrés, el estadio de desarrollo, la presencia o ausencia de ácidos grasos...** Es decir, **hay muchos factores que pueden modificar la proliferación peroxisomal**. Así, es necesario activar las rutas de síntesis de proteínas peroxisomales por medio de reguladores.

Las **proteínas PPAR** tienen que ver con **proliferación de peroxisomas**. Son de la familia de receptores de hormonas esteroideas, formando un heterodímero con receptores de tipo **cis-retinoico** reconociendo una secuencia específica en genes dianas, la PPRE.



Activan la expresión de **genes que tienen que ver con la biogénesis de las peroxisomas, las llamadas peroxinas**. Al mismo tiempo que cambian en número, cambian en forma, en tamaño y en contenido. Estos cambios en tamaño **también implican cambios en la cantidad de proteína necesaria**.

Las enfermedades que afectan a los peroxisomas en humanos **suelen ser letales y se pueden agrupar en dos grupos:**

- Defectos que afectan a la biogénesis del peroxisoma
- Defectos en las actividades enzimáticas peroxisomales

Biogénesis peroxisomal

Es fundamental conocer cómo se genera un peroxisoma. Muchas de las enfermedades tienen que ver con **problemas o mutaciones en proteínas que no se ensamblan correctamente en el peroxisoma**.

Los peroxisomas usan dos modelos básicos de formación de orgánulos:

- **Ensamblaje a través de fusión de vesículas**
- **Crecimiento y división**

Los peroxisomas usan ambos mecanismos de génesis:

- La **biogénesis de novo** se produce por **ensamblaje a partir de vesículas pre-peroxisomales procedentes del retículo endoplásmico**.
- El crecimiento de peroxisomas preexistentes por **incorporación de proteínas de membrana y matriz seguido por la división del orgánulo** una vez que se alcanza una masa umbral también se da.

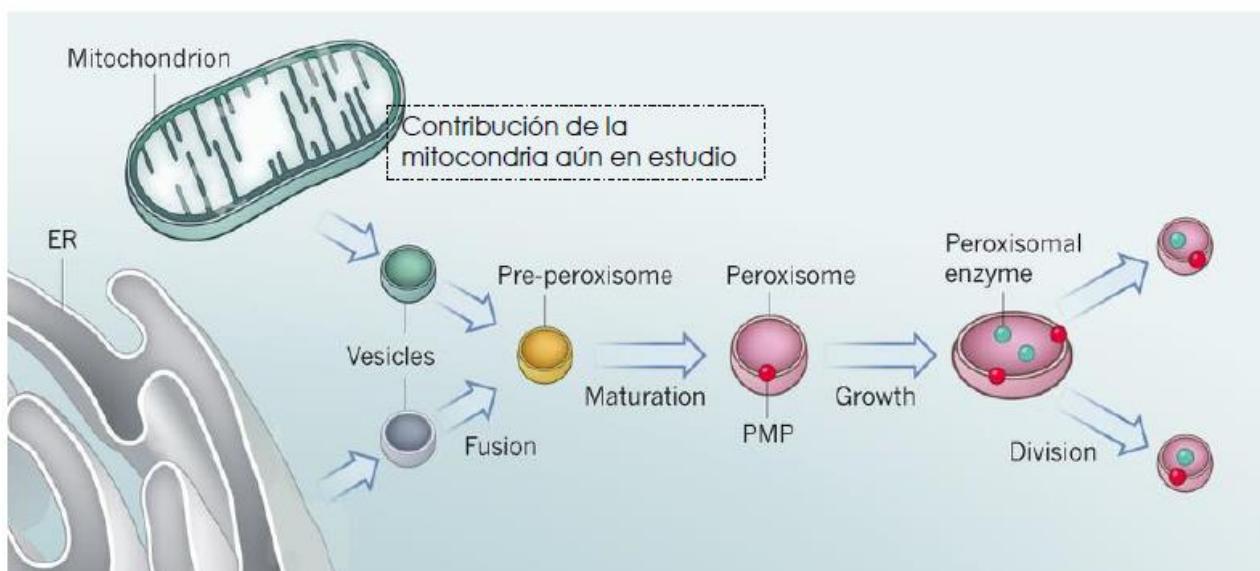
En ambos casos, **existe un proceso de maduración que implica el reclutamiento de nuevas proteínas tanto de matriz como de membrana**.

Para la biogénesis peroxisomal **son imprescindibles una serie de proteínas llamadas peroxinas**, codificadas por genes nucleares **PEX**, entre los que se incluyen los que codifican por **receptores citosólicos y otras proteínas peroxisomales**, como algunas proteínas de membrana peroxisomal.

Esquema general de la biogénesis peroxisomal y orgánulos implicados

Inicialmente, se creía que el donador de membranas peroxisomales era el retículo endoplásmico. Sin embargo, parece ser que hay muchas vesículas que salen de la mitocondria. La contribución de la mitocondria está aún en estudio.

En cualquier caso, necesitamos importar proteínas de membrana y proteínas de matriz. Estas proteínas se han de sintetizar en polisomas libres, no en el retículo y se ensamblan al completo fuera. De esta manera, al peroxisoma se transportan proteínas totalmente ensambladas, sin modificación posterior en el peroxisoma. Hay que generar una maquinaria que las proteja y las mande al sitio adecuado.



Ensamblaje peroxisomal. Proteínas de membrana.

La mayoría de los fosfolípidos proceden probablemente del retículo endoplásmico.

Hay tres peroxinas con funciones específicas en el ensamblaje de la membrana: Pex19, Pex3 y Pex16. En un principio, las proteínas se encuentran en el retículo endoplásmico.

Es fundamental el papel de tres peroxinas, la 19, 3 y 16. En una primera etapa, las proteínas están en el propio retículo endoplásmico.

- **Pex19 es una proteína sobre todo citosólica**, capaz de unir muchos tipos de proteínas de membranas (**PMPs, peroxisome membrane proteins**).

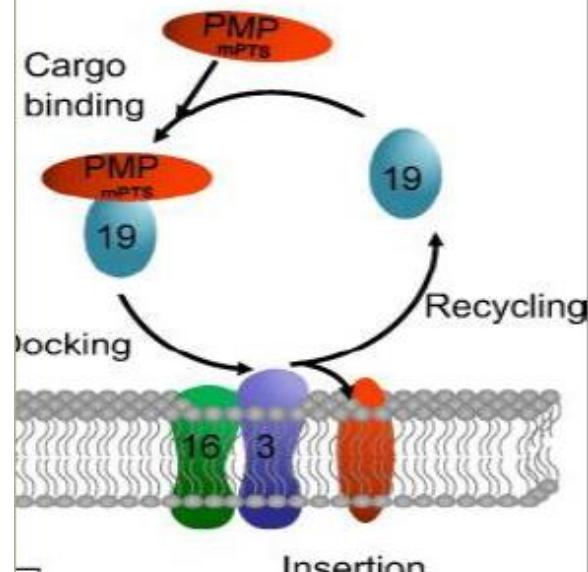
Actúa como una chaperona de todas las PMP recién sintetizados.

- **Pex3 es una proteína de docking**, capaz de unirse a la peroxina 19 y localizarla.. Se ha visto que en el retículo endoplásmico, se generan gemaciones que producen **vesículas con la peroxina 3**. Se cree que estas vesículas también pueden salir de la mitocondria.

Así, del retículo endoplásmico y de la mitocondria se generarían vesículas con **Pex3 en membrana** que servirían como preformadores del peroxisoma. El reconocimiento por **Pex19** de **proteínas de matriz peroxisomal** haría que esta chaperona transportase hacia las vesículas con **Pex3** estas proteínas.

En este transporte, es probable que sea necesaria también la **acción de la peroxina 16, que estaría en membrana junto a Pex16**. Una vez que se produce la inserción de la PMP, la peroxina 19 es reciclada para unirse a más cargos.

Membrane protein import



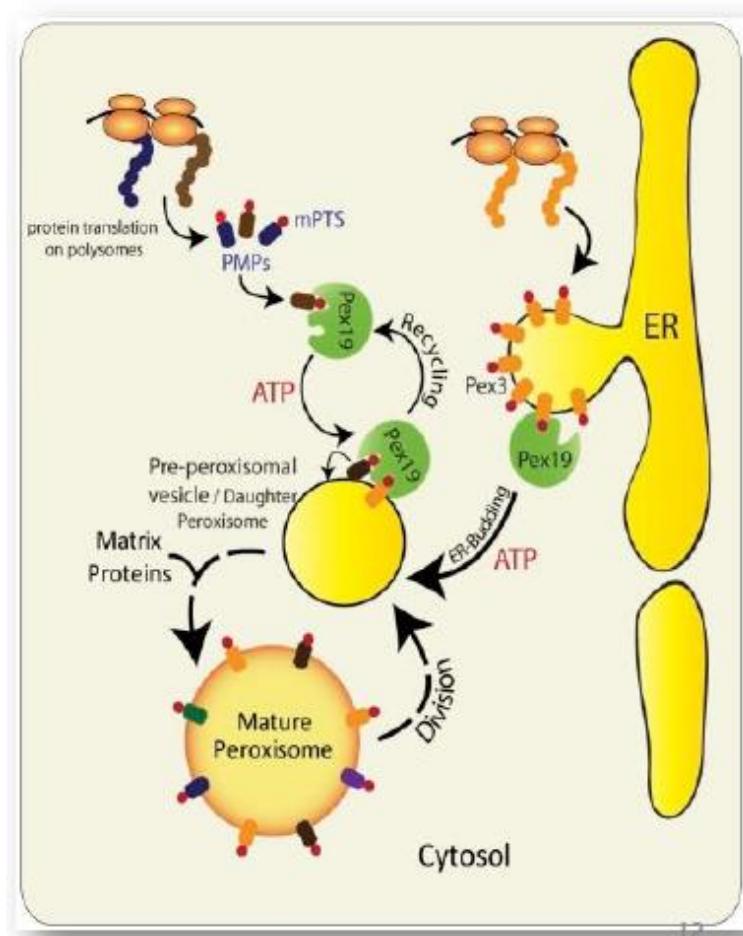
Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades peroxisomales – 20-3-2019

Ensamblaje peroxisomal

Pex16 parece ser importante, pero no se tiene muy claro qué papel es el que desempeña.

Puesto que Pex3 y pex16 han sido identificadas en el retículo endoplásmico, es posible que los pre-peroxisomas procedan de vesículas procedentes del retículo contenido ya tales proteínas. No está claro si las restantes proteínas de membrana (PMP, peroxisome membrane proteins) son primero trasladadas al citoplasma o si por el contrario se ensamblan en el RE para posteriormente empaquetarse en vesículas especializadas.



Importación de proteínas de matriz peroxisomal

La entrada de proteínas de matriz, se produce por otros mecanismos. Hay hasta unas 50 proteínas distintas, con funciones cata/anabólicas dentro del metabolismo. Todas estas proteínas de matriz se están sintetizando en ribosomas libres, plegándose y transportándose en su forma funcional o casi funcional hasta la matriz peroxisomal.

Cómo ocurre el targeting hacia el peroxisoma es importante. Tiene que haber algún tipo de señal que reconozca a estas proteínas y las acompañe hacia su destino final, habiendo unos receptores citosólicos (peroxinas) que van a reconocer una determinada señal. El targeting implica que las proteínas de matriz tengan unas señales específicas. Parece haber dos tipos de señales conformadas por secuencias aminoacídicas, no dominios estructurales.



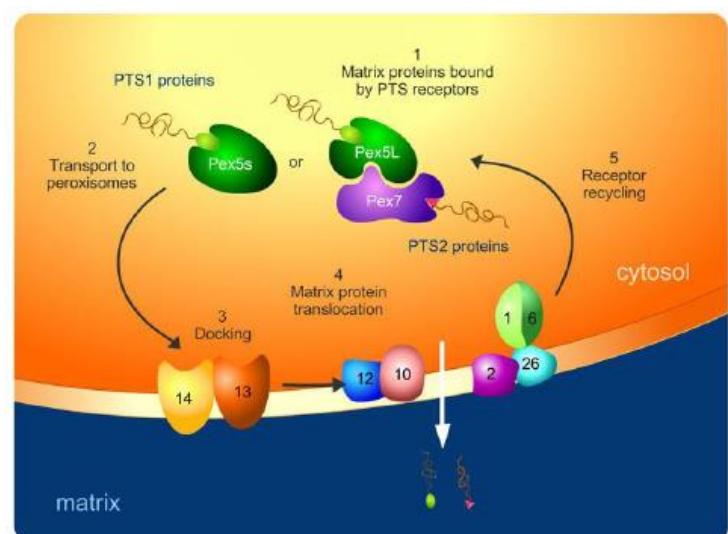
- **Señal tipo PTS1.** Son reconocidas por Pex5. En el C-terminal de la proteína, muy conservado, tienen un tripéptido **SKL**. Casi todas las proteínas de la matriz utilizan esta señal.
- **Señal de tipo PTS2.** Son reconocidas por Pex7. En el N-terminal, más variable, siendo un octa/nonapéptido. Las proteínas con esta señal sólo son tres, la tiolasa, la PhyH y la AGPS.

Sabemos que además, Pex5, tiene **dos isoformas diferentes**, resultado de un splicing alternativo: **Pex5S** y **PEX5S**.

Resulta que las proteínas PTS1 son capaces de unirse a ambas formas, pero mayoritariamente usan el Pex5S para moverse. Las PTS2 tienen un reconocimiento por Pex7, pero para que la proteína llegue a la membrana tiene que interaccionar con Pex5L.

Así, el esquema quedaría:

- Las **proteínas con señal PTS1** se importan mayoritariamente mediante su **unión a Pex5S**.
- Las **proteínas con señal PTS2** se importan mediante la unión a **un complejo previamente formado entre Pex7 y Pex5L**.



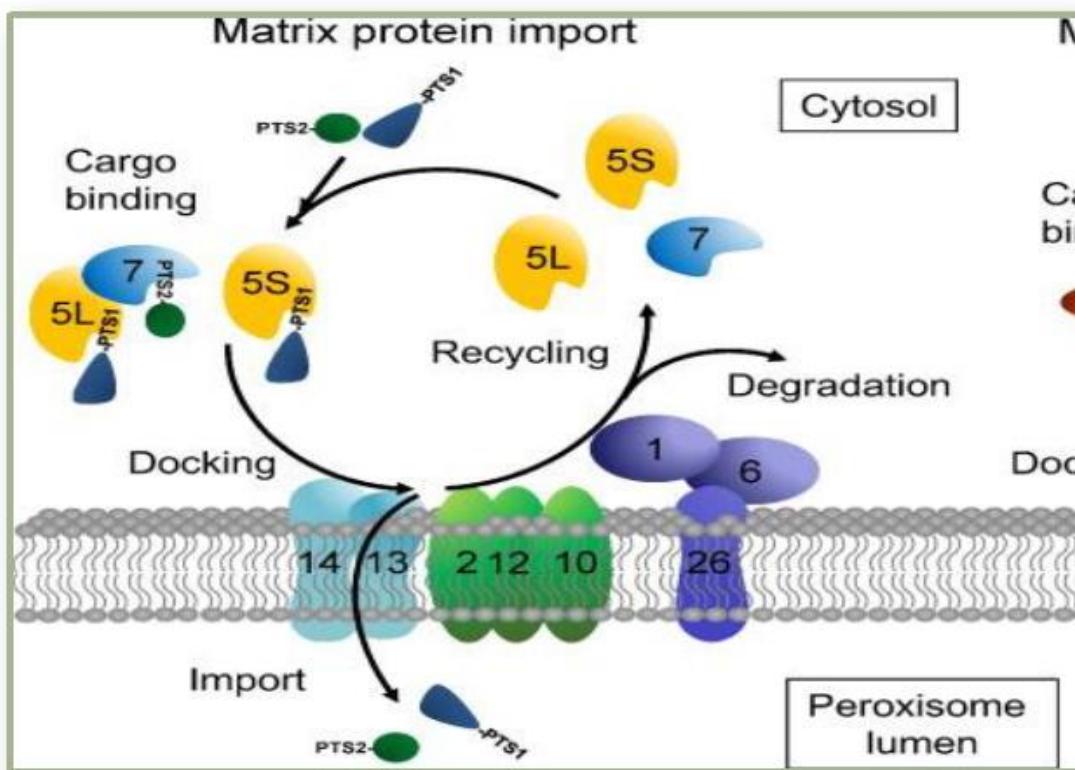
Desde el punto de vista de patología, **esto supone una situación algo excepcional**. Esto es debido a que es posible que falle uno de los sistemas de transporte y no el otro, hecho que puede usarse en diagnóstico diferencial de enfermedades peroxisomales.

Una vez que los complejos de transporte llegan a la membrana, **habrá proteínas implicadas en internalizar, en el docking y en el reciclaje de los receptores**. El mecanismo de importación a la matriz mitocondrial es el siguiente.

- Reconocimiento de la carga o proteína a transportar.
- Anclaje del complejo carga/receptor a la membrana peroxisomal. Docking, mediado por Pex13 y 14.
- Translocación de la proteína al lumen de la matriz peroxisomal.
- Reciclaje del receptor, fundamental el papel de las proteínas Pex2, 10 y 12. Todas ellas son ubiquitininas ligasas que catalizan la mono o poliubiquitinación de los receptores, señalando su posterior reciclaje (monoubq) o degradación proteosomal (poliub).
- Liberación de formas monoubiquitinadas por la acción de las proteínas Pex1 y Pex6, que son AAA ATPasas que forman un hexámero anclado a la membrana gracias a la interacción de Pex6 con Pex26. Aplica sobre todo a Pex5.

1

Schematic view of the human import machinery for peroxisomal matrix proteins highlighting the roles of the different PEX proteins (peroxins)



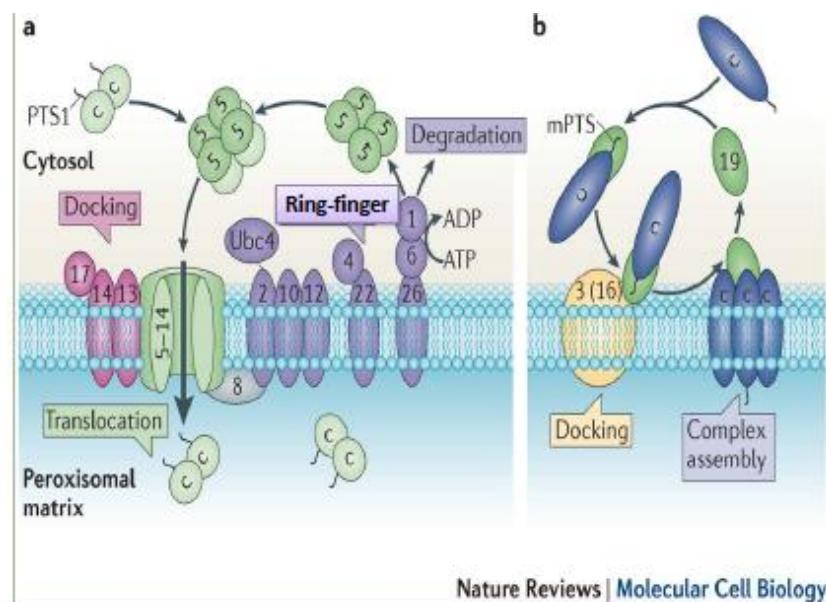
Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2015, Available online 22 November 2015

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.015>

Todas estas proteínas tienen un nombre grupal denominado importómero, y varía entre distintos estudios. Nosotros vemos la versión humana.

Datos previos en levaduras ven más proteínas implicadas: Pex17 en el docking. Una propuesta que hay es que la Pex5 forme un canal en la membrana que permita el paso de las proteínas que tiene que transportar. Funcionaría un ring-finger en el reciclaje.



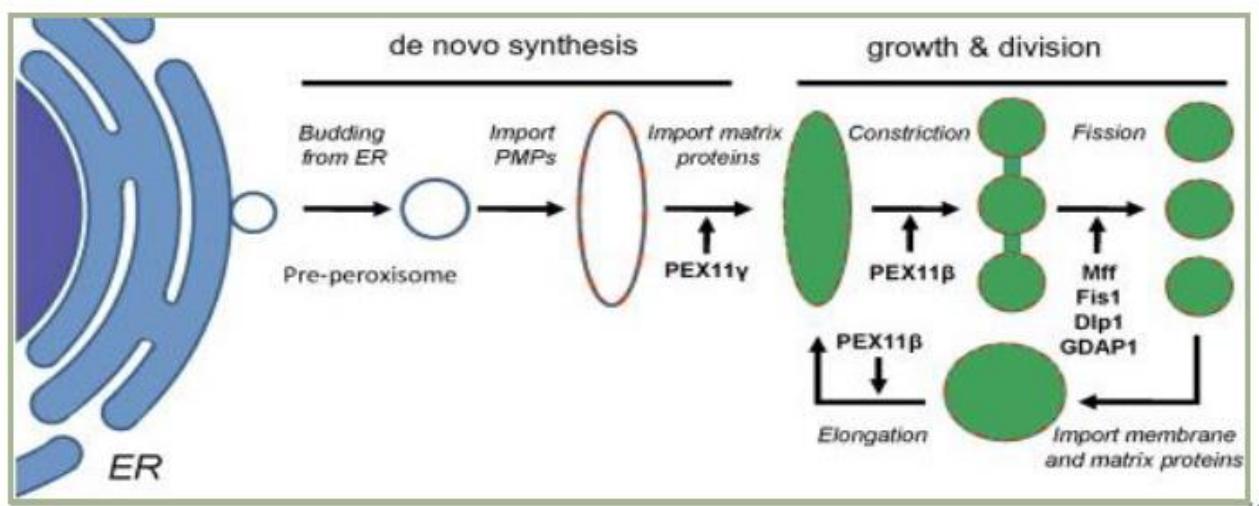
Se han encontrado mutaciones asociadas a las distintas peroxinas, y dependiendo de las mutaciones se da lugar a un nivel de gravedad u otro.

Síntesis de peroxisomas por medio del crecimiento

La etapa de división **puede subdividirse en tres procesos diferentes: elongación, constricción y fisión.** Ese proceso es mucho más rápido que confiar únicamente en la biogénesis de novo.

Diversas proteínas parecen participar en estos procesos:

- **Pex11 β .** Está relacionada con la ruta de crecimiento y división del peroxisoma.
- **Pex11 γ .** Está implicada en el importe de proteínas peroxisomales de matriz hasta las vesículas pre-peroxisomales.
- **Dinaminas (Dlp1/Drp1), mitofusionas, etc.** Participan fundamentalmente en los procesos de fisión.

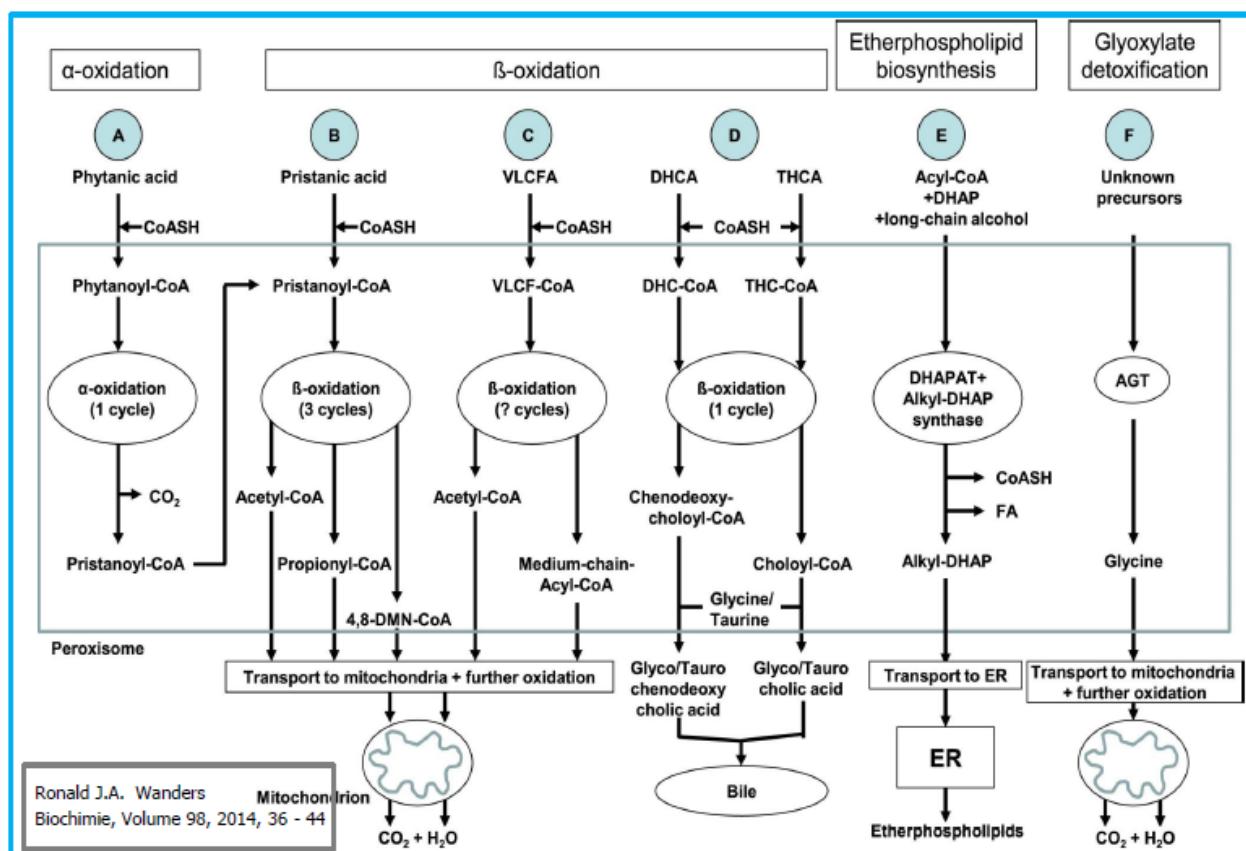


Funciones del peroxisoma y conexiones con otros orgánulos subcelulares

En la diapositiva, se ven las rutas que están relacionadas con biomarcadores de la patología.

1. α -oxidación del ácido fitánico
2. β -oxidación del ácido pristánico, VLCFA y ácidos grasos de cadena ramificada.
3. β -oxidación de los ácidos DHCA y THCA, necesaria para la formación de los ácidos biliares.
4. Biosíntesis de los eterfosfolípidos como los plasmalógenos
5. Detoxificación del glioxilato

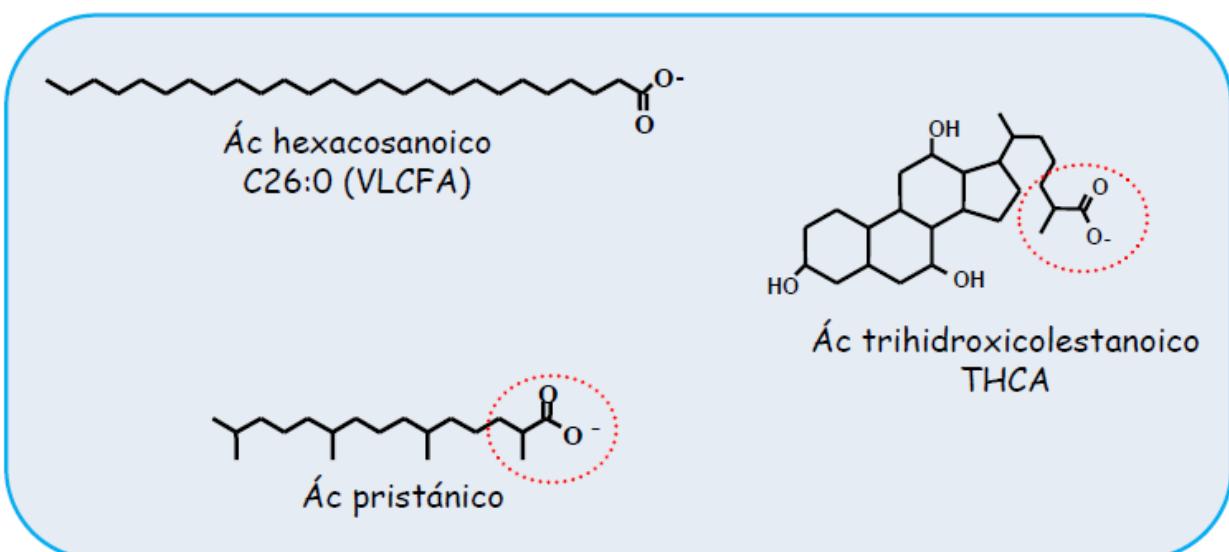
Sin embargo, estas rutas metabólicas no tienen lugar exclusivamente en el peroxisoma, sino que también tienen un cross-talking con distintos orgánulos.



β -oxidación

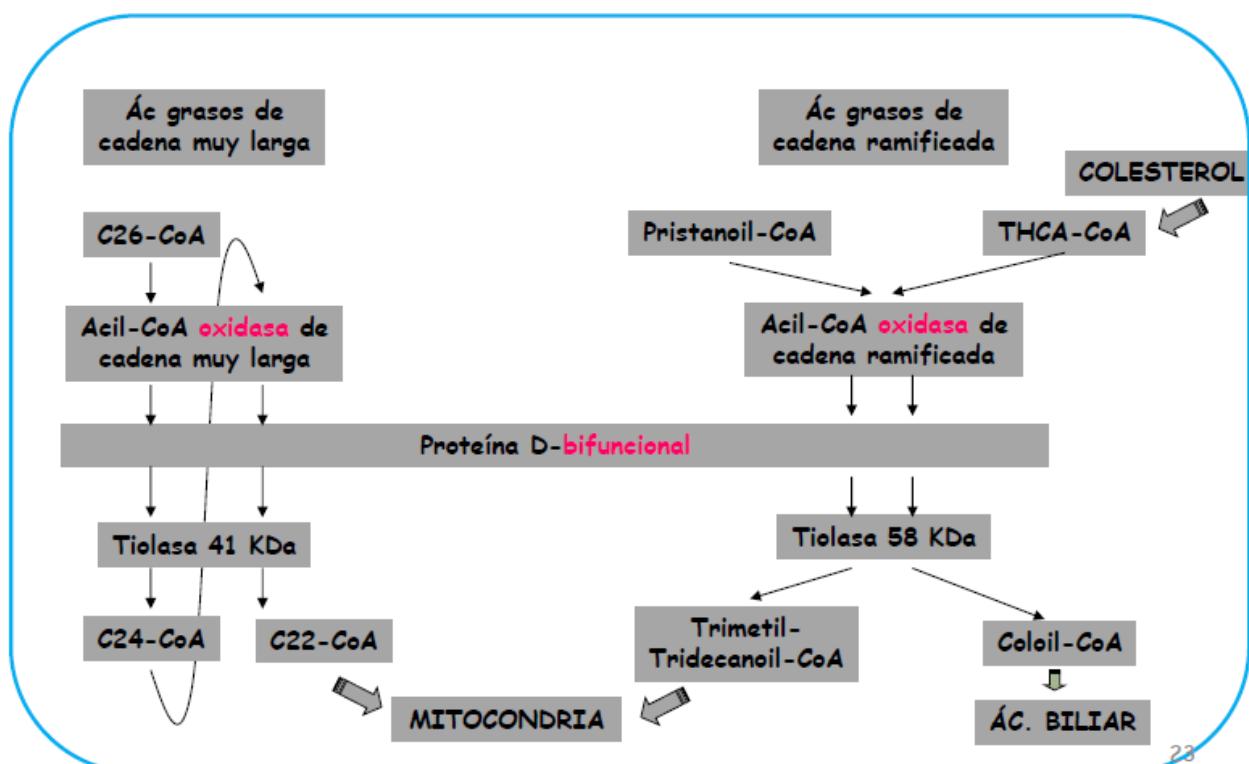
En el peroxisoma, se produce la β -oxidación de:

- Ácidos grasos de más de 22 carbonos
- Ácidos grasos ramificados
- Ácido trihidrocolestanico



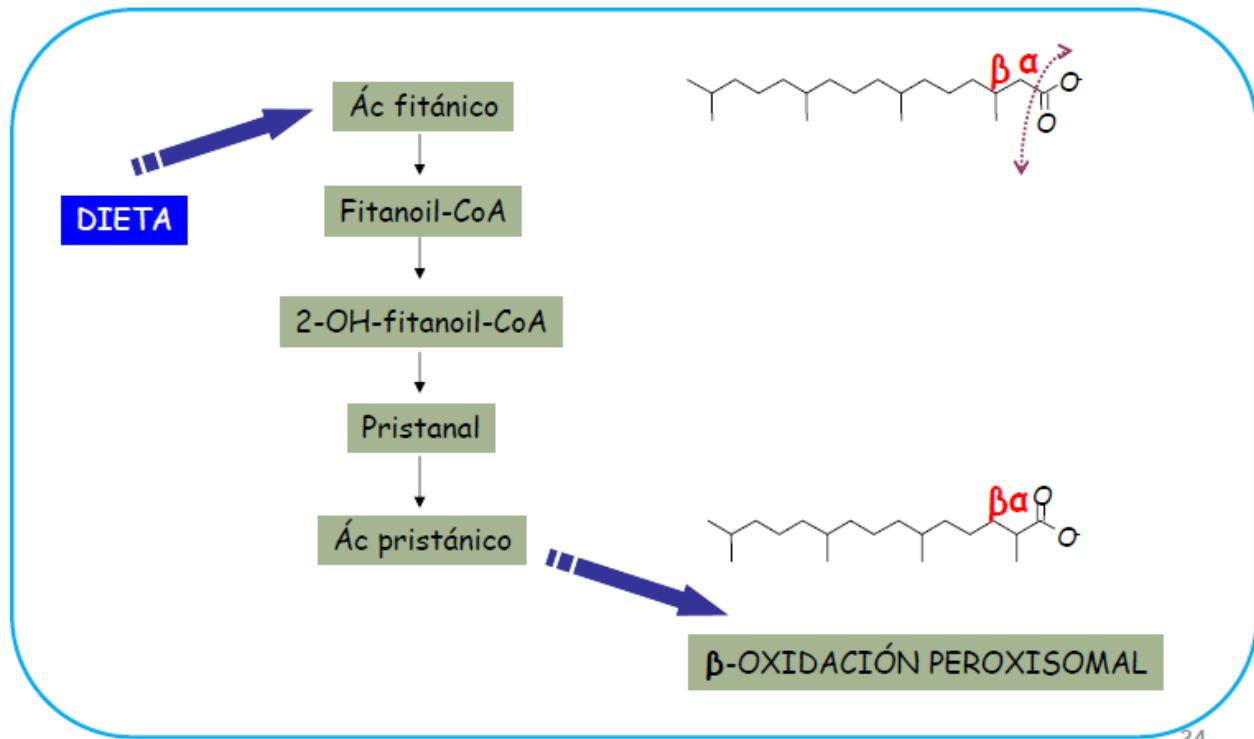
Se han encontrado defectos individuales en la acil-CoA oxidasa, la proteína D bifuncional y en alguna oxidasa de cadena ramificada.

En la β -oxidación peroxisomal, dependiendo de si el ácido graso es ramificado o muy largo, tendremos oxidadas diferentes. Sin embargo, la proteína D-bifuncional actúa en ambas vías.



α -oxidación peroxisomal

Se encarga de la degradación del **ácido fitánico** hacia **ácido pristánico**. El ácido fitánico tiene fundamentalmente una aportación dietética. El ácido pristánico, un **ácido graso con ramificaciones**, sufre una β -oxidación peroxisomal por la vía que se ha detallado anteriormente.

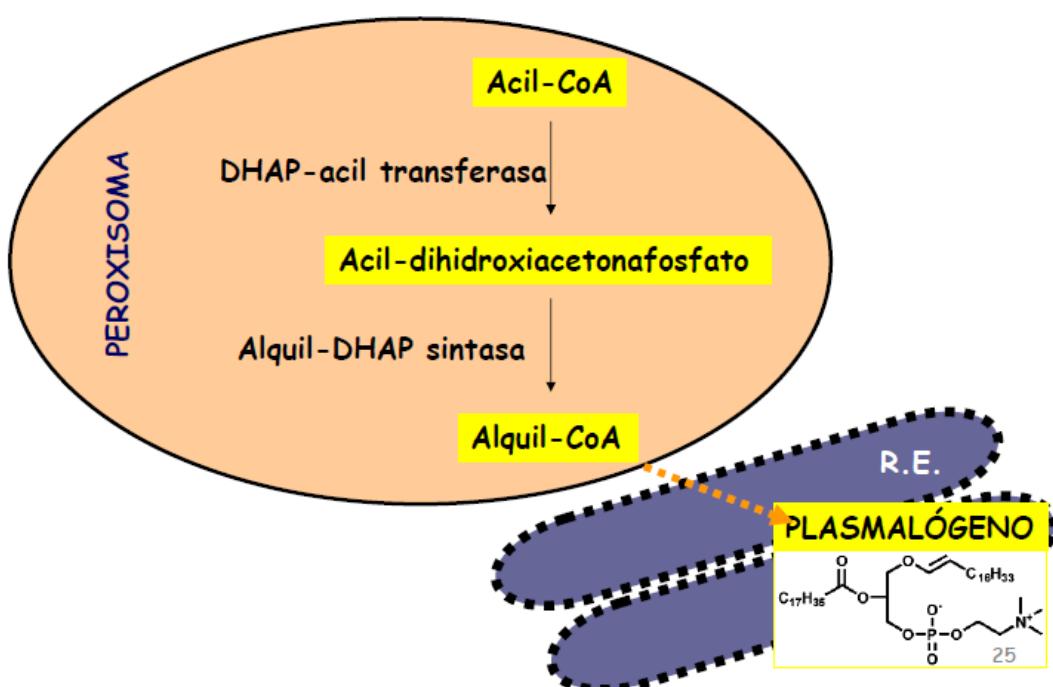


24

Biosíntesis de eterfosfolípidos

Se produce en el peroxisoma, **a partir de acil-CoA**. En el peroxisoma únicamente se producen los pasos de iniciación que transforman el **acil-CoA** en **alquil-CoA**.

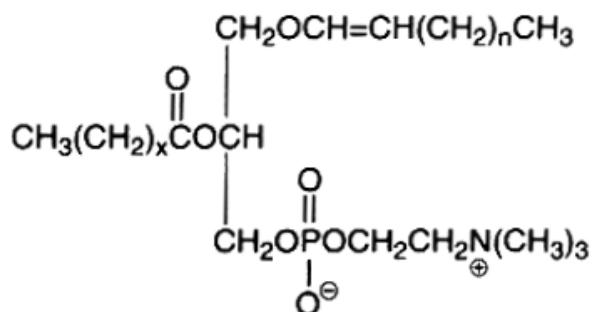
La síntesis completa de los plasmalógenos se continua en el retículo endoplásmico.



25



En algunos fosfolípidos existen grupos alquilo o 1-alquenilo unidos por enlace éter ($R-O-R'$). Entre los **lípidos-éster** que tienen 1-alquenilo destacan los plasmalógenos, abundantes en el tejido cardiaco de vertebrados y también en las membranas de ciertas bacterias y de invertebrados. En el grupo 1-alquenilo, n (ver figura) suele estar entre 13 y 15; el ácido graso del segundo carbono, que se une a través del típico enlace éster, suele tener de 16 a 18 carbonos ($x = 14-16$) y uno o dos dobles enlaces. En el tercer carbono, esterificadas en el fosforilo, suele haber colina o etanolamina.



En la mielina abundan los plasmalógenos de etanolamina, mientras que en el músculo cardiaco abundan los de colina

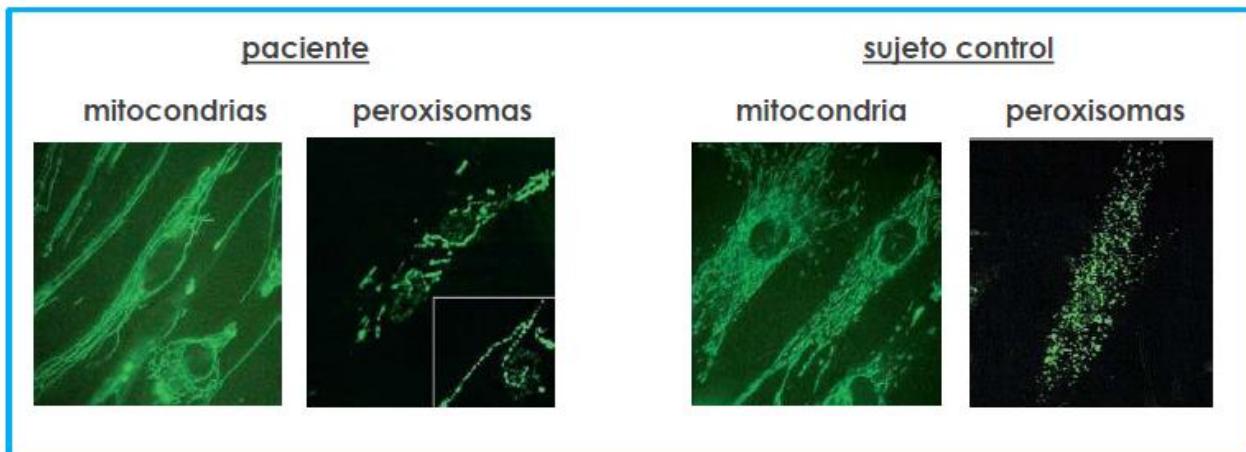
Clasificación de enfermedades peroxisomales

En una enfermedad que tiene que ver con el funcionamiento de los peroxisomas, **podemos tener casi cualquier defecto relacionado con cada una de las proteínas que tienen que ver con el mismo**. Es por ello que se ha optado por una clasificación que distinga entre aquellos defectos que están ligados a **fallos en la función peroxisomal** y aquellos que están ligados a fallos en la **biogénesis del propio peroxisoma**.

1. **Deficiencias en la función peroxisomal.** Afectan a una proteína de función peroxisomal concreta, es decir, son defectos que afectan a una única enzima.
 - a. **Defectos en la β-oxidación peroxisomal**
 - i. Adrenoleucodistrofia ligada al X
 - ii. **Deficiencia en la proteína D bifuncional**
 - iii. **Deficiencia en la acil-CoA oxidasa**
 - iv. **Deficiencia en 2-metilacil-CoA racemasa**
 - b. **Defectos asociados a síntesis de plasmalógenos**
 - i. **Condrodisplasia rizomélica punctata 2 y 3 (DHAP-acil transferasa y alquil-DHAP sintasa, respectivamente).** Tienen fenotipo clínico idéntico.
 - c. **α-oxidación peroxisomal**
 - i. **Enfermedad de Refsum por defecto en fitanoil-CoA hidroxilasa.** Tiene que ver con la acumulación de ácido fitánico.
 - d. **Defectos en la biosíntesis de isoprenoides**
 - i. Defectos en la **mevalonato quinasa peroxisomal**
2. **Defectos en la biogénesis del peroxisoma.** Afectan a **peroxinas**, por lo tanto, afectan a cómo los peroxisomas se forman y/o maduran.
 - a. **Espectro Zellweger.** Defecto fundamentalmente en la importación de proteínas con señales de tipo PTS1.
 - i. **Síndrome de Zellweger**, defecto generalizado.
 - ii. **Enfermedad de Refsum infantil**, patrón mosaico.
 - iii. **Adrenoleucodistrofia neonatal**, patrón mosaico
 - b. **Condrodisplasia rizomélica punctata clásica (TIPO 1) (RCDPI).** Bloque que sólo afecta a proteína PTS2. Las proteínas implicadas en la síntesis de plasmalógenos tienen PTS2.
3. **Defectos en la fisión.** Deficiencia en dinaminas. Lo mismo fisionan peroxisomas que mitocondrias. No todas las dinaminas tienen función.

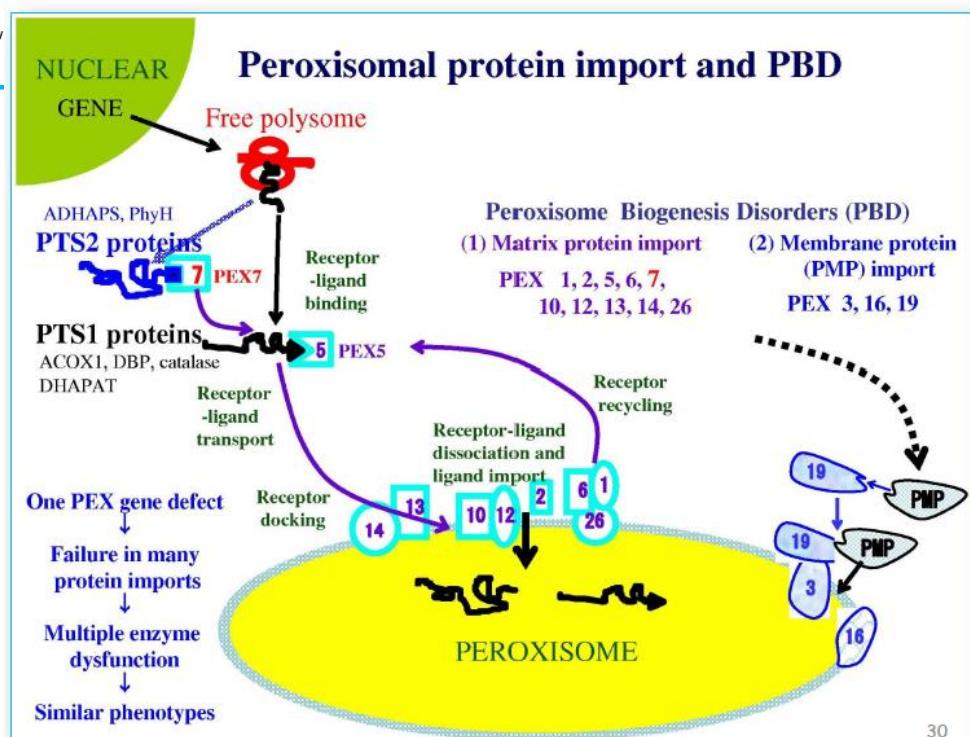
Los síntomas de defectos en la fisión son **microcefalia, atrofia óptica, desarrollo anormal del cerebro, acidosis láctica y aumento en los ácidos grasos de cadena muy larga C26:0**.

Las deficiencias en la síntesis de dinaminas afecta tanto a mitocondrias como a peroxisomas, encontrándose mitocondrias y peroxisomas alargados en el interior de las células de los pacientes afectados.



En el **spectro Zellweger** tenemos distintas presentaciones clínicas que varían en su gravedad, como el **Zellweger clásico**, la **adrenoleucodistrofia neonatal** y la **enfermedad de Refsum infantil**. Las afectación clínica depende de las mutaciones y de cómo se ve de afectada la proteína.

Disorders of peroxisome biogenesis					
•PBD group A:					
Zellweger spectrum disorders					
(1.) Zellweger syndrome	ZSD	214100	PEX1	PEX1	7q21.2
(2.) Neonatal adrenoleucodystrophy	ZS	214110	PEX2	PEX2	8q21.1
(3.) Infantile Refsum disease	NALD	202370	PEX3	PEX3	6q42.4
	IRD		PEX5	PEX5	12p13.3
			PEX6	PEX6	6p21.1
			PEX10	PEX10	1p36.32
			PEX12	PEX12	17q12
			PEX13	PEX13	2p14-p16
			PEX14	PEX14	1p36.22
			PEX16	PEX16	11p11.2
			PEX19	PEX19	1q22
			PEX26	PEX26	22q11.21
•PBD group B:					
(4.) Rhizomelic chondrodyplasia type I	RCDP-1	215100	PEX7	PEX7	6q21-q22.2
Disorders of peroxisome function					
•Fatty acid beta-oxidation					
(5.) X linked adrenoleukodystrophy	X ALD	300100	ALDP	ABCD1	Xq28
(6.) Aryl-CoA oxidase deficiency	ACOX deficiency	264470	ACOX1	ACOX1	17q25.1
(7.) D Bifunctional protein deficiency	DBP deficiency	261515	DBP/MFP2/MFEII	HSD17B4	5q2
(8.) Sterol-carrier protein X deficiency	—	—	SCPx	SCP2	1p32
(9.) 2 Methylacyl-CoA racemase deficiency	AMACR-deficiency	604489	AMACR	AMACR	5p12.3-q11.1
•Etherphospholipid biosynthesis					
(10.) Rhizomelic chondrodyplasia punctata Type 2	RCDP-2	222765	DHAPAT	GPNAT	1q42.1-42.3
(11.) Rhizomelic chondrodyplasia punctata Type 3	RCDP-3	600121	ADHAPS	AGPS	2q33
•Fatty acid alpha-oxidation					
(12.) Refsum disease	ARD/CRD	266500	PHYH/PAIX	PHYH/PAHX	10p15-p14
•Glyoxylate metabolism					
(13.) Hyperoxaluria Type 1	—	—	—	—	—
•Bile acid synthesis (conjugation)					
(14.) Bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase deficiency	—	—	—	—	—
•H ₂ O ₂ -metabolism					
(15.) Acatalasemia	—	—	—	—	—



Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades peroxisomales – 22-03-2019

La **condrodisplasia rizomélica de tipo I** tendría que estar relacionado con Pex7 y señales PTS2 de importación. Algunos defectos individuales son igual o más graves que los defectos múltiples, como las **condrodisplasias rizomélicas de tipo 2 y 3** (síntesis de plasmalógenos), siendo clínicamente muy parecidos.

Solamente tres proteínas tienen una señal PTS2. Una de ellas tiene que ver con la **biosíntesis de plasmalógenos**, otra con la **α -oxidación** y la tercera es la **3-cetoliolasa de ácidos grasos de cadena muy larga lineales**.

Table 2. List of bona fide peroxisomal (enzyme) proteins from humans and their PTS1 or PTS2 sequences

Peroxisomal function	(Enzyme) protein	PTS1/PTS2	Targeting sequence
Fatty acid β -oxidation	Acyl-CoA oxidase 1 (straight chain)	PTS1	-SKL
	Acyl-CoA oxidase 2 (branched chain)	PTS1	-SKL
	Acyl-CoA oxidase 3 (pristanoyl-CoA)	PTS1	-SKL
	L-bifunctional protein	PTS1	-SKL
	D-bifunctional protein	PTS1	-AKL
	3-ketoliolasa (straight chain)	PTS2	-RLQVVLGHL
	3-ketoliolasa (branched chain)	PTS1	-AKL
	2-methylacyl-CoA racemase	PTS1 (+MTS)	-(K)ASL
	Carnitine acetyltransferase	PTS1	-AKL
	Carnitine octanoyltransferase	PTS1	-THL
	Acyl-CoA thioesterase	PTS1	-SKL
	Bile acid-CoA:taurine/glycine conjugating enzyme	PTS1	-SQL
	2,4-dienoylCoA reductase	PTS1	-AKL
	$\Delta^{2,3}$ -enoylCoA isomerase	PTS1	-SKL
	$\Delta^{3,4}$ -dienoylCoA isomerase	PTS1	-SKL
	Very-long-chain acyl-CoA synthetase (VLACS)	PTS1	-LKL
Fatty acid α -oxidation	PhytanoylCoA hydroxylase	PTS2	-PLQIVLGHL
Etherphospholipid biosynthesis	2-hydroxyphytanoylCoA lyase	PTS1	-(R)SNMI
	Dihydroxyacetonephosphate acyltransferase	PTS1	-AKL
	Alkylhydroxyacetonephosphate synthetase	PTS2	-PLVLSGH
Glyoxylate detoxification	Alanine glyoxylate aminotransferase	PTS1	-KKL
Pipecolic acid degradation	L-pipecolate oxidase	PTS1	-AHL
H_2O_2 metabolism	Catalase	PTS1	-(K)ANL
	Peroxiredoxin V	PTS1	-SQL
	Sterol carrier protein 2	PTS1	-AKL
	D-aspartate oxidase	PTS1	-(K)SNL
	D-amino acid oxidase	PTS1	-SHL
	Hydroxyacid oxidase 3	PTS1	-SRL
	Hydroxyacid oxidase 2	PTS1	-SRL
	Hydroxyacid oxidase 1 (glycolate oxidase)	PTS1	-SKL
Others	3-hydroxy-3-methyl glutarylCoA lyase	PTS1 (+MTS)	-CKL
	MalonylCoA decarboxylase	PTS1 (+MTS)	-SKL
	Isocitrate dehydrogenase	PTS1	-AKL

PTS1, peroxisome-targeting signal type 1; PTS2, peroxisome-targeting signal type 2; MTS, mitochondrial targeting signal. In the right hand column, the different targeting sequences are shown using the single letter code for the various amino acids.³¹

↑ Su función puede ser suplida

Defectos en Pex7 produciría una falta de plasmalógenos en los eritrocitos, acumulación de ácido fitánico y **una ausencia de ácidos grasos de cadena larga en sangre**. Así, se diferencian entre un **espectro Zellweger de una condrodisplasia rizomélica punctata debido a que la 3-cetoliolasa de cadena ramificada es capaz de acortar el ácido graso de cadena lineal**. Así, aunque la 3-cetoliolasa de cadena lineal no es capaz de ser transportada al peroxisoma, los ácidos grasos de cadena lineal se siguen degradando.

Los defectos Zellweger y condrodisplasias rizomélicas se diferencian por la presencia de ácidos grasos de cadena larga.

Clínica de los pacientes de defectos de la biogénesis peroxisomal

Los pacientes que entran dentro del **espectro Zellweger** se dividen en tres categorías distintas, **todas ellas producidas por defectos en peroxinas**.

- **Síndrome de Zellweger.** Afectación más grave. Los niños mueren en el primer año de vida, después de haber tenido un desarrollo normal. Es un **deterioro progresivo dentro del primer año de vida**.
- **Adrenoleucodistrofia neonatal.** Suelen morir a los 10 años.
- **Refsum infantil.** Aparece en la adolescencia, **aguantando hasta la edad adulta**

Por otro lado, **los pacientes con condrodisplasia rizomélica puntada de tipo I presentan mutaciones en la proteína PEX7**. Esto produce un defecto en el importe de proteínas con señal PTS2 a la matriz peroxisomal.

Enfermedad	Abreviatura	Proteína implicada	Gen
Síndrome de Zellweger	ZS	Peroxinas	PEX- genes
Adrenoleucodistrofia neonatal	NALD	Peroxinas	PEX-genes
Refsum infantil	IRD	Peroxinas	PEX-genes
Condrodisplasia rizomélica puntada	RCDP tipo 1	Pex7p	PEX7

A las tres primeras se las considera '**ESPECTRO ZELLWEGER**' con el ZS como la forma más severa y las otras dos (Adrenoleucodistrofia neonatal y Enfermedad de Refsum) menos graves. Los pacientes con las formas más graves desde ZS a NLAD llegan a atención primaria en el periodo neonatal. Las pacientes con IRD suelen presentarse en la infancia tardía

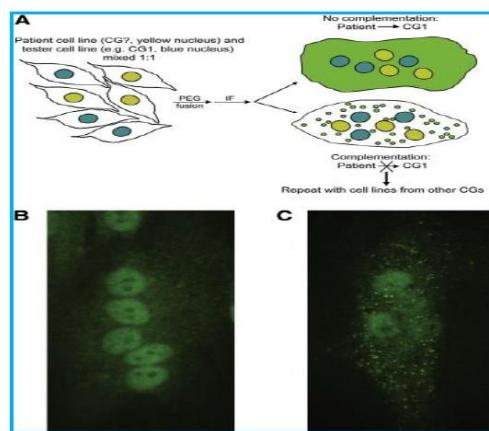
32

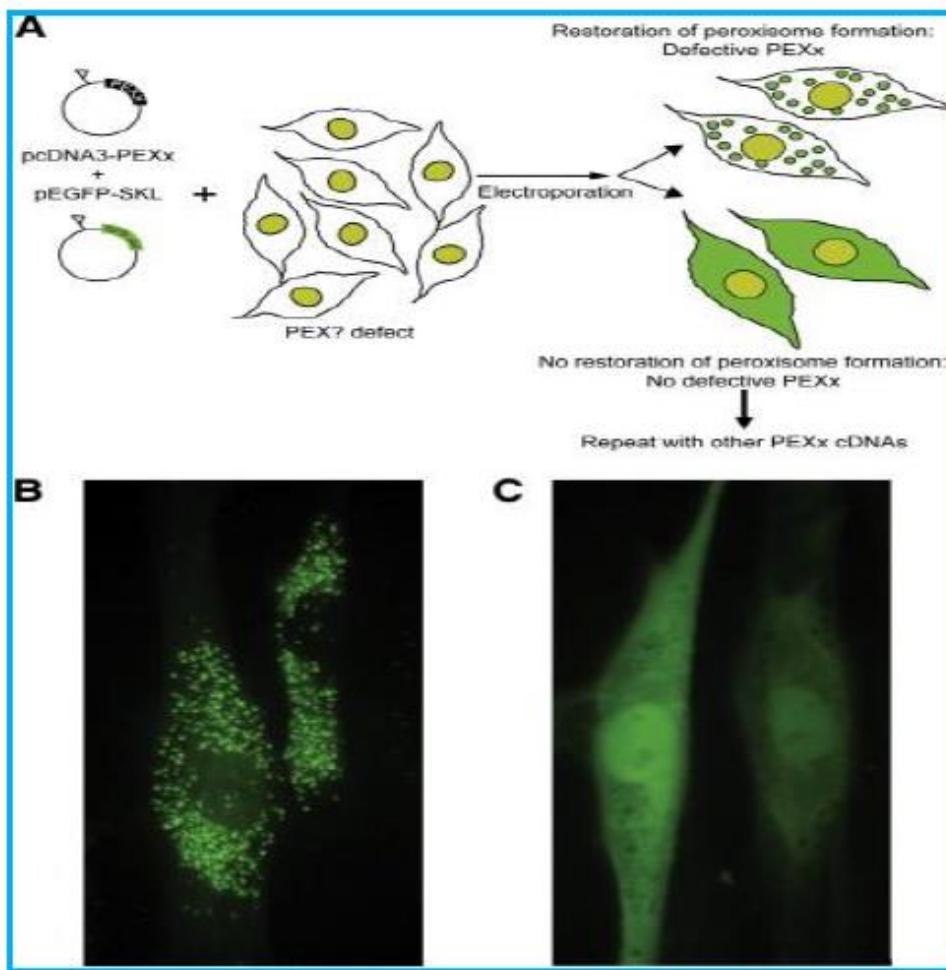
Para identificar las proteínas que estaban defectivas, **se han usado clásicamente dos tipos de aproximaciones**.

- **Experimentos de complementación celular somática.** Partiendo de líneas celulares de pacientes con un defecto conocido, **se producen fusiones celulares en las que se busca qué combinación de células prueba – paciente es la que no recupera la función**.

La combinación de células prueba-paciente que no recupera la función es aquella que nos dice qué peroxina es defectiva en estos pacientes.

- **Transfección de plásmidos con distintos cDNAs.**





El abaratamiento de la NGS ha hecho que esto sea mucho más rápido, de manera que se encuentran los genes. Muchas veces encuentras mutaciones que no sabemos si son responsables o no de la patología (mutación de sentido clínico incierto).

En los pacientes del **espectro Zellweger**, hay una frecuencia en la mutación de los distintos genes. Las más frecuentes son las mutaciones en **Pex1** y en **Pex6**.

No hay una relación tan directa entre la presentación clínica y el gen como con el tipo de mutación y el gen afectado, debido a que mutaciones en genes que a priori parecen muy importantes para la biogénesis del peroxisoma, **podrían ser hipomórficas, teniendo una alta actividad residual**.

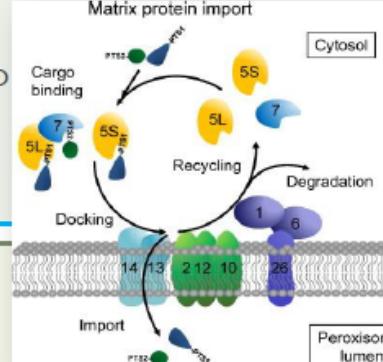
La mayor parte de los defectos Zellweger está en el gen PEX1, y los que no, en el gen PEX6. PEX1 y PEX6 están implicados en el **reciclaje de los receptores citosólicos, implicando tanto a PTS1 como a PTS2**. Esperamos de estos pacientes todo afectado, siendo un **espectro amplio**. Presentan así, **disminuciones en el número y tamaño de los peroxisomas**.

Por otro lado, **los pacientes con condrodisplasia rizomélica punctata sólo están afectados en la importación de proteínas de tipo PTS2**. La morfología de los peroxisomas es normal. **Los pacientes tienen anomalías más severas de hueso, oculares y un patrón diferente de daño cerebral**.

'ESPECTRO ZELLWEGER'

Mayoritariamente asociado a defectos en los genes PEX 1 y PEX 6 y que por tanto afecta a la importación tanto de proteínas PTS1 como PTS2

Presentan disminuciones en el número y tamaño de los peroxisomas



RCDP

Solo afecta a la importación de proteínas PTS2
La morfología de los peroxisomas es normal

Según esto, RCDP representaría un segmento de Espectro Zellweger sin embargo los pacientes tienen anomalías más severas de hueso, oculares y un patrón diferente de daño cerebral

37

Espectro Zellweger

El espectro Zellweger es un **continuo clínico desde la forma ZS hasta el Refsum Infantil**.

Hipertelorismo, ojos muy separados. Nariz chata. Aletas nasales anchas. Frente prominente.
Niños con problemas visuales. Desarrollan con frecuencia cataratas, desarrollan con frecuencia glaucomas.



Zellweger Syndrome (ZS)

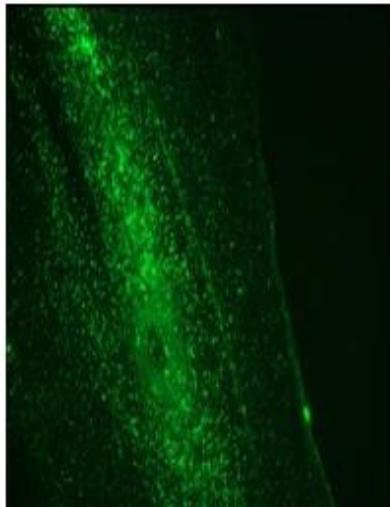
Infantile Refsum Disease

En los tres casos (ZS, adrenoleucodistrofia neonatal y síndrome de Refsum infantil) hay **daño hepático**. Las dismorfias craneofaciales son típicas, a la vez que las anomalías de tipo neurológico como la **hipotonía, retraso psicomotor, convulsiones, glaucoma, etc.** Es frecuente que sufran de **retinopatías, quistes renales y dismielinización (mielinización incorrecta)**.

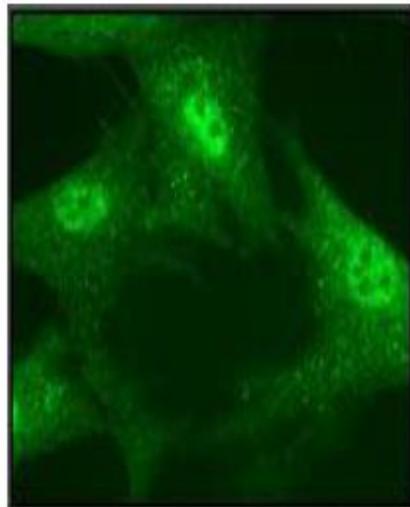
Los pacientes con síndrome de Zellweger tienen una patología cerebro-hepato-renal, teniendo daño a nivel cerebral, hepático y renal, **muriendo dentro del primer año de vida**. Tienen alteraciones neurológicas severas como **hipotonía, retraso psicomotor, convulsiones, glaucoma, dismielinización (composición de mielina shit) o desmielinización (a tomar por culo mielina)**.

El síndrome de Refsum se presenta con alteraciones neurológicas, quizá en el proceso de aprendizaje del lenguaje, pero la alteración neurológica va progresando y mueren en la edad adulta.

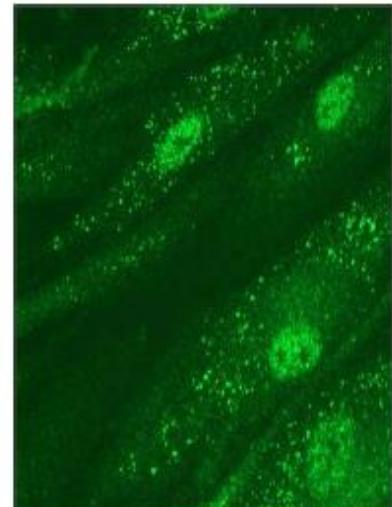
En el **espectro Zellweger**, el fentotipo se correlaciona con la severidad del defecto. Es por esto que hay una relación entre el fenotipo de los pacientes y el **número y tamaño de los peroxisomas de sus células**.



Control



ZS (localización nuclear de proteínas peroxisomales)



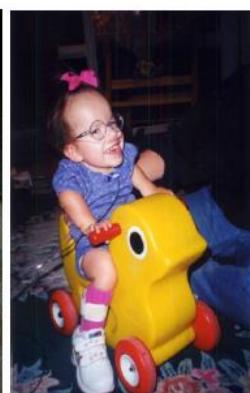
IRD

Suele haber **mosaicismo** en enfermedades peroxisomales, viendo patrones diferentes en distintos tejidos y en distintas células. Además, la presentación bioquímica puede complicarse.

Condrodisplasia rizomélica puntada de tipo I

Los pacientes con **condrodisplasia rizomélica puntada** tienen problemas oculares, desarrollan cataratas. Tienen además un acortamiento de las extremidades. Tiene hipertelorismo, nariz chata, aletas nasales anchas... No es solo un rasgo físico, sino que también desarrollan retraso mental variable.

Condrodisplasia Rizomélica Punctata (RCDP)



Acortamiento de huesos largos, fallo en el crecimiento, cataratas, articulaciones con calcificaciones punteadas (rayos X), retraso mental variable

Diagnóstico bioquímico de los pacientes con enfermedades de biogénesis peroxisomal

En cuanto al **diagnóstico bioquímico de los pacientes**, depende de la experiencia de cada laboratorio. Lo más habitual es sacar sangre de los pacientes y hacer un diagnóstico diferencial de metabolitos, **viendo los niveles de ácidos grasos de cadena muy larga en sangre**.

En un primer momento, **se realiza una determinación de los niveles de VLCFA en sangre, (C26:0 y la razón entre C26 y C33)**. Si los niveles están aumentados, **hay algún tipo de defecto de peroxisomas**.

Si además se observan niveles elevados de fitánico, pristánico, pipecólico y precursores de ácidos biliares, se sigue hacia una **determinación del nivel de plasmalógenos en los eritrocitos, sobre todo los de C16 y C18**.

Posteriormente, se seguiría a un **diagnóstico enzimático en fibroblastos o un diagnóstico genético**.

Si los niveles de C26 o razón C26/C22 está incrementada, algún tipo de defecto de peroxisomas.

Diferencias en la clínica y bioquímica entre el espectro Zellweger y la RPCD

Enfermedad de Zellweger

En cuanto a la presentación **clínica de la enfermedad**:

- **Fontanela aumentado e hipertelorismo**, que nos indican que no nos encontramos ante una enfermedad mitocondrial, sino más probablemente ante una peroxisomal. En algunos pacientes, **se puede llegar a ver una condrodisplasia punctata**. Mueren en el primer año de vida.

En cuanto a los parámetros medidos en el laboratorio, se encuentran:

- **Aumento de las enzimas hepáticas en sangre**
- **Quistes renales**
- **Displasia cerebral**

El diagnóstico se realiza por la modificación de una serie de parámetros bioquímicos, entre los que se encuentran:

- **C26 aumentado y razón C26/C22 muy alta. Plasmalógenos en hematíes baja.**
- **DHA en tejidos y sangre baja**. Debido a no poder sintetizarse en el peroxisoma.
- **THCA en orina y plasma alto**. Debido a no poder degradarse en el peroxisoma.
- **Fitánico y pristánico alto en plasma o incluso normal, dependiendo de la dieta**

Condrodisplasia rizomélica punctata

La clínica cursa con:

- **Acortamiento de los huesos largos, fallo en el crecimiento, cataratas y articulaciones con calcificaciones punteadas. Retraso mental.**

Se ha de hacer un **diagnóstico diferencial entre las condrodisplasias de tipo 1 (defectos en la biogénesis peroxisomal) y de tipo 2 y 3 (defectos funcionales del peroxisoma)**.

- **Tipo 1.** Deficiencia **parcial** en la biogénesis del peroxisoma, por fallo en Pex7.
 - Los plasmalógenos en hematíes son bajos (no se produce su síntesis inicial), el fitánico en plasma es alto (no se puede degradar). Se realiza un **análisis genético de mutaciones en PEX7**.
- **Tipo 2 y 3.** Deficiencia en la síntesis de plasmalógenos por defectos en las enzimas **DHAP acil transferasa o alquil DHAP sintetasa**. Los plasmalógenos en hematíes **son bajos**, mientras que el fitánico es normal siempre (incluso si la dieta lo contiene).

Se realiza un análisis enzimático y genético.

Así, la presencia o no de fitánico en sangre dictamina si nos encontramos ante una condrodisplasia rizomélica punctata de tipo 1 o de tipos 2/3.

- **Si el fitánico está aumentado**, nos encontramos ante una CRP de tipo 1
- **Si el fitánico es normal**, podemos encontrarnos ante cualquiera de las tres, debido a que los niveles de fitánico dependen de la dieta. Si la dieta es pobre en fitánico, incluso un tipo 1 tendría niveles bajos del mismo en sangre.

PEX Clinical Phenotype	VLCFA	Phytanic acid	Plasmalogens
ZS	↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑	↓ ↓ ↓
NALD	↑ ↑	↑ ↑	↓ ↓
IRD	↑	↑	↓
RCDP	Normal	↑ ↑ ↑	↓ ↓ ↓
Mild RCDP	Normal	↑ ↑ ↑	↓ ↓
ARD	Normal	↑ ↑ ↑	Normal

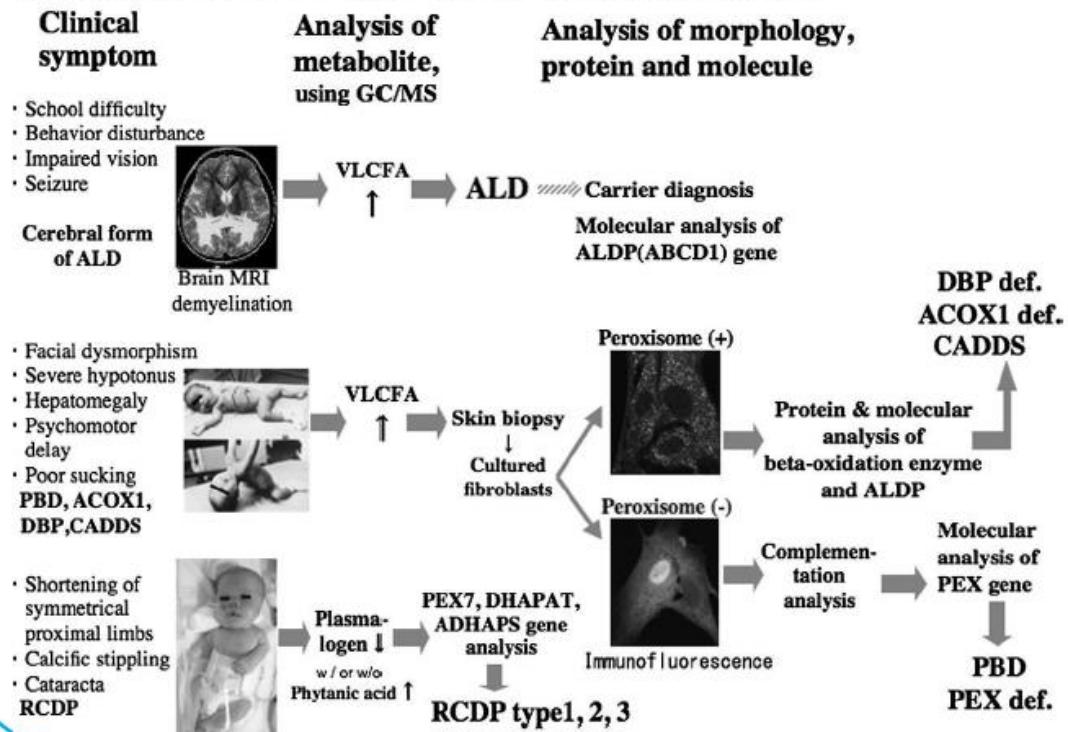


¿Es un defecto de biogénesis peroxisomal?

Entendemos el diagnóstico diferencial:

El algoritmo diagnóstico depende de la disponibilidad de tejido y metodología

Flowchart for the diagnosis of peroxisomal diseases



45

Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades peroxisomales – 25-03-2019

Enfermedades de defectos individuales

Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (X-ALD)

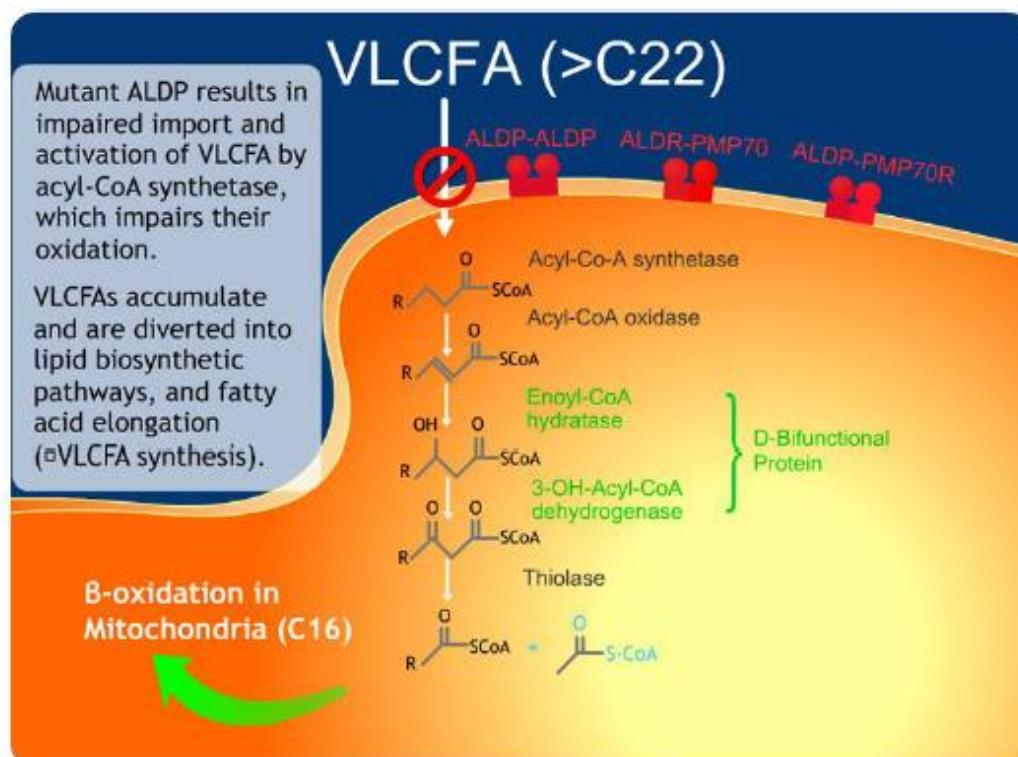
La adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (X-ALD) es la **patología de origen peroxisomal** que tiene más estudios hechos a nivel de **patofisiología y terapia génica**. Se trata de un **defecto en la β-oxidación peroxisomal de los ácidos grasos**. La proteína deficiente es la **ALDP (adrenoleukodystrophy protein'**, perteneciente a la familia de transportadores ABC, **de la misma familia que el CFTR**.

El gen con las mutaciones es el gen **ABCD1**, que **mapea en el cromosoma Xq28**. Hay más de 1000 mutaciones. Tiene una incidencia de 1/17.000 pacientes y aparece en **todos los grupos étnicos**.

Además de esta proteína, **en la membrana del peroxisoma hay otros transportadores ABC, que transportan otros ácidos grasos (los derivados del DHC, THC...)**. Todos pertenecen a la misma familia.

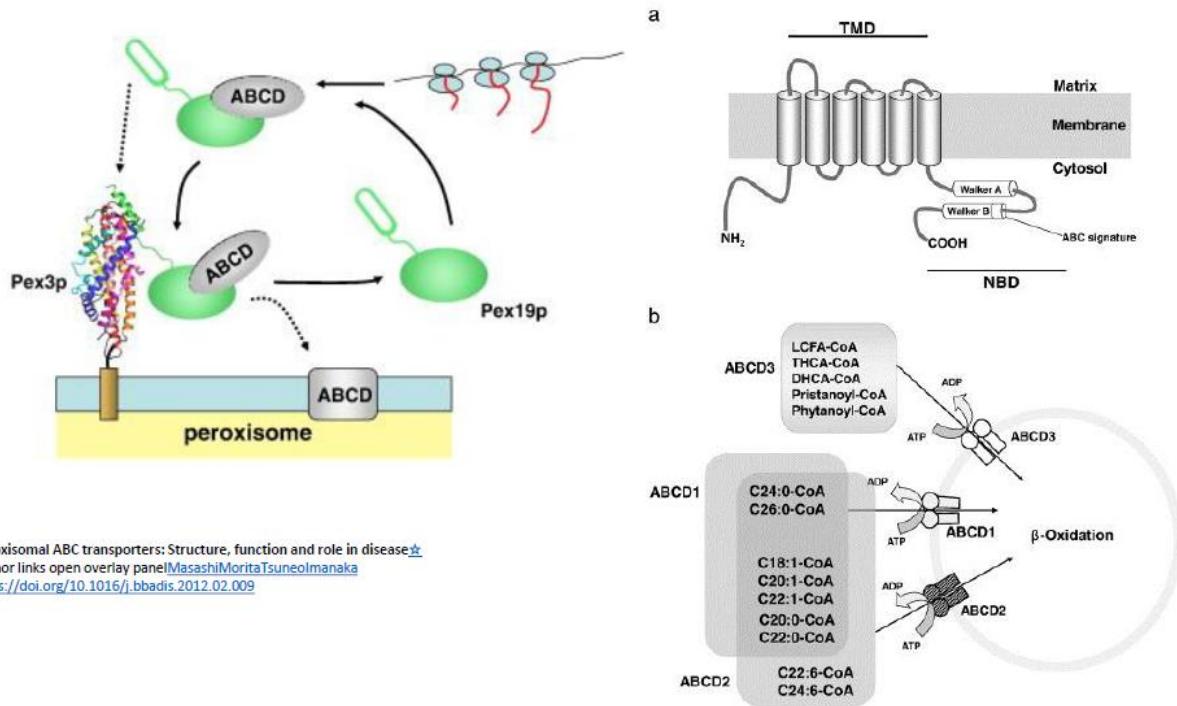
La aparición de una ALDP mutante resulta en un **transporte de los ácidos grasos de cadena larga**. Los VLCFAs se acumulan y se dirigen hacia **vías biosintéticas y de elongación del ácido graso**.

El papel de la ALDP ha sido controvertido ¿qué es lo que transporta?. Se la considera que mayoritariamente transporta acil-CoA.



Principalmente, como proteína de membrana lisosomal, se transporta por medio de Pex19 mediante docking con Pex3. Una vez insertada en la membrana, puede realizar su función.

El ABCD1 tiene una actividad de incorporación de acil-Coa bastante amplia. Otros dos transportadores en ocasiones tienen **actividades solapantes**. Estas actividades solapantes parecen que podrían explicar el fenotipo tan variable que tienen los pacientes con X-ALD.



Estos transportadores funcionan como **homodímeros**, con un dominio transmembrana y una **región específica que da al citosol para conferir la especificidad en el transporte**. La existencia de esos tres transportadores a nivel de membrana planteó que de alguna forma, esto pudiese explicar el fenotipo variante.

Los pacientes con X-ALD tienen fenotipos muy variados. Algunos casos pueden llegar a ser asintomáticos. Lo más frecuente es que tengan **insuficiencia suprarrenal, el equivalente a una enfermedad de Addison**. Esto suele aparecer a cualquier edad.

Otro grupo de pacientes tienen una **adrenomieloneuropatía**, afectando a la **mielina de los nervios periféricos**. Por último, hay un grupo de pacientes en torno al 35% del total que tienen la forma más grave, **teniendo daño cerebral**.

FORMA CLÍNICA	INICIO SÍNTOMAS	AFEC. NERVIOSA	PROGRESIÓN	
Cerebral infantil (X-ALD)	3-10 años	cerebro	rápida	X-ALD cerebral Con fuerte desmielinización inflamatoria
Cerebral adolesc.	10-21	cerebro	rápida	
Cerebral adulto	>21	cerebro	rápida	
Adrenomielo-neuropatía (AMN)	20-40	médula espinal	lenta	AMN Neuropatía periférica sin neuroinflamación cerebral
Insuficiencia Suprarrenal (Addison)	cualquier edad	NO	-	
Asintomático	??	NO	-	

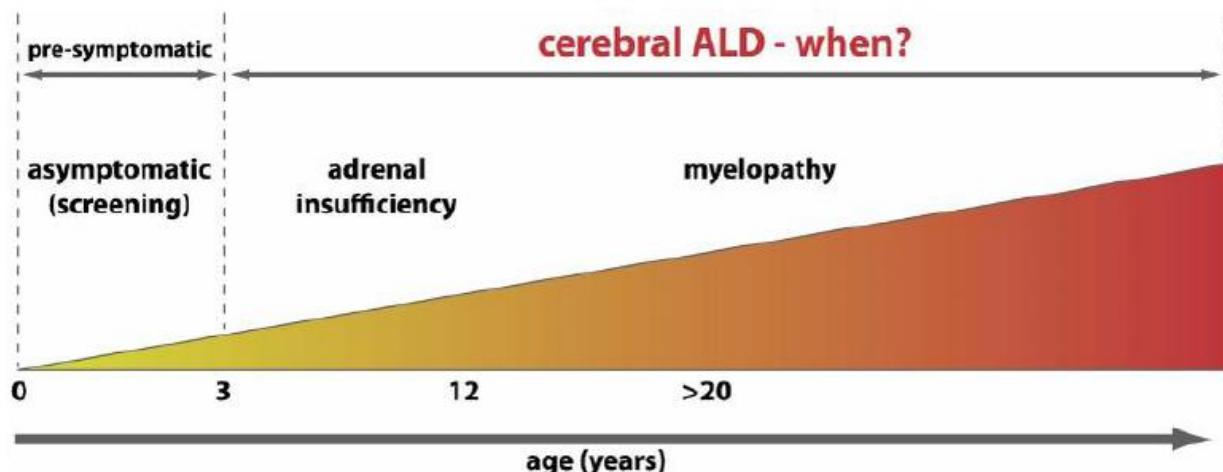
Los más graves de la forma cerebral, con distintos fenotipos y gravedades dependiendo del inicio de la enfermedad (infantil, adolescente o adulta). Sin embargo, independientemente del momento de inicio de la patología, **todas las afectaciones cerebrales tienen una progresión rápida**.

Incluso dentro de una misma familia, podemos tener fenotipos muy variados. A partir de esta variabilidad fenotípica tan grande, se comenzó a pensar que la funcionalidad deficiente podría estarse cubriendo. En este momento, **podría parecer que se puede solapar y suplir parcialmente el defecto**.

La enfermedad no es estática. La mayor parte de los pacientes comienza a vivir sin síntomas, apareciendo en un momento determinado la patología. Los síntomas de X-ALD pueden evolucionar o no con efectos. El **niño puede nacer asintomático y a medida que va pasando el tiempo pueden comenzar a aparecer los síntomas**.

Los pacientes de X-ALD son asintomáticos al nacimiento y casi todos los pacientes varones **desarrollan una insuficiencia adrenal en la infancia**, que progresará hacia neuropatía periférica en la edad adulta. **Un subgrupo de pacientes desarrolla desmielinización cerebral antes de los 18 años**.

Lo normal es que aparezca a los 3 años, pero desde la insuficiencia adrenal se puede ir hacia la adrenomielopatía. El daño cerebral puede aparecer desde los 3 años en adelante.



Es la típica enfermedad en la que es **fundamental hacer un diagnóstico presintomático**, porque sobretodo para las formas más graves, **si se tratan en una etapa muy inicial se puede cambiar la evolución de la patología**.

El problema de la enfermedad es que la persona se desarrolla con **una insuficiencia adrenal tratable y que posteriormente se puede producir una neurodegeneración fulminante**.

El diagnóstico tiene distintas fases:

- **Sintomático.** La insuficiencia suprarrenal podría ser un dato, **pero esto también es propio de una enfermedad de Addison**.

Los síntomas neurológicos son **pérdidas (capacidad cognitiva, visión, auditiva)**, paraparesia espástica (individuos que dejan de poder mover las piernas o los brazos), epilepsia, demencia, leucodistrofia, electroencefalograma anormal, afectación nerviosa periférica.

- **Bioquímica.**

Incrementos muy altos de **C26 y razones C24/22 o C26/22 muy incrementadas**. Con esto solo no podemos diagnosticar, sino que hay que hacer estudio diferencial para el fitánico, pristánico y precursores de los ácidos biliares.

Las portadoras también tienen esos niveles incrementados, pero más suaves.

CLÍNICA

pérdida capacidad cognitiva
pérdida de visión, pérdida auditiva
paraparesia espástica, epilepsia,
demencia
insuficiencia suprarrenal, leucodistrofia
electroencefalograma anormal
afectación nerviosa periférica

DIAGNÓSTICO

Bioquímico: concentraciones **C26:0** y razones (**C24:0/C22:0** y **C26:0/C22:0**) ↑↑
Genético: mutaciones gen **ABCD1**
Las mujeres portadoras tienen niveles incrementados de VLCFA en plasma

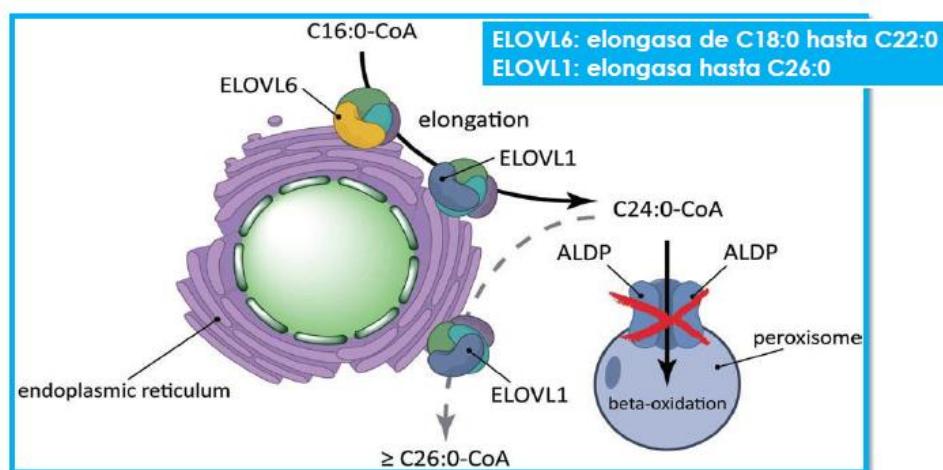
Origen de los VLFA en X-ALD

Son parcialmente procedentes de la dieta. Pero el resto son producto del propio metabolismo celular. La acumulación de ácidos grasos de cadena larga que no pueden entrar en el peroxisoma produce una **elongación del ácido C18:0 catalizada por elongasas de ácidos grasos muy largos**.

El ácido graso de 22 carbonos se pega al retículo citosólico, con elongasas, que incrementan el tamaño del ácido graso. En vez de ser de 22 o de 24, pasan a ser hasta de 26. Hay dos elongasas diferentes implicadas.

La aparición de esos ácidos grasos son el resultado del metabolismo celular, **que al no poder catabolizar los ácidos grasos en el peroxisoma lo sigue aumentando de tamaño**.

Fibroblastos de pacientes de X-ALD **acumulan AG C26:0 incluso en medio delipidado**. Un defecto en X-ALD al tiempo que impide la β-oxidación peroxisomal incrementa los niveles de VLCFA-CoA de 24 carbonos, que incrementarán su tamaño hasta llegar a los C26:0.



Patogénesis de la X-ALD

La acumulación de los ácidos grasos de 26 carbonos tiene cierta toxicidad asociada. Esta puede desglosarse en:

- **Disfunción adrenocortical.** La corteza suprarrenal no funciona correctamente. La exposición de las células de la corteza adrenal a C26 reduce su respuesta al estímulo por la adrenocorticotropina. La incorporación de C26 a los lípidos de membrana produciría desestabilizaciones.
- Desde esta disfunción adrenocortical casi todos evolucionan hacia una desmielinización de nervios periféricos. Sólo unos cuantos llegan a desmielinización cerebral.

Los peroxisomas son abundantes en los oligodendrocitos implicados en la síntesis de la mielina. La mielina de los pacientes con X-ALD acumula un exceso de VLCFA en gangliósidos, fosfatidil colina y proteolípidos, que podría contribuir a desencadenar la respuesta inmune.

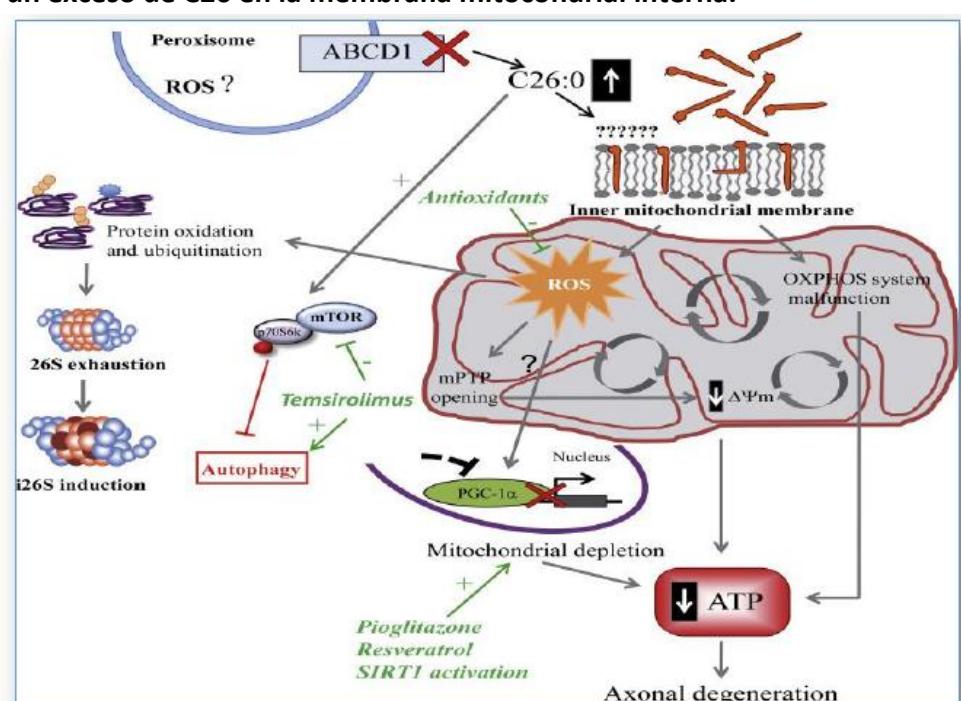
También, una respuesta inflamatoria perivascular contribuiría a la desmielinización.

A parte de todo esto, tenemos una **disfunción mitocondrial**. Se ve una disfunción mitocondrial severa asociada a un **incremento de ROS**, que podría ser el reflejo de la incorporación de los C26 a las membranas de la mitocondria.

La caída en los niveles de ATP, además, produciría una apertura del poro de transición mitocondrial relacionado con la presencia de un exceso de C26 en la membrana mitocondrial interna.

Ese C26 podría estar afectando al ensamblaje de complejos respiratorios. Se produce depleción de DNA mitocondrial. Pero no está activada la señal de autofagia, con lo cual se acumulan las mitocondrias disfuncionales.

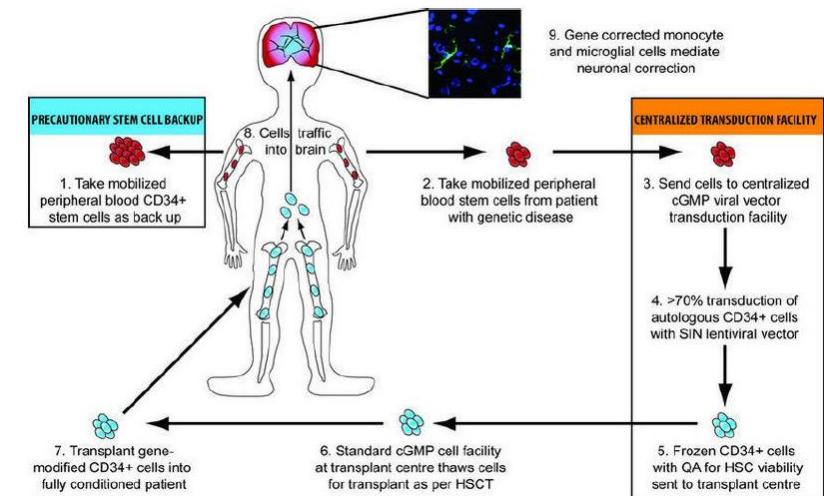
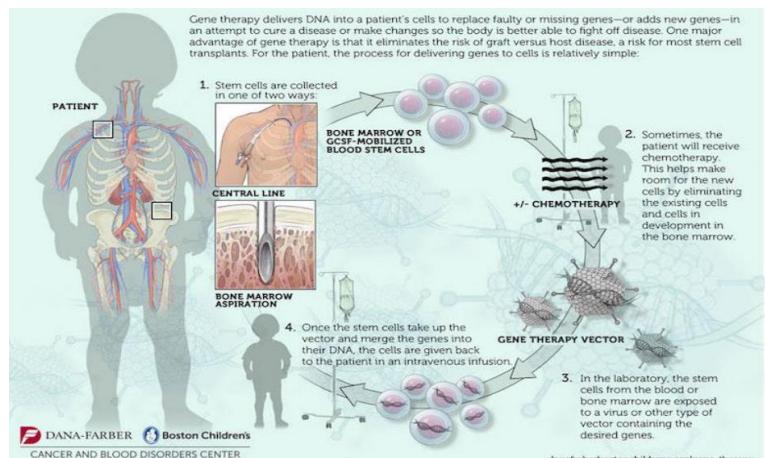
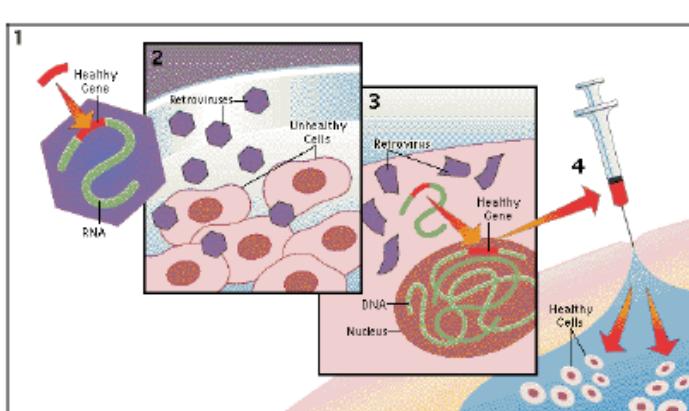
Toda esta cascada, además de la acumulación de mitocondrias disfuncionales, produce una **inhibición de la biogénesis de la mitocondria mediada por SIRT1/PGC-1 α y PPAR γ** . El efecto último es la degeneración axonal.



Dando temsirolimus, que inhibe mTOR y favorece la autofagia, favorece la eliminación de las células en proceso oxidativo. Dar también antioxidantes. Pioglitazona y resveratrol mejoran la biogénesis mitocondrial.

Tratamiento

- **Dietético**
 - Restricción de **alimentos ricos en VLCFA**. Disminuye los niveles plasmáticos de VLCFA en sangre, **sin mejoría clínica**.
 - **Sintomático**. Se usan tranquilizantes, como el hidrato de cloral.
 - **Agonistas adrenales**, como la hidrocortisona..
 - **Estatinas**. Disminuyen los niveles de VLCFA, sin mejoría clínica. Mejoran la biogénesis peroxisomal.
 - **Transplante alogénico de células madre hematopoyéticas**. Este transplante funciona si lo hacemos antes de que los pacientes tengan sintomatología. **Células de la serie blanca de la sangre procedentes de la médula llegan al cerebro y se convierten en glía, generando allí proteína ALD normal**. No efectivo en forma AMN.
 - **Terapia génica**. Por medio de transplante de **CD34+ circulantes**. Confiar en que haya una pequeña proporción de células madre que sean capaces de migrar y evitar el daño cerebral.
- En medio, se hace una quimioterapia, para dejar espacio para las células propias no modificadas. Actualmente, en trial clínico.

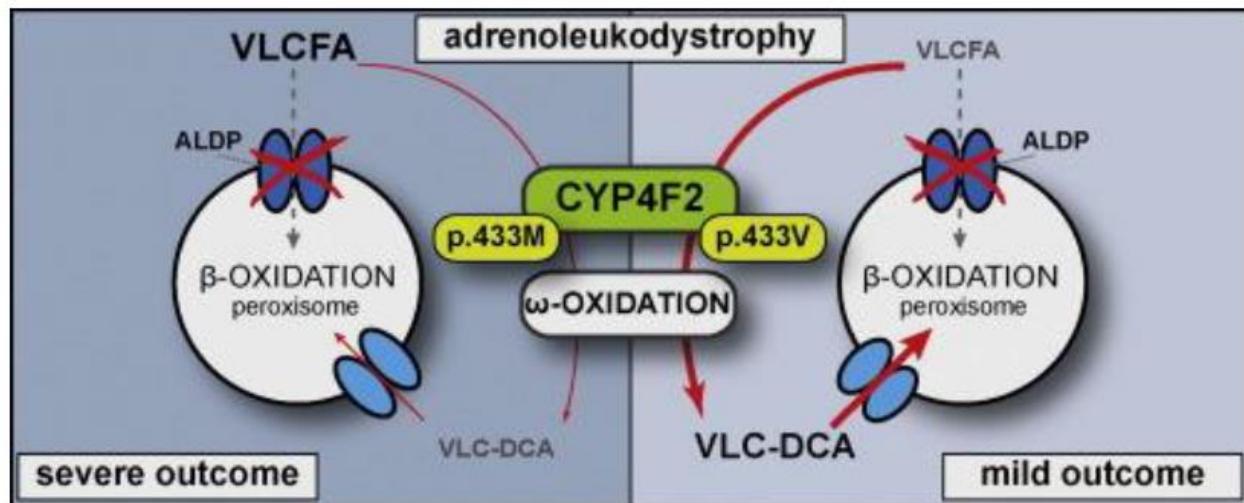


- **Búsqueda de nuevas dianas farmacológicas**. Uso de **gemfirbozilo** como inhibidor de la elongasa ELOVL1.

- Tratamientos con antioxidantes.

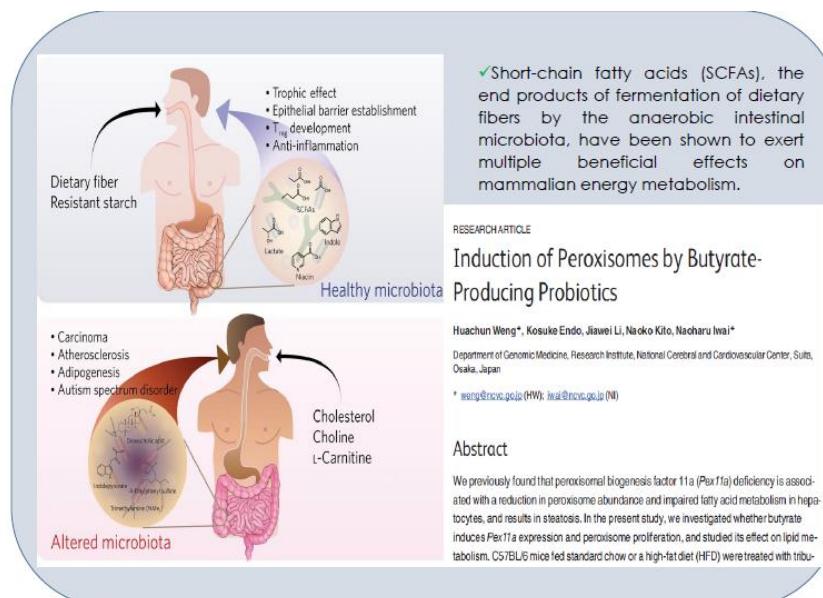
Una alternativa que se postula es el favorecimiento de la ω -oxidación de los ácidos grasos. El citocromo CYP4F2 se postula como un **gen modificador de fenotipo para pacientes ALD, por su papel en la ω -oxidación de los VLCFA**. Esta, podría ser una **ruta de escape para la β -oxidación de VLCFA en X-ALD**.

Esta aproximación permitiría transformar a los ácidos grasos de cadena larga en **ácidos grasos dicarboxílicos**, introduciéndose posteriormente en los peroxisomas para su degradación completa. La ω -oxidación primaria **ocurre en los microsomas**.



Otras terapias desarrolladas para corregir los defectos metabólicos o moleculares suelen ser:

- Restricción dietética del ácido fitánico (para que no se transforme en pristánico y no pueda ser degradado)
- Reducción en la dieta de los VLCFA
- Incrementos en la α -oxidación de VLCFA
- Suplementos nutricionales con DHA, ácidos biliares y plasmalógenos (dependientes de la β -oxidación peroxisomal para ser sintetizados)
- Inducción de la proliferación de peroxisomas (de modo que se compense con los otros transportadores o con un transportador con actividad residual baja)
- Incremento de actividad en la proteína Pex deficiente.



Bases Moleculares de la Patología

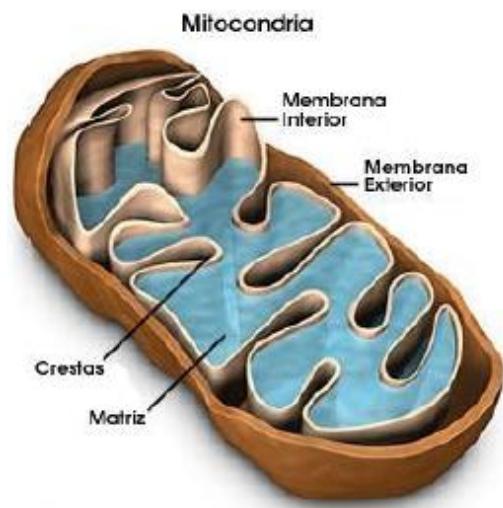
Enfermedades mitocondriales – 26-03-2019

La mitocondria

La mitocondria es un **órgánulo esencial para la producción de energía** en forma de ATP por medio de la **fosforilación oxidativa**. A su vez, en su interior se dan varias rutas metabólicas de importancia vital para la célula como el **ciclo de Krebs o la β-oxidación de los ácidos grasos**.

Está implicada en el **ciclo de la urea, el metabolismo del hierro, la síntesis y degradación de los aminoácidos, procesos de muerte celular, señalización mediada por especies reactivas de oxígenos y homeostasis del calcio**.

Se trata de un **órgánulo subcelular de doble membrana con su propio DNA**. La membrana mitocondrial interna es **altamente impermeable**, por ello se precisa la **presencia de transportadores mitocondriales específicos que permiten la comunicación entre la matriz el citosol**. Dicha comunicación es **esencial para el metabolismo celular**.



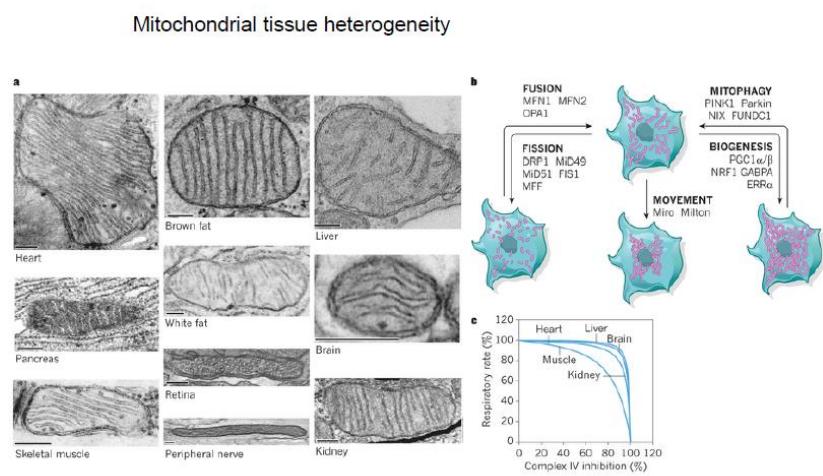
Mitocondria y heterogeneidad

Hay una **gran heterogeneidad en morfología, estructura y número de mitocondrias entre tejidos**. Dentro de un mismo tejido, **hay una gran plasticidad entre mitocondrias, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, ratio ATP/ADP, necesidad energética...**

Esta estructura está gobernada por **procesos de fusión de mitocondrias y procesos de fisión antes de cada división celular**. Hay una serie de genes que gobiernan tanto fusión como fisión. Cuando hay mitocondrias disfuncionales, **hay una serie de genes que regulan la mitofagia**.

Cuando se precisan más mitocondrias se activan una serie de reguladores como el **PGC1α** para producir una replicación del **mtDNA**. Hay procesos que además, producen un **movimiento de las mitocondrias**.

Mutaciones genéticas en cualquiera de los genes nucleares van a modificar la funcionalidad de la mitocondria, estando implicadas en distintos tipos de enfermedades.



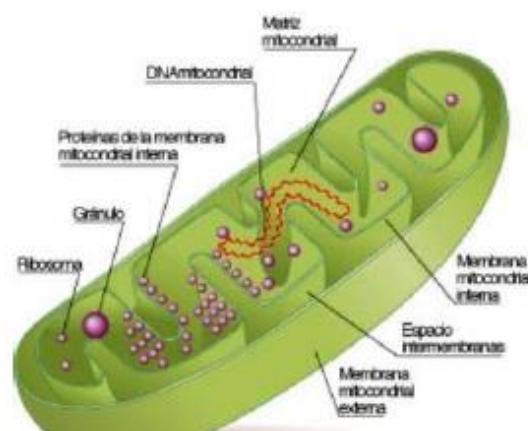
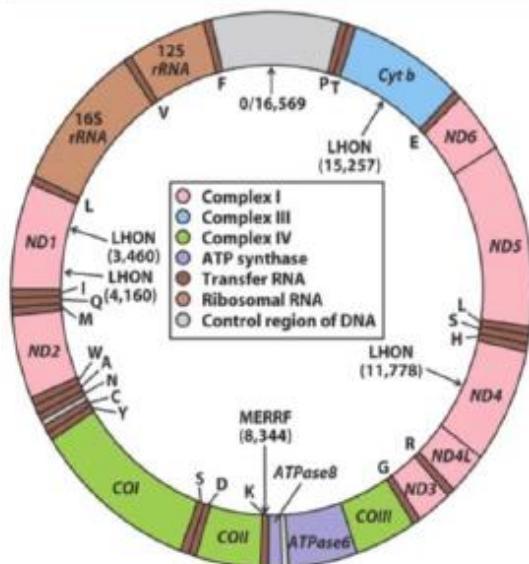
Genoma mitocondrial humano

El genoma mitocondrial consta de una molécula de DNA circular cerrado, de aproximadamente 17 kB. Codifica para 13 proteínas estructurales de los complejos respiratorios, 22 tRNA y 2 rRNA. No hay intrones, reflejando el origen endosimbiótico.

La cantidad de mitocondrias dependerá del requerimiento energético del tejido:

- Plaquetas → 4 mitocondrias por célula
- Neuronas → Miles
- Cardiomiocitos → Decenas de miles

Genoma mitocondrial humano



Dentro de una mitocondria, **puede haber unas 5 copias de DNA mitocondrial por cada orgánulo**. En el núcleo hay 2 copias cromosómicas. El DNA mitocondrial se replica independientemente del ciclo celular, pudiéndose replicar tanto en células en división como postmitóticas.

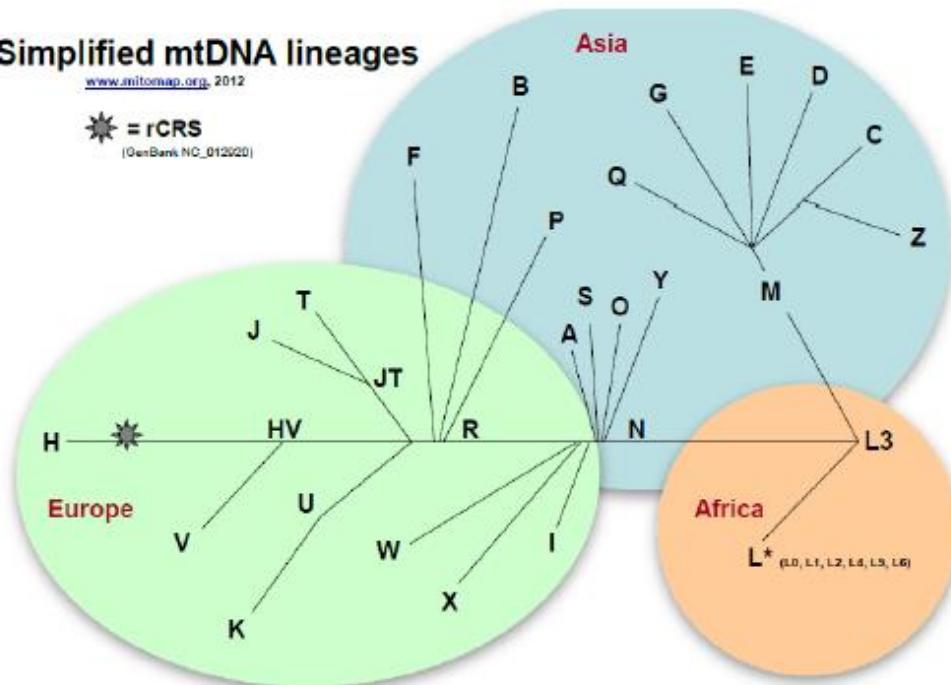
La segregación mitótica es **al azar**. Otra de las características del DNA mitocondrial es que su **tasa de mutación es mucho más alta**. Los sistemas de reparación son ausentes o muy poco eficientes y hay un estrés oxidativo muy alto. El DNA mitocondrial no está protegido por histonas, además.

Ha habido una serie de mutaciones en el DNA mitocondrial a lo largo de la historia evolutiva, **habiendo un genoma mitocondrial de referencia**. En el DNA mitocondrial también hay haplotipos, denominados **haplogrupos**. Estos haplogrupos se heredan en bloque. Con respecto al genoma de referencia hay una serie de haplogrupos repartidos entre las distintas poblaciones.

Seguir estos haplogrupos es interesante en epidemiología genética, pudiendo ver cómo migraron las poblaciones humanas.

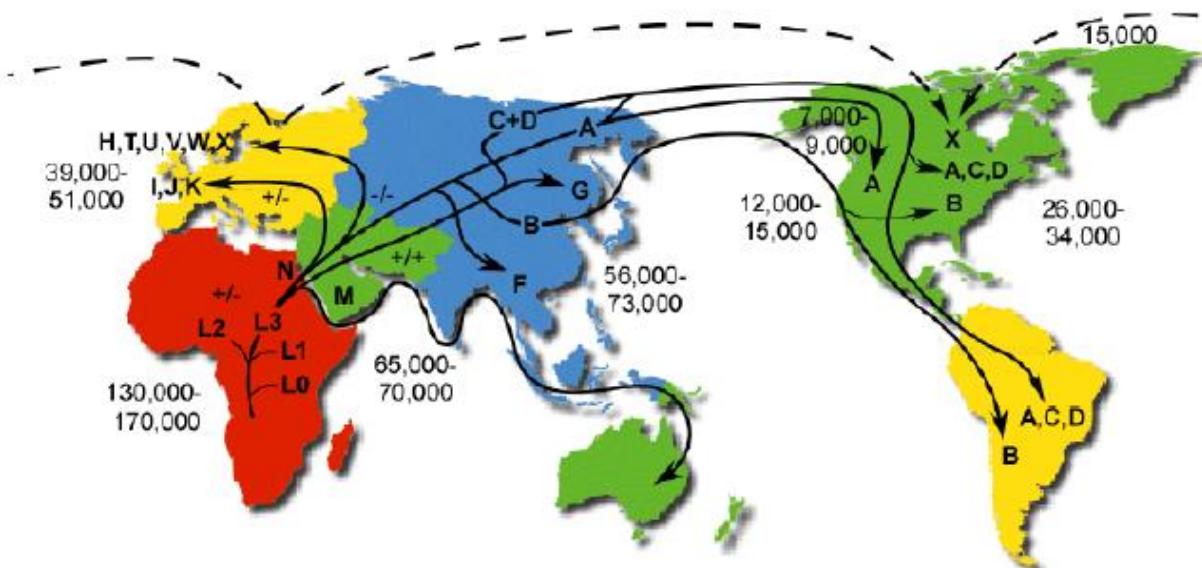
Simplified mtDNA lineages

www.mitomap.org, 2012
 ☀ = rCRS
 (GenBank NC_012920)



Human mtDNA Migrations

From <http://www.mitomap.org>



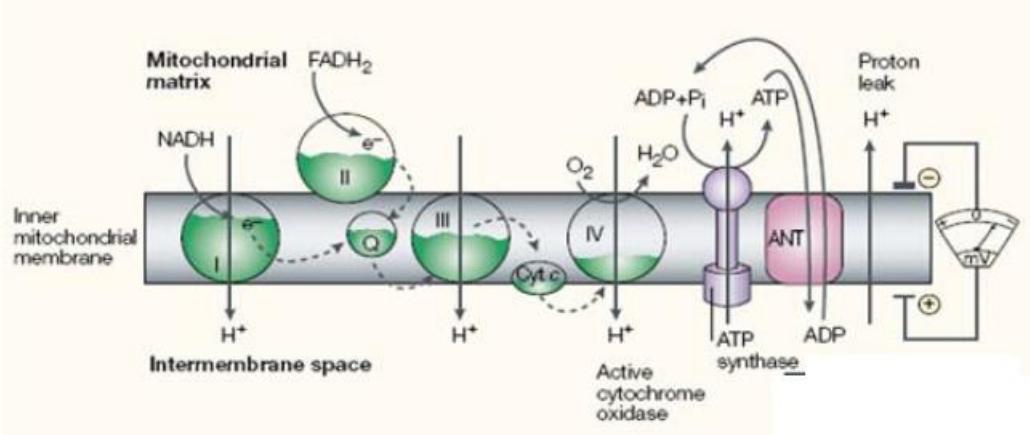
Symbols +/-, +/+, and -/+ represent
RFLP status for Dde I 110394 / Alu I 110397

Mutation rate = 2.2 - 2.9 % / MYR
Time estimates are YBP

Enfermedad mitocondrial

Se llama así a una enfermedad cuando está afectada el **proceso de fosforilación oxidativa**. Esto tiene **varias consecuencias: disminuye el ΔV , hay un déficit energético; hay un aumento de ROS y hay una alteración en la homeostasis mitocondrial del calcio.**

CADENA RESPIRATORIA



COMPLEJOS

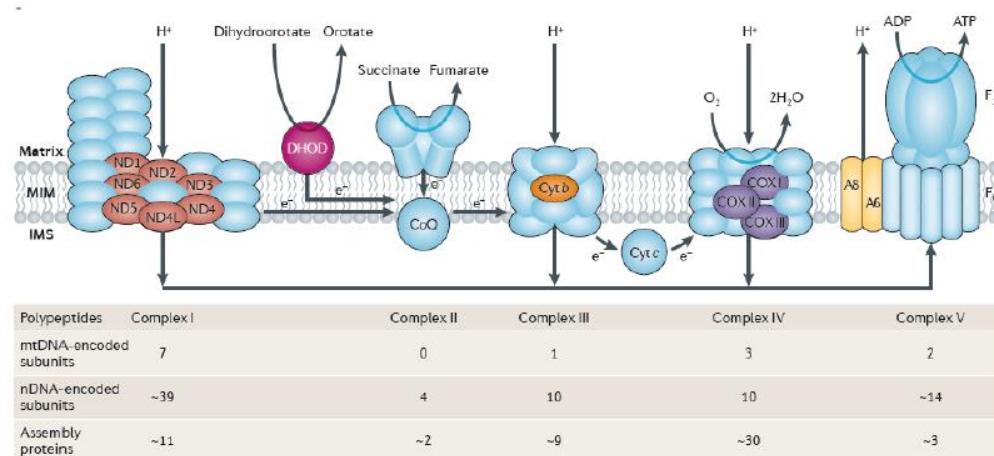
- CI- NADH ubiquinona oxidoreductasa
- CII- succinato ubiquinona oxidoreductasa
- CIIL-ubiquinona-citocromo c reductasa
- CIV- citocromo c oxidasa
- CV- ATP sintasa

TRANSPORTADORES e-

- ubiquinona (coenzima Q) en IMM
- citocromo c , en IMS

La cadena respiratoria funciona cediendo electrones de compuestos reductores a los complejos de la misma, **transduciéndose en generar una diferencia de potencial electroquímico a través de la membrana interna mitocondrial**. Esa energía se utiliza para sintetizar ATP cuando vuelven a fluir los protones a favor de gradiente.

Estos complejos están codificados tanto por genes del mtDNA como del nDNA.



OTRAS PROTEÍNAS NUCLEARES: LAS IMPlicadas EN REPLICACIÓN, TRANSCRIPCION, TRADUCCIÓN E IMPORTE DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA

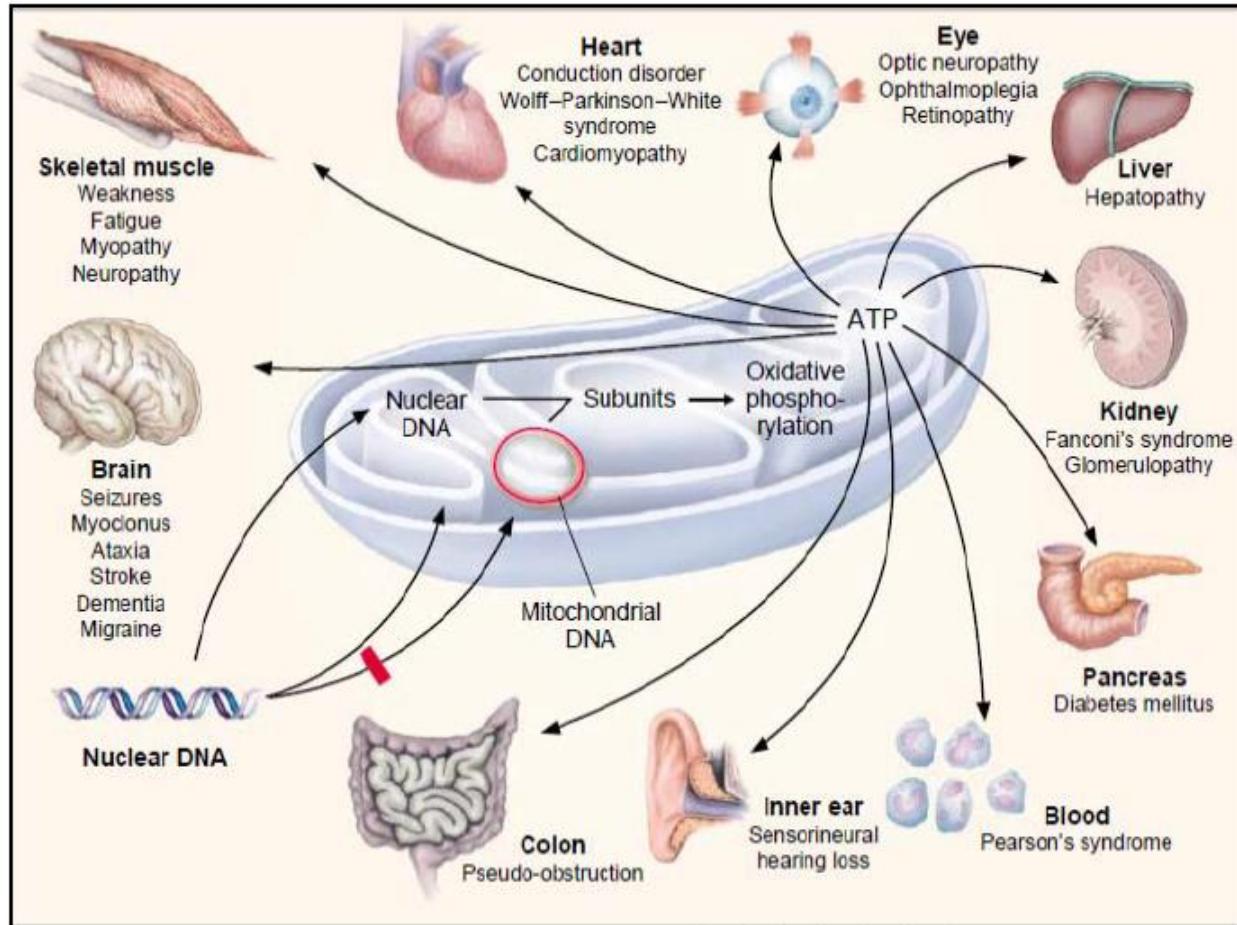
No hay ningún complejo codificado completamente por el DNA mitocondrial. Además de los complejos estructurales, se requieren una serie de proteínas en ocasiones en un número muy elevado, que son necesarias para el ensamblaje de los complejos.

Además de estas proteínas de ensamblaje, también necesitaremos proteínas codificadas en el nDNA que son necesarias para transcripción, traducción, importe de proteínas, replicación del DNA mitocondrial. Es decir, la mitocondria por sí sola no es suficiente para llevar a cabo sus funciones.

Las enfermedades de OXPHOS, tienen la mayoría de los defectos en genes nucleares. Sólo un 20% va a ser debidos a defectos en el DNA mitocondrial. Hay diferencias entre ellas.

Las enfermedades mitocondriales pueden manifestarse en cualquier edad, afectando a cualquier órgano y con heterogeneidad. Un mismo gen puede dar lugar a distintas enfermedades y varios genes pueden dar lugar a la misma sintomatología clínica.

Normalmente están afectados aquellos órganos cuyos requerimientos energéticos son mayores: cerebro, músculo, corazón. También aquellos en las cuales hay una especial sensibilidad al estrés oxidativo como las células β del páncreas. Entre otras, estarán las musculares del ojo, hígado, riñón, células de la cóclea.

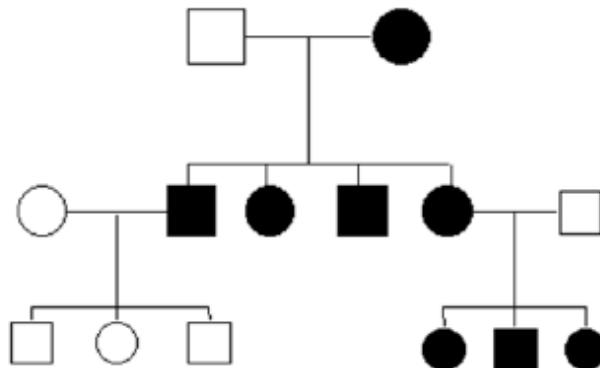


Con respecto a las mutaciones del DNA mitocondrial **hay dos características que las define:**

En conjunto, son enfermedades raras, pero afectan a un gran número de pacientes.

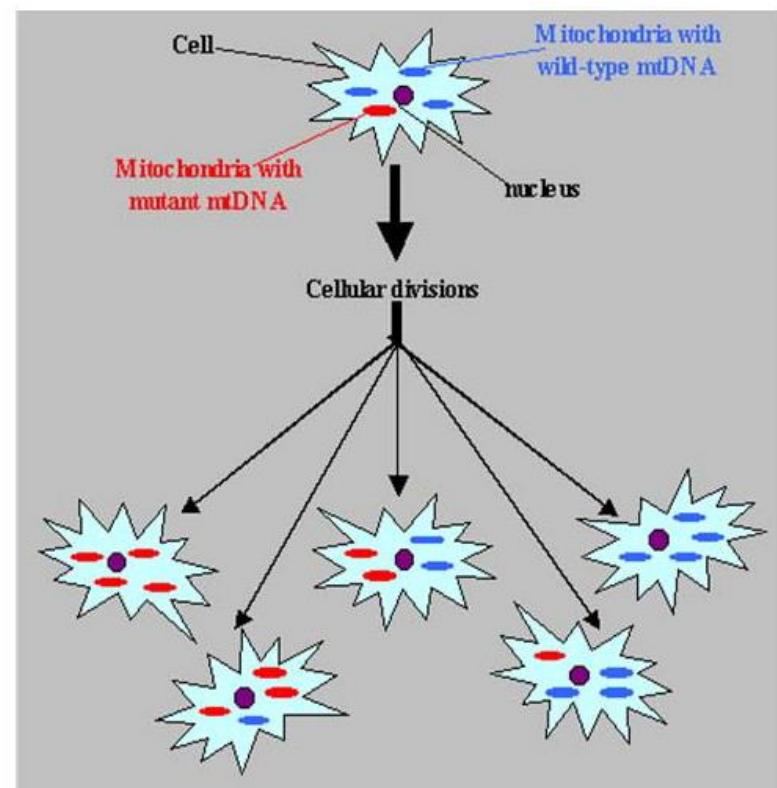
- **Herencia materna.** Las mitocondrias van en el oocito. El pedigrí “ideal” de una herencia materna pasa sus mitocondrias afectadas a todos sus hijos, **independientemente del sexo.** **Un padre afectado nunca va a transmitir la enfermedad.**

Para que se exprese el fenotipo, aun así, **necesitamos tener suficiente cantidad de DNA mitocondrial mutante, gobernado por la heteroplasmia.**



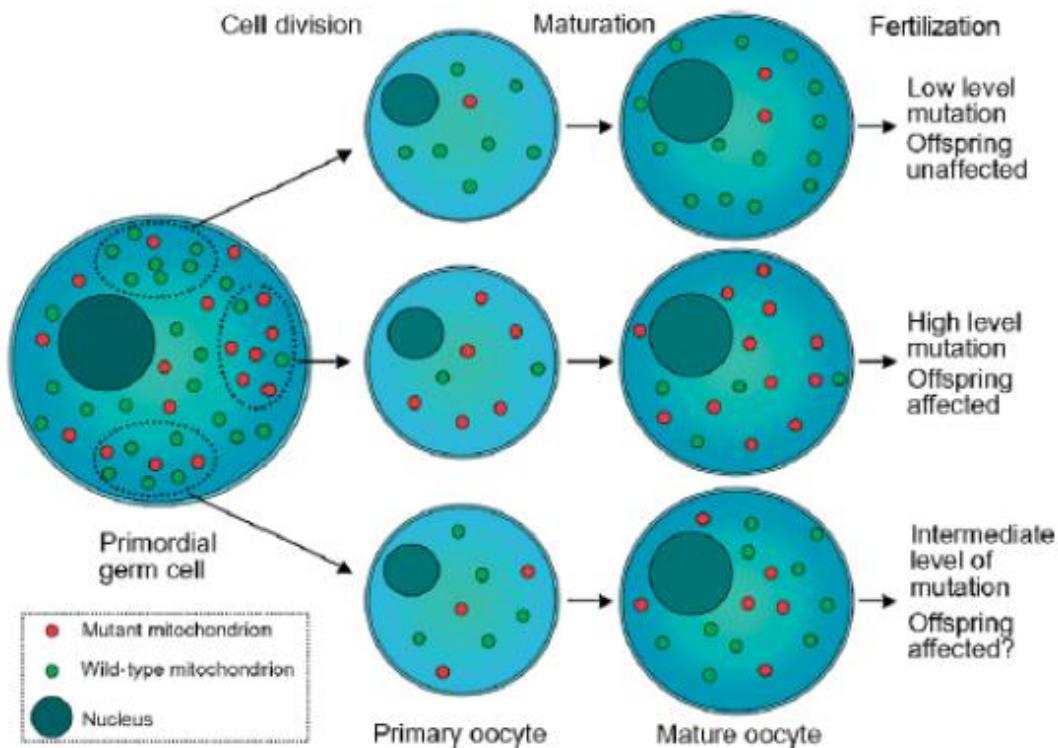
Pedigri ideal, la línea materna traspasa siempre la enfermedad

- **Heteroplasmia.** Es el porcentaje diferente de mitocondrias normales y mutantes en cada célula o tejido. Las células reciben diferentes poblaciones de mitocondrias normales y mutantes, pues el proceso de segregación mitocondrial es al azar.



Puede que haya individuos donde no sea suficiente la expresión de DNA mutante para que se dé el fenotipo, **pues hay un efecto umbral en la heteroplasmia (hasta que no se llega a un % determinado de mitocondrias mutantes, no se ve fenotipo).**

Por otro lado, **en la generación del oocito se da un cuello de botella, pues se producen oocitos con distinto porcentaje de DNA mitocondrial mutantes.** Las madres asintomáticas heteroplásicas pueden tener hijos afectados con afectación suave o severa por este patrón de cuello de botella que se da en el paso de oogonia y oocito primario.



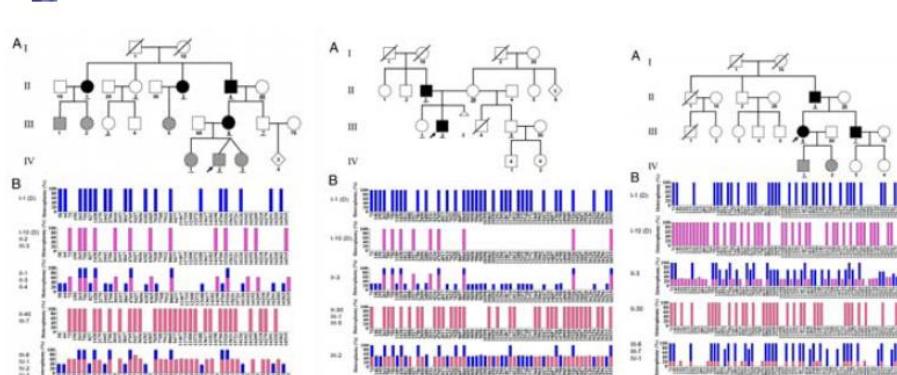
También es posible que haya una herencia mitocondrial paterna. Se encuentran tres familias en las que se ve la mezcla de haplogrupos o variaciones. Hay una degradación selectiva de mitocondrias y del DNA mitocondrial paterno **puede haber algún gen que está regulando la degradación del DNA mitocondrial paterno, estando en alguno de los genes que median este proceso mutados.**

Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans

Shiyu Luo^{a,b}, C. Alexander Valencia^{a,1}, Jinglan Zhang^c, Ni-Chung Lee^d, Jesse Slone^a, Baoheng Gui^{a,b}, Xinjian Wang^a, Zhuo Li^{a,2}, Sarah Dell^e, Jenice Brown^e, Stella Maris Chen^f, Yin-Hsiu Chien^d, Wuh-Liang Hwu^d, Pi-Chuan Fan^g, Lee-Jun Wong^c, Paldeep S. Atwal^{f,3}, and Taosheng Huang^{a,3,4}

^aDivision of Human Genetics, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH 45229; ^bMaternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, 530003 Guangxi, China; ^cDepartment of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030; ^dDepartment of Pediatrics and Medical Genetics, National Taiwan University Hospital, 100 Taipei, Taiwan; ^eDepartment of Pediatrics, National Taiwan University Hospital, 100 Taipei, Taiwan; and ^fDepartment of Clinical Genomics, Center for Individualized Medicine, Mayo Clinic Hospital, Jacksonville, FL 32224

Edited by Douglas C. Wallace, Children's Hospital of Philadelphia and University of Philadelphia, Philadelphia, PA, and approved October 29, 2018 (received for review June 26, 2018)



Mutaciones en el DNA mitocondrial

En un principio, se creyó que era imposible una enfermedad de herencia mitocondrial **debido a lo esencial del orgánulo**. En un principio, se pensó que una mutación en el DNA mitocondrial, esencial para el funcionamiento del organismo, sería letal.

Sin embargo, hay varios casos que sientan un precedente para comenzar a hablar de enfermedades mitocondriales:

- **1988.** Anita Harding describe por primera vez delecciones en el DNA mitocondrial de pacientes con miopatías **realizando experimentos de southern blot**. D. Wallace **describe una mutación en el gen ND4 que forma parte del complejo I en una familia con LHON** (Leber hereditary optic neuropathy).
- **1990.** Se describe una mutación puntual en el tRNA^{lys} en pacientes con **MERRF** y en el tRNA^{Leu} en pacientes con **MELAS**.
- **2018.** Hay hasta 350 mutaciones, la mayoría en los genes de tRNA y rRNA. En **MITOMAP** se anotan todas las variantes patogénicas descritas en el DNA mitocondrial.

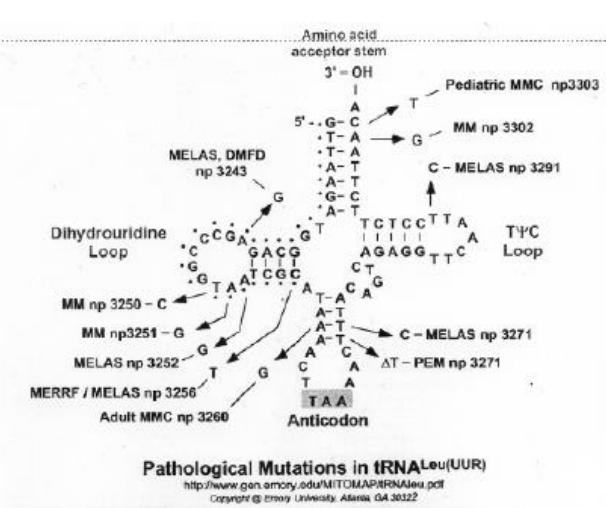
Las mutaciones en general son **heteroplasmicas**, precisando cierto **efecto umbral** para que se vea un fenotipo patológico. La **gravedad de los síntomas** está correlacionada con la **proporción de mitocondrias afectadas**.

El grado de heteroplasmia va a variar entre individuos y entre tejidos del mismo individuo.

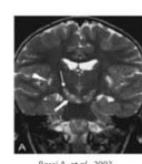
Determinadas entidades clínicas se clasifican por los síntomas mayoritarios que suceden. Por otro lado, **diferencias en las mutaciones de un mismo gen dan distintas enfermedades**. El síndrome de Leigh, por otro lado, es una **encefalomiopatía** causada por mutaciones tanto en genes de DNA mitocondrial como en genes nucleares, **habiéndolo una gran heterogeneidad**.

Table 2 Clinical features in diseases associated with mtDNA mutations

TISSUE	SYMPTOM/SIGN	Δ-mtDNA		tRNA		ATPase6	
		KSS	MERRF	MELAS	NARP	MILS	
CNS	Seizures	-	+	+	-	-	+
	Ataxia	+	+	+	+	+	±
	Myoclonus	-	+	±	-	-	-
	Psychomotor retardation	-	-	-	-	-	+
	Psychomotor regression	+	±	+	-	-	-
	Hemiparesis/hemianopia	-	-	+	-	-	-
	Cortical blindness	-	-	+	-	-	-
	Migraine-like headaches	-	-	+	-	-	-
	Dystonia	-	-	+	-	-	+
	Peripheral neuropathy	±	±	±	+	-	-
Muscle	Weakness/exercise intolerance	+	+	+	+	+	+
	Ophthalmoplegia	+	-	-	-	-	-
	Ptosis	+	-	-	-	-	-
Eye	Pigmentary retinopathy	+	-	-	+	±	±
	Optic atrophy	-	-	-	±	±	-
Blood	Cataracts	-	-	-	-	-	-
	Sideroblastic anemia	±	-	-	-	-	-
Endocrine	Diabetes mellitus	±	-	±	-	-	-
	Short stature	+	+	+	-	-	-
Heart	Hypoparathyroidism	±	-	-	-	-	-
	Conduction block	+	-	±	-	-	-
Gastro/intestinal	Cardiomyopathy	±	-	±	-	-	±
	Exocrine pancreatic dysfunction	±	-	-	-	-	-
Ear/nose/throat	Intestinal pseudo-obstruction	-	-	-	-	-	-
	Sensorineural hearing loss	-	+	+	±	-	-
Kidney	Fanconi syndrome	±	-	±	-	-	-

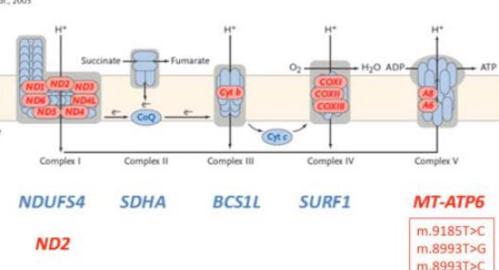


Leigh syndrome (LS)



"Infantile subacute necrotizing encephalomyopathy"

- Pediatric neurological disorder
- 1:36,000 birth
- Most severe mitochondrial disease
- No cure
- Lack model systems



for Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Debido a que el **mtDNA** tiene una alta tasa de mutación hay varios criterios que se tienen en cuenta para averiguar si el cambio **es patogénico o si es un polimorfismo**:

- **Heteroplasmia.** La mutación ha de ser heteroplásica, **es decir, debe ser coexistente junto con el DNA mitocondrial silvestre.** Esto es debido a que una mutación que produzca una disfunción de la mitocondria no podría estar en homoplasmia (son las mitocondrias funcionales las que son capaces de suplir la función de las mitocondrias defectuosas).
- **Segrega con la familia.** La proporción de DNA mutado debe ser mayor en el tejido de individuos afectados que en el tejido de familiares no afectados.
- **Segrega dentro del individuo en los distintos tejidos afectados.** La proporción de DNA mitocondrial mutado deberá ser mayor en los tejidos afectados.
(¿No siempre debería ser así? Hay tejidos que precisan un mayor aporte mitocondrial que otros, así que para un mismo porcentaje de mitocondrias afectadas podría ser que el tejido presentase o no patología acordeamente a las necesidades energéticas del mismo.)
- **Segrega con el defecto bioquímico.** La proporción de DNA mitocondrial deberá correlacionarse con el defecto bioquímico tanto a nivel tisular como celular.
- **Es único a las familias afectados.** La mutación deberá estar ausente en controles sanos.
- Tiene que afectar a **nucleótidos muy conservados.** La mutación debe afectar a nucleótidos conservados que son **importantes en el genoma mitocondrial**, de manera que su cambio en el mismo produciría cambios fatales si no se dieran en heteroplasmia.

En ocasiones, estos criterios no permiten concluir si el polimorfismo es o no patogénico. Así, en algunos casos es necesario hacer **estudios funcionales. En genes nucleares**, es sencillo mediante transfección del producto mutado. Sin embargo en el caso de las mutaciones en el DNA mitocondrial se utilizan los **cíbridos transmitocondriales**. En este tipo de estudios se busca **comparar la actividad del producto mitocondrial WT con respecto a la del mutante**, manteniendo un mismo fondo de genoma nuclear.

- Se usan **células enucleadas o plaquetas del paciente**, donadoras de mitocondrias y células **p0, donadoras de núcleo, sin DNA mitocondrial**.

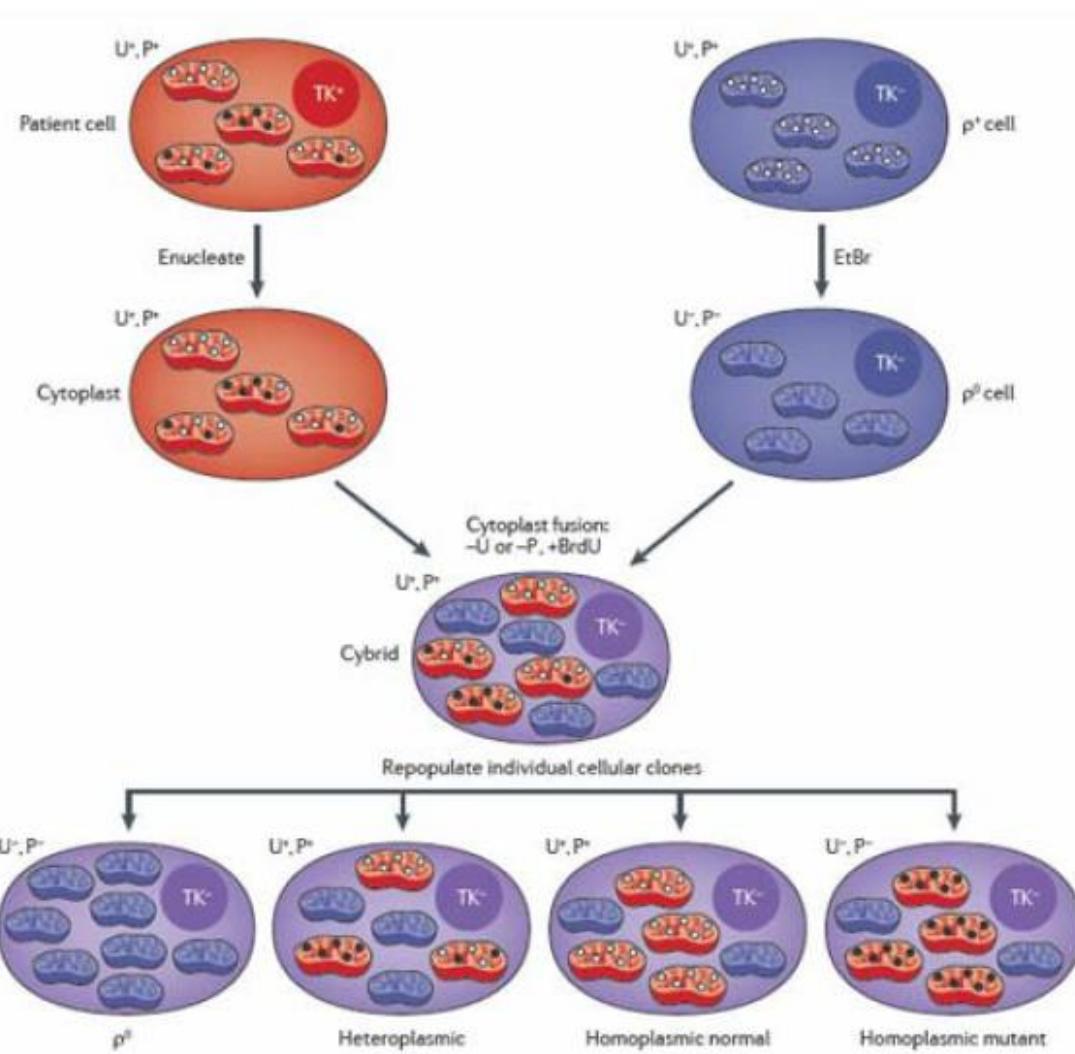
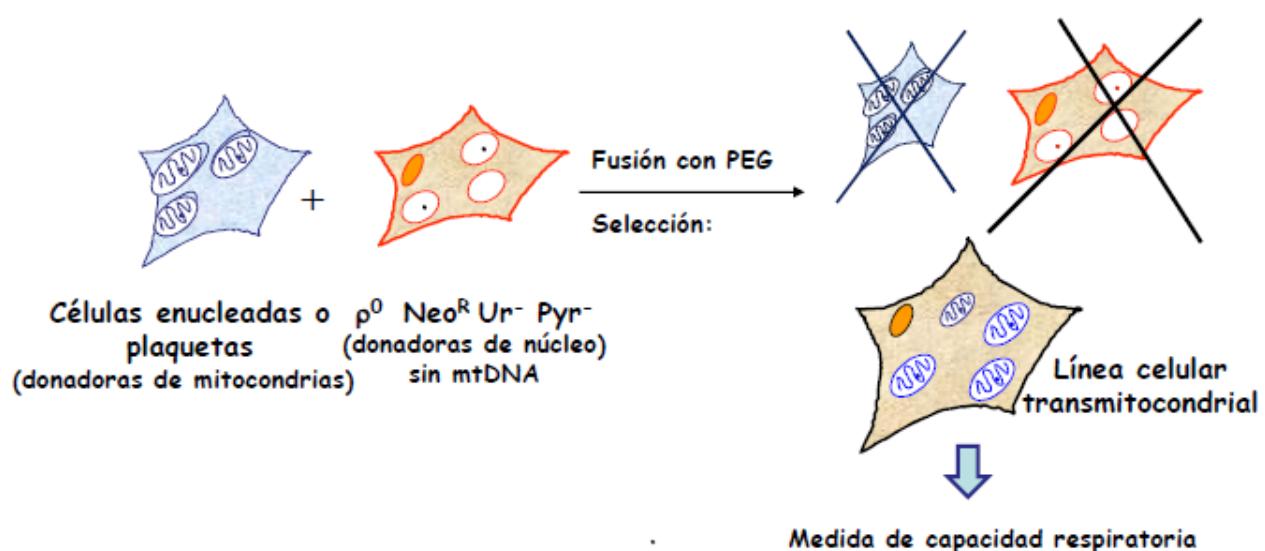
Las células p0 se generan utilizando **bromuro de etidio a concentraciones muy bajas**, de manera que sólo se afecta significativa al DNA mitocondrial pero no al DNA nuclear.

Al depletarse el DNA mitocondrial de estas células, pierden las mitocondrias y con ello son deficientes en la **síntesis de pirimidinas**, debido a que tienen una deficiencia en la **dihidroorotato deshidrogenasa en membrana mitocondrial**.

- El sistema nos permite poner estos dos tipos de células en contacto junto con PEG, que promueve la fusión celular. **Debido a que en las células p0 se incluye además un gen de resistencia a neomicina**, se puede hacer una doble selección con neomicina y ausencia de pirimidinas, **de manera que únicamente obtendremos células fusionadas**.

Esto nos permite hacer una comparación de **distintos mtDNAs sobre un fondo nuclear común**. Se pueden obtener **clones homoplásmicos portadores y no portadores y hacer un análisis de clones con distinto grado de heteroplasmia**.

CÍBRIDOS TRANSMITOCONDIALES



Enfermedades asociadas a mutaciones en el DNA mitocondrial

Mutaciones en genes de tRNA o rRNA

Más comunes:

- **MELAS.** 80% causada por una mutación en el tRNA_{Leu}. Se producen acumulaciones de mitocondrias. Hay **debilidad muscular, convulsiones, miopatías, migrañas, diabetes mellitus...**

MELAS se forma por las siglas de **mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, strok-like episodes.**

- **MERF.** Síntomas muy solapantes con MELAS, con fibras de rojos rasgados, **una mutación en el tRNA_{Lys}.** Algunos de sus síntomas son **epilepsia, ataxia y debilidad muscular.** Otros son **pérdida auditiva, demencia...**

MERF se forma por las siglas de **myoclonic epilepsy, mito myopathy with ragged-red fibers**

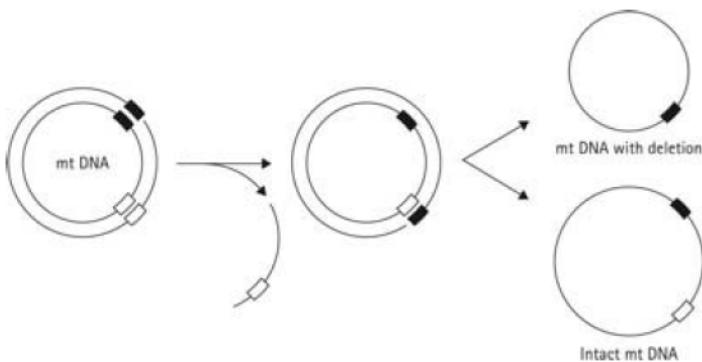
Mutaciones puntuales en genes estructurales de complejos respiratorios

- **NARP Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa.** Mutaciones en **genes estructurales de complejos respiratorios.** A parte de la neuropatía y debilidad muscular, postura anormal y degeneración pigmentaria de retina.
- **LHON.** Tienen **ceguera por lesión del nervio óptico.** Leber's hereditary optic neuropathy.
- **MILS.** Tienen una **pérdida motora y del habla.** Maternally inherited Leigh síndrome.

Delecciones y duplicaciones

Grandes delecciones a nivel del DNA mitocondrial, **que se repiten entre dos secuencias repetidas**

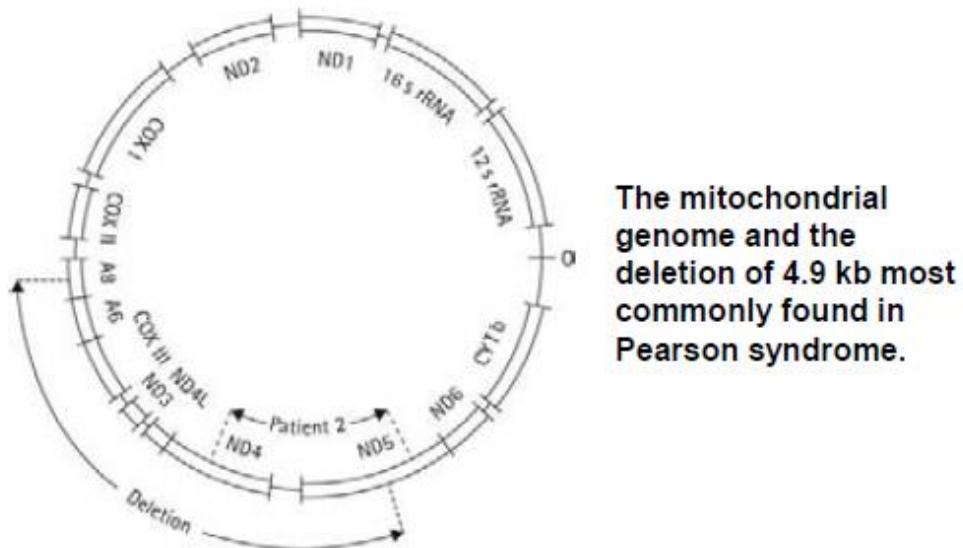
- **mtCPEO.** Chronic progressive external ophtalmoplegia.
- **KSS. Síndrome de Kaerns-Sayre.** Hay secuencias repetidas que producen un **salto de la polimerasa de una secuencia repetida a otra (replication slippage)**, que causa delecciones entre secuencias repetidas, **pues la polimerasa se desliza de un sitio a otro.** Es característica siempre la misma delección.



Slip replication model for the genesis of a deletion in mitochondrial DNA. Following the development of breaks, the smaller segment is removed and degraded.

Se caracteriza por párpados caídos y afectación a nivel de corazón. El efecto de estas delecciones van a depender de la afectación de los distintos órganos.

- **PS. Síndrome de Pearson.** Insuficiencia pancreática, las células β del páncreas son muy sensibles al estrés oxidativo. Se da también malabsorción intestinal. Se produce una afectación de varios de los complejos respiratorios.



Defectos en genes nucleares

En general son **afectaciones neonatales muy severas**. Sólo el 20% de los pacientes con enfermedades mitocondriales tienen mutaciones en el mtDNA, siendo el resto **defectos en genes nucleares**. Estas mutaciones pueden afectar a:

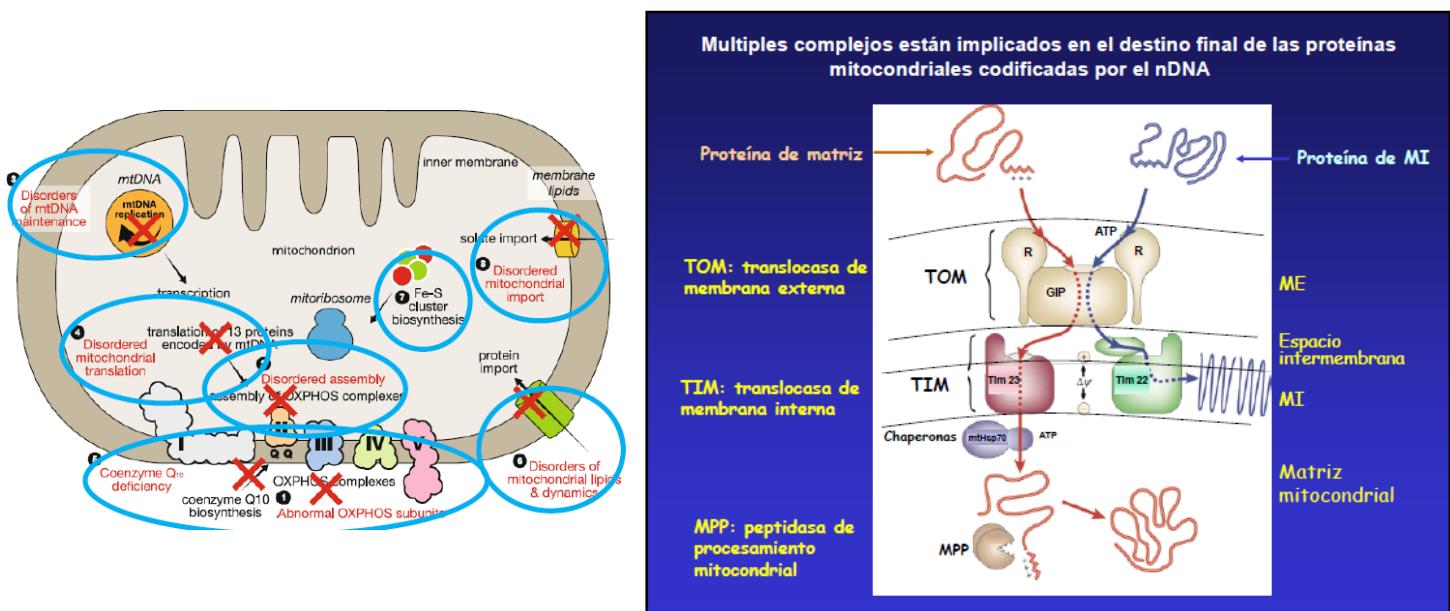
- **Mutaciones en los genes estructurales de los complejos.**
- **Defectos que inciden sobre el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales.**
- **Defectos del mantenimiento del DNA mitocondrial**
 - **Defectos en la Poly**
 - **Defectos en el pool de nucleótidos necesarios (TK, p.ej)**

Estos defectos cursan con **depleción de mtDNA y delecciones dentro del DNA mitocondrial porque no se lleva a cabo correctamente la replicación**.

- **Defectos en enzimas que modulan o metabolizan lípidos de la membrana mitocondrial**
- **Defectos en la formación de los cluster de Fe-S que se incorporan a los complejos respiratorios**
- **Defectos que afectan a la importación de las proteínas mitocondriales**
 - Hay proteínas de matriz y otras intermembrana o de membrana interna.

Hay una serie de **complejos, los TOM y TIM que se encargan de la formación de poros facilitando el paso de proteínas que se sintetizan en el citoplasma**. Están dirigidas a la mitocondria por **péptidos señal de distintas características dependiendo de si son proteínas de matriz (con el péptido señal eliminado en la matriz) o de membrana (en cuyo caso el péptido es interno)**

Producen enfermedades diversas.



29

Ejemplos de enfermedades producidas por deficiencias en el importe de proteínas sintetizadas en el citosol

- **Mutación en el gen DDP1/TIMM8a produce el síndrome Möhr-Tranebjærg**
- **Mutación en el gen DNAJC19 causa el síndrome de DCMA.** Está producida por fallos en la proteína Tim14 de la IMS.
- **Fallos en al proteína Hsp60 de matriz mitocondrial produce la hereditary spastic paraplegia.**

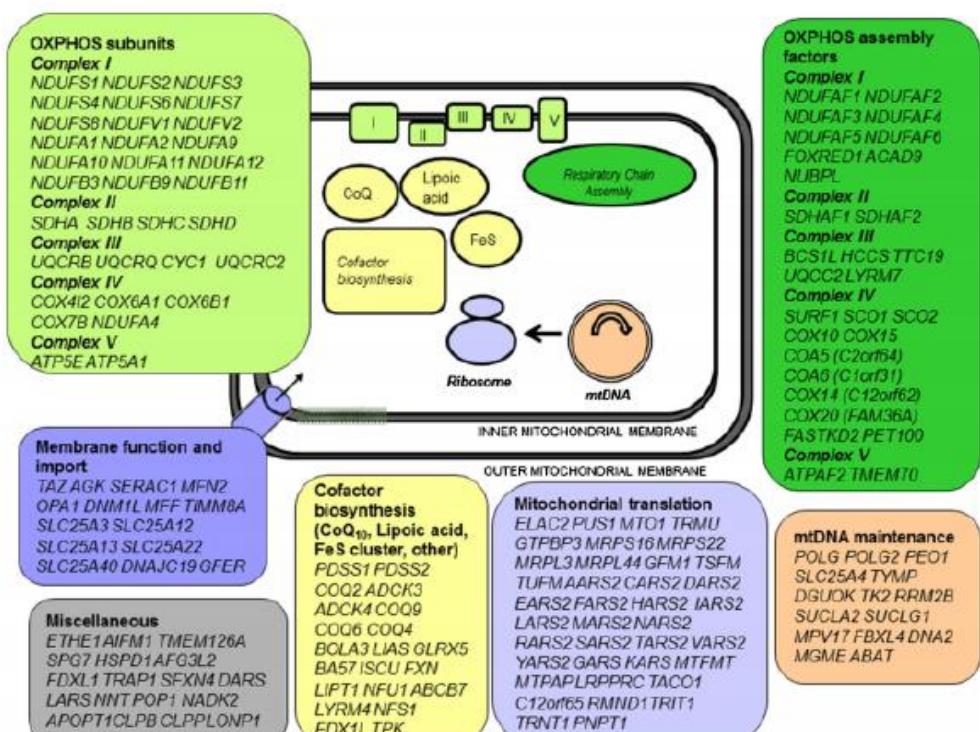


Fig. 2 Genetic complexity of mitochondrial disease. Nuclear genes linked to mitochondrial disease, grouped according to pathomechanism: oxidative phosphorylation (OXPHOS) enzyme subunits (light green); OXPHOS enzyme assembly factors (dark green); mitochondrial DNA

(mtDNA) maintenance (peach); mitochondrial translation (light blue); cofactor biosynthesis (yellow); membrane function and import (dark blue); and miscellaneous (grey)

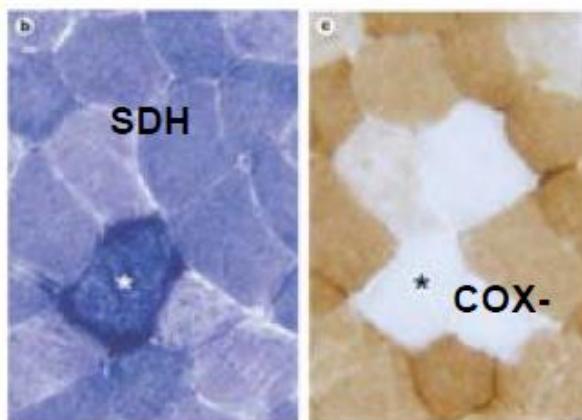
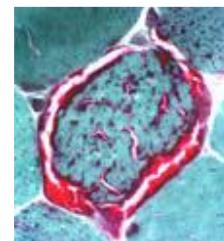
Diagnóstico de una enfermedad mitocondrial

En un principio, se ha de hacer una valoración **clínica, bioquímica y tisular si es necesario para determinar el fenotipo del paciente.**

- **Clínica.** La clínica de los pacientes con enfermedades mitocondriales suele incluir síntomas como:
 - Fatiga, mialgia, debilidad muscular, sordera, diabetes, cardiomiopatía con un EKG anormal, defectos visuales, retraso en el desarrollo, defectos en el movimiento y EEG anormal.
- **Bioquímica.**
 - **Creatina quinasa elevada.** Consume ATP y produce fosfocreatina, reserva de ATP. Cataliza también la reacción contraria **producido ATP.**
Ante la pérdida de mitocondrias funcionales, se produce un aumento de la enzima como mecanismo compensatorio.
 - **Acidosis láctica.** Se produce como consecuencia de la disfunción mitocondrial, hay una acumulación de lactato que no es capaz de ser oxidado de vuelta a piruvato y seguir la vía de degradación mitocondrial.
 - **Actividad de los complejos OXPHOS baja.**

• Biopsia muscular

- **Análisis histológico e histoquímico.** En los pacientes con MELAS y MERF se pueden ver **ragged-red fibers**, que son mitocondrias que se acumulan bajo la membrana citoplasmática del músculo para intentar contrarrestar el defecto en la respiración.
- **Análisis bioquímico por enzimas**
- **Análisis molecular**
 - **SDH.** Enzima codificada por el núcleo
 - **COX.** Ambos.



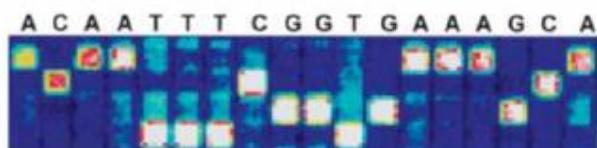
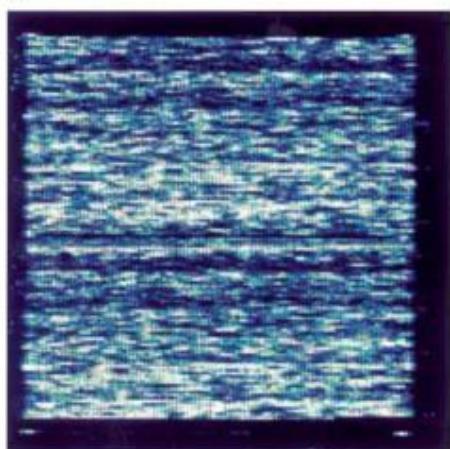
SDH: enzima codificada por el nucleo
COX: codificada por núcleo y mtDNA

El diagnóstico genético de las enfermedades que afectan al DNA mitocondrial se hace mediante biopsia muscular. Las técnicas utilizadas para el diagnóstico son:

- **Southern blot para detectar delecciones y depleciones de mtDNA.**
- **Secuenciación del mtDNA o de regiones donde hay mutaciones ya conocidas.**
- **Determinación del grado de heteroplasmia mediante PCR-RFLP/ASO/PCR a tiempo real con sondas TaqMan.** En ocasiones se hace también por NGS, determinándose el grado de heteroplasmia con el **número de reads**.

The Human MitoChip: A High-Throughput Sequencing Microarray for Mitochondrial Mutation Detection

A

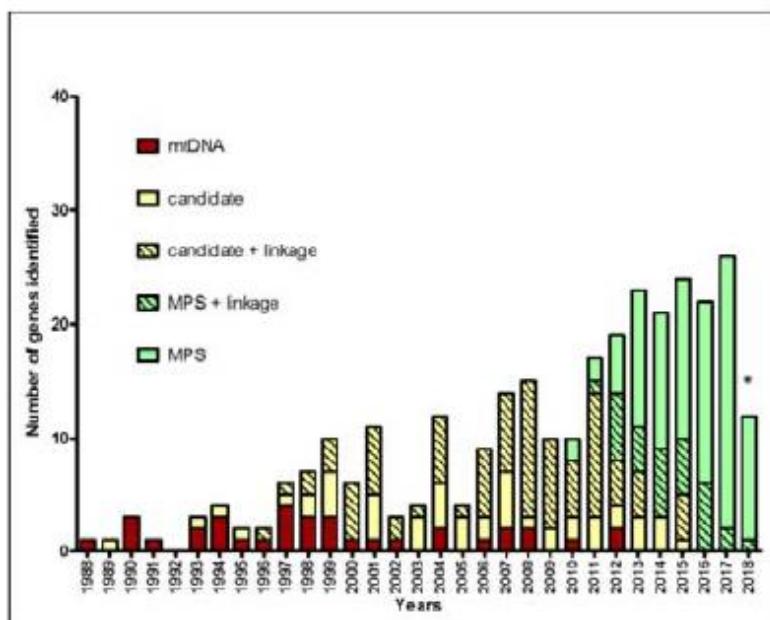


MITOMAP

(<http://www.mitomap.org/MITOMAP>)

A human mitochondrial genome database
A compendium of polymorphisms and mutations of
the human mitochondrial DNA

En secuenciación masiva, se analizan 1034 genes nucleares y los 37 mitocondriales, es decir, el Mitoxoma. Se han ido identificando diversos genes causantes de enfermedad mitocondrial poco a poco, a lo largo de los años.



Tratamientos

En general, los tratamientos son sintomáticos y se dirigen contra los siguientes síntomas:

- Anticonvulsionantes
- Tiroxina (los pacientes sufren de hipotiroidismo)
- Hormona del crecimiento (los pacientes sufren de insuficiencia de hormona del crecimiento)
- Nutrición por vía parenteral, en el caso de que haya enfermedad gastrointestinales
- Transfusiones de sangre en el caso de anemia
- Suplementación con insulina y enzimas pancreáticas en el caso de insuficiencia pancreática
- Marcapasos o transplante de corazón en el caso de insuficiencia cardíaca
- Implante coclear en el caso de sordera
- Suspensión del párpado en el caso de ptosis.



Todos son tratamientos sintomáticos. Sin embargo hay nuevas estrategias mucho más innovadoras que se basan en el mecanismo molecular por el que ocurre la patología.

Farmacológicos

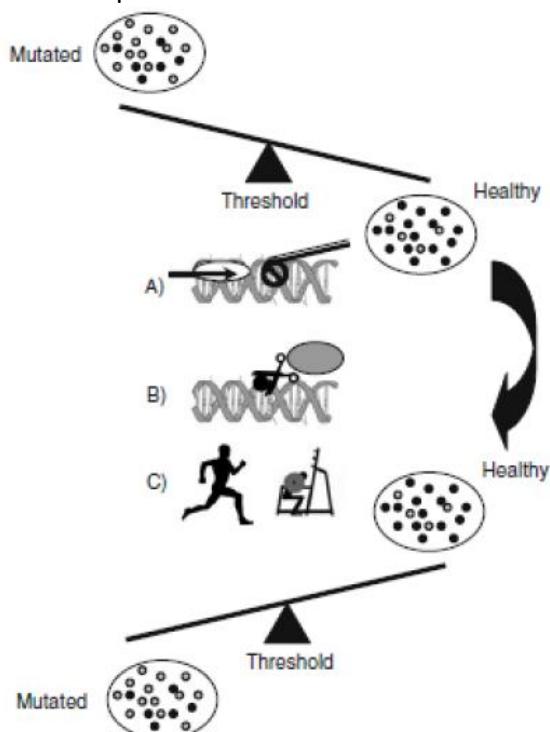
Pretenden aumentar la cantidad de mitocondrias o revertir el daño oxidativo.

- **Potenciación de la biogénesis mitocondrial.** Se usan activadores transcripcionales o potenciadores de las vías de señalización implicadas en la regulación de la respiración y biogénesis mitocondrial. En este grupo estarían el bezafibrato, el AICAR, los precursores del NAD o el resveratrol.
- **Eliminación de los metabolitos tóxicos.**
 - **Antioxidantes.** Vitamina E, ácido lipóico y glutation.
 - Donadores y aceptores de electrones, como la CoQ o la idebenona.
 - Bicarbonato
 - Dicloroacetato, fenilbutirato, que estimulan la PDH, reduciendo el lactato.

Manipulación del DNA.

Diversas estrategias para reducir el % de mtDNA, para estar por debajo del umbral patogénico.

- Entrenamiento físico. **Se produce una regeneración de fibras musculares, habiendo cierta selección positiva de mitocondrias WT.**
- **Importe de copias mtDNA WT o tRNAs a la mitocondria.** Es muy complicado. Se ha intentado con nanopartículas lipídicas.
- **Inhibir la replicación del DNA mitocondrial mutante.** Con oligos antisentido que bloquen determinados elementos. Estos oligos antisentido se pueden unir covalentemente con pequeños péptidos como el **Mitocondrial Targeting Peptide)**
- **Importe de endonucleasas de restricción específicas de la secuencia mutante (Zn finger, mitoTALEN).** Para que vayan a la mitocondria se les pone un péptido señal mitocondrial.
Las nucleasas cortan específicamente el mtDNA y no el WT. Hay problemas de llevar CRISPR-Cas9, porque es difícil introducir el guide RNA.
- **Expresión nuclear (alotópica) e importe mitocondrial para reemplazar genes defectivos.**
- **Expresión de genes de levadura codificantes para oxidases alternativas (transkingdom approach).**



Prevención de la transmisión

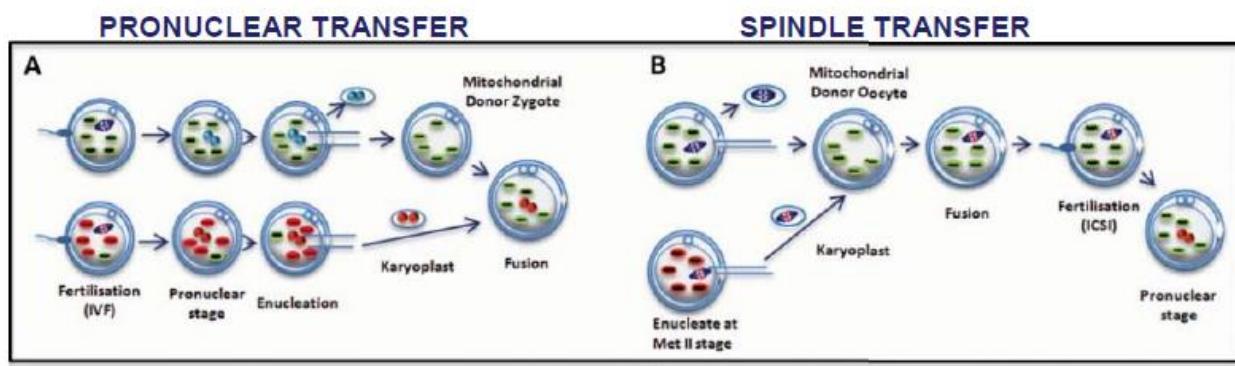
Existen diversas opciones para la prevención de la transmisión de enfermedades.

Para genes nucleares:

- **Diagnóstico prenatal.** Por amniocentesis, de los amniocitos o de la vellosidad corial. Se analiza y se ve si tiene o no la mutación, entrando en el supuesto de aborto terapéutico.
No posible para genes mtDNA, pues existe heteroplasmia.

Para genes mtDNA:

- **Diagnóstico genético preimplantacional (PGD).** Se hace fertilización in vitro y en el embrión de 8 células se aísla una célula y se analiza una célula. Problema por heteroplasmia y segregación al azar.
- **Hijos con tres padres genéticos:** gDNA paterno, gDNA materno y el mitDNA de una mujer sana no portadora.



Hay dos técnicas, **se trata de que haya una donante de mitocondrias**. Al cigoto con las mitocondrias se lo enuclea, antes o después de la fertilización in vitro.

Otros problemas:

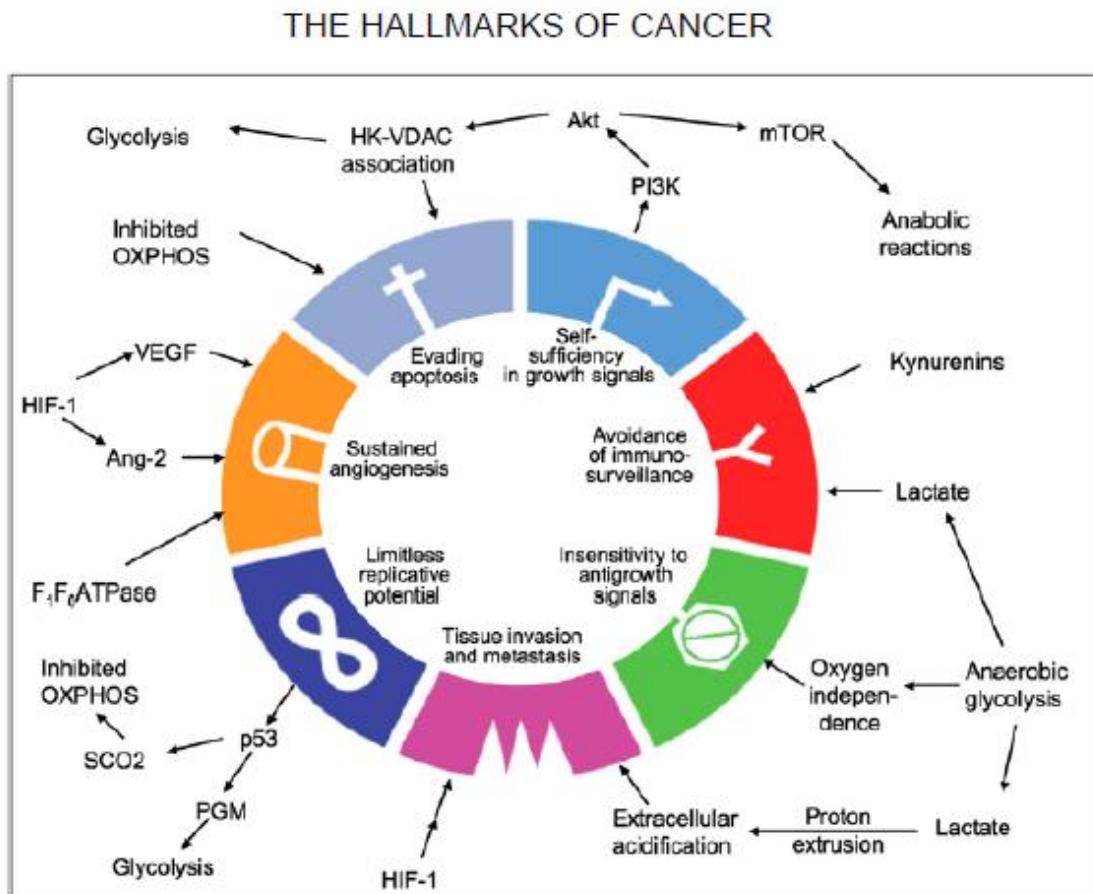
- Importan mucho las combinaciones de DNA mitocondrial con el núcleo. Hay proteínas de ambos genomas que tienen que ensamblarse, **unas regulando unos procesos del otro**. El mismatch con diferente haplogrupo mitocondrial sobre un mismo fondo genético.



Manipulación de proteínas

Por medio de péptido señal mitocondrial.

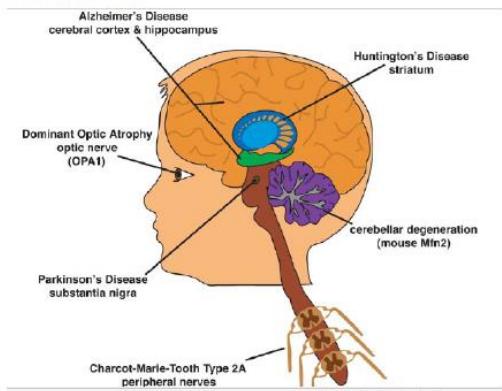
Cáncer y mitocondria



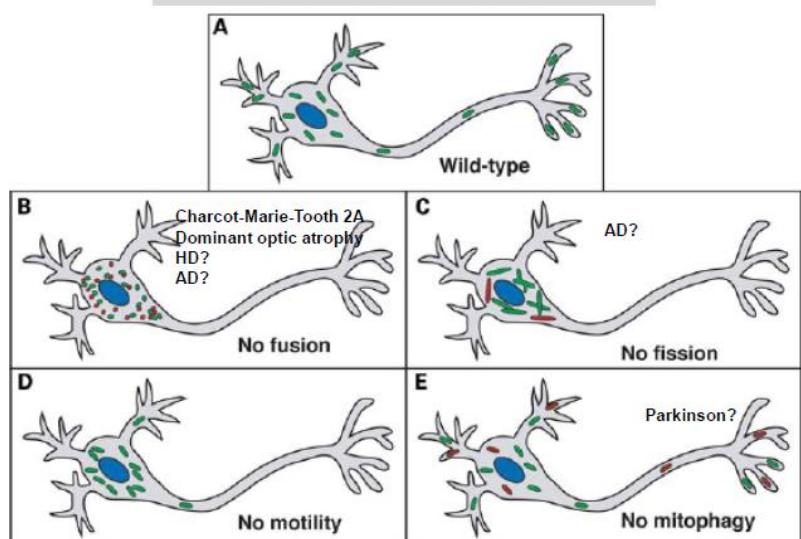
Neurodegeneración

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

➤ La neurodegeneración se asocia a la disfunción del metabolismo energético mitocondrial debido a la alta dependencia neuronal del metabolismo oxidativo

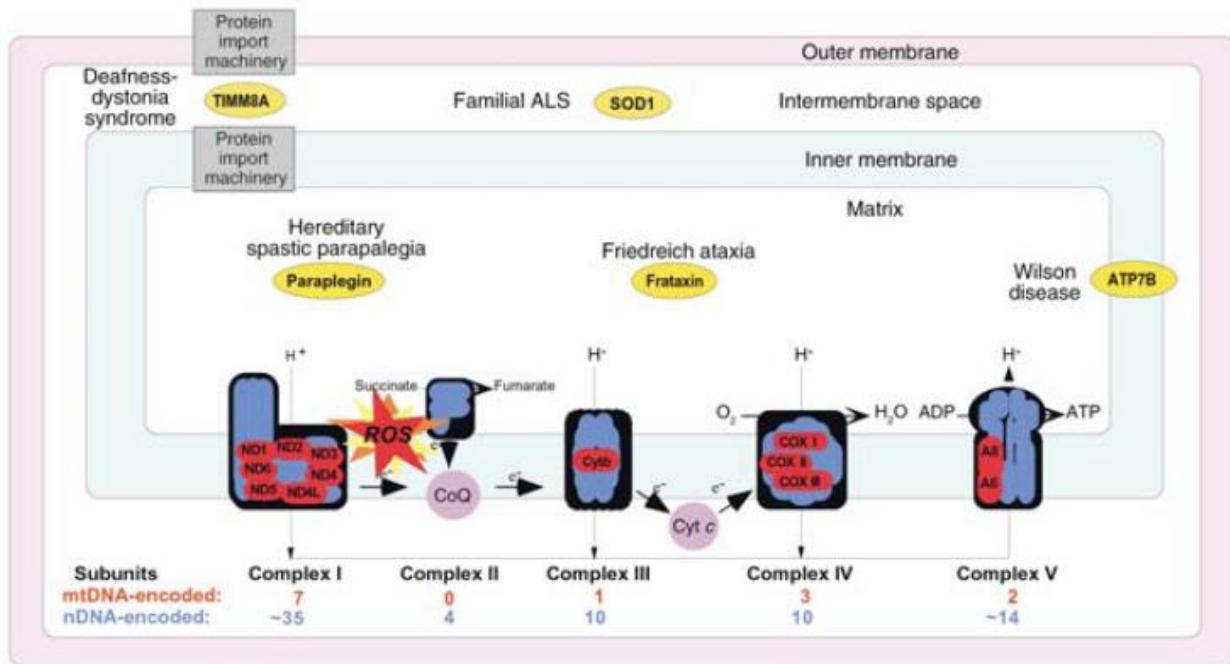


DEFECTOS EN LA DINÁMICA MITOCONDRIAL ORIGINAN DISFUNCIÓN NEURONAL



Muchas enfermedades neurodegenerativas son debidas a fallos en proteínas codificadas por el núcleo.

- **ALS.** Esclerosis lateral amiotróficas, **fallos en la SOD1** en su forma hereditaria.
- **Paraplegia hereditaria por deficiencia en paraplegina.**
- **Ataxia de Friedrich por deficiencias en frataxina.**
- **Enfermedad de Wilson (parkinsonismo y distonía)**



Implicación de la mitocondria en enfermedades psiquiátricas

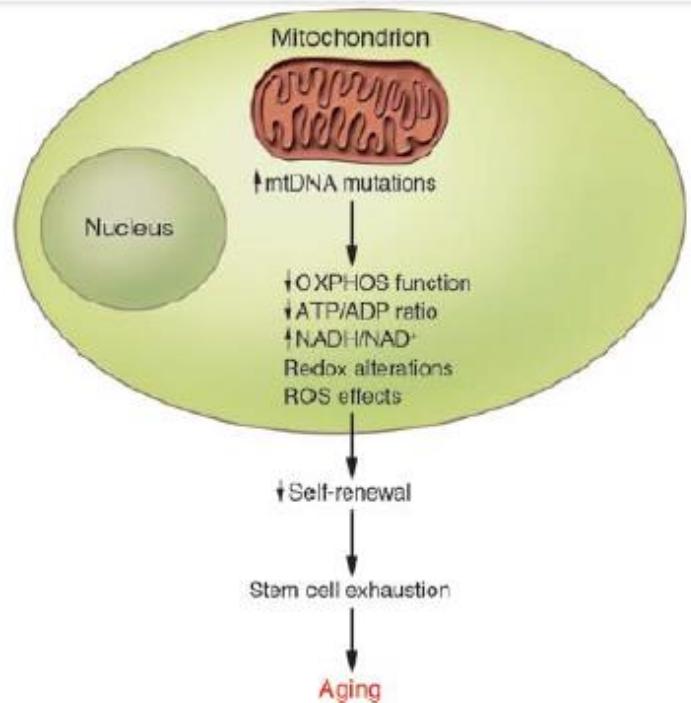
Quizá implicado en espectro autista. Hay evidencias genéticas y clínicas. En pacientes con estas enfermedades tienen ciertas variaciones en el mtDNA, **predisponiendo**.

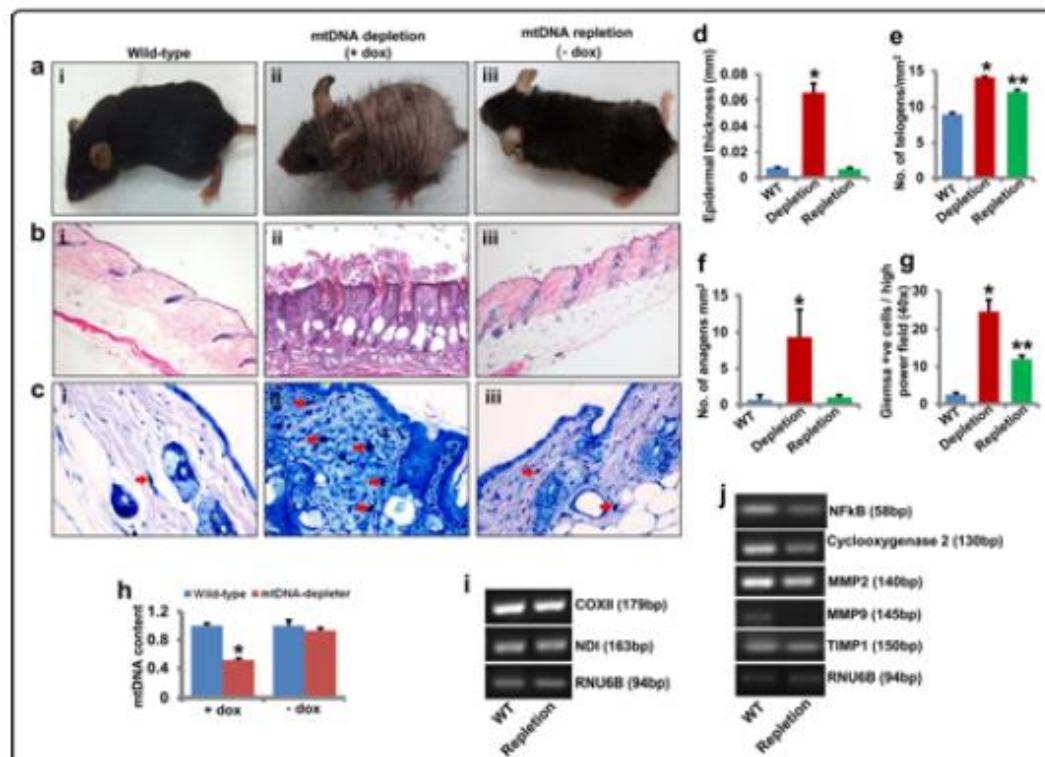
Role of mitochondria in aging

El envejecimiento declina la función OXPHOS, debido a que se disminuye la capacidad antioxidante de las células. Disminuyen los niveles de ATP.

Con la edad disminuye el contenido de DNA mitocondrial y el número de mitocondrias. **No hay buenos modelos murinos de enfermedad mitocondrial.** Haciendo mutaciones en poly, se ven defectos en DNA mitocondrial.

Si revierten la mutación, **el ratón se recupera.**
Todos los cambios asociados a la edad.





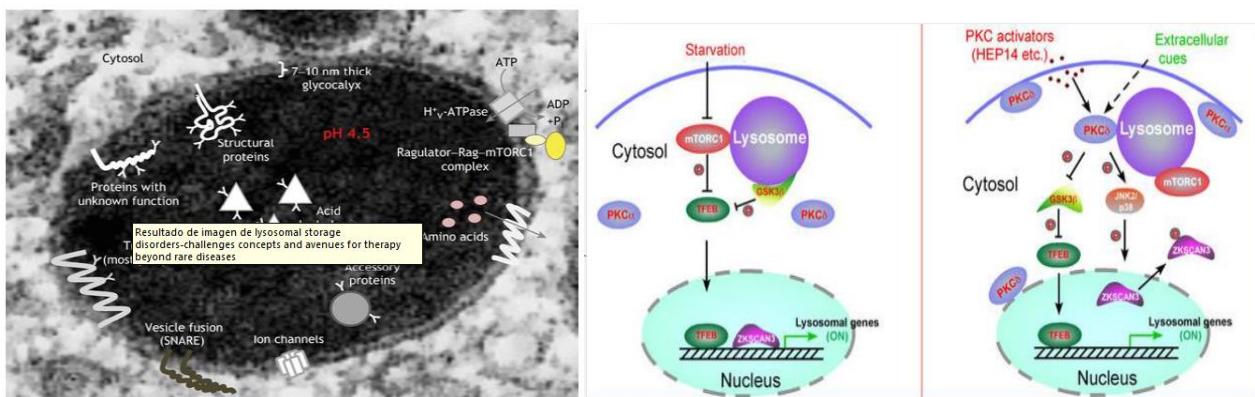
Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades lisosomales – 29-03-2019

Los lisosomas son **orgánulos membranosos que contienen estructuras vesiculares, con enzimas digestivas que se mantienen activas a un pH bajo**. Se consideran a los lisosomas los centros líticos de la célula.

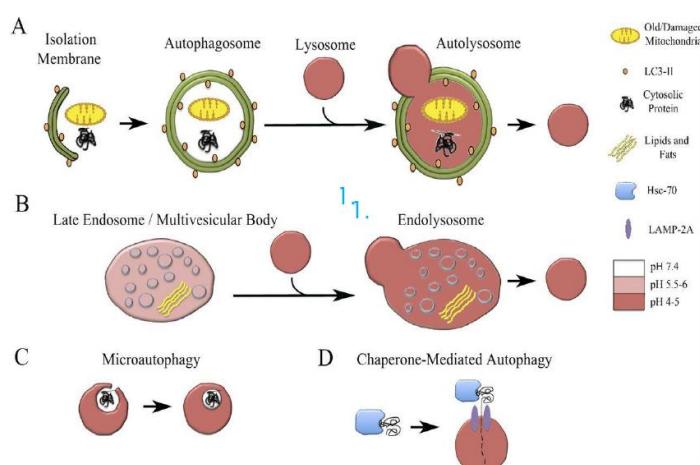
Sin embargo, hay otros procesos en los que hay menos conocimiento. A parte de como centro lítico de la célula, están implicados también en la **homeostasis de colesterol y en todos los procesos de remodelación tisular: degradación y remodelación de tejidos**.

Están implicados en procesos de **secreción y reparación de membrana plasmática y en procesos de autofagia**. Se los considera **importantes sensores nutricionales**. Por otro lado, también tienen gran relevancia en los procesos de **muerte y señalización celular**.



Para completar la degradación del material celular, los lisosomas utilizan cuatro rutas diferentes que implican a otros componentes del sistema endosoma-lisosoma:

1. **Macroautofagia.** La macroautofagia se produce cuando un lisosoma se une a un **autofagosoma**, un compartimento recubierto por una doble membrana que engloba orgánulos y materiales a degradar.
2. **Endolisosomas.** Los endolisosomas se producen cuando los lisosomas se fusionan con los cuerpos multivesiculares, **disminuyendo el pH de estos y aportándole las enzimas líticas necesarias para degradar el material endocitado**.
3. **Microautofagia.** Se produce cuando hay **invaginaciones del propio lisosoma**, englobando moléculas a degradar en vesículas internas.
4. **Autofagia mediada por chaperonas.** Se produce cuando proteínas chaperonas se acoplan a proteínas desplegadas y transportan por medio de otros transportadores lisosomales las moléculas mal plegadas para su posterior degradación en el interior del lisosoma.



Enfermedades de almacenamiento lisosomal

Las enfermedades de **almacenamiento lisosomal** son un grupo de aproximadamente 70 enfermedades mongénicas, que son clínica y genéticamente **muy heterogéneas y que afectan a la función lisosomal**. Tienen una prevalencia global de 1 de cada 5000 nacimientos. La mayor parte de las enfermedades lisosomales son **afectaciones de las hidrolasas propias del lisosoma**.

Se caracterizan por la **acumulación en lisosomas y/o orgánulos relacionados** de macromoléculas no digeridas o digeridas parcialmente, que provocan una disfunción celular y anomalías clínicas incluidas **órgano-megalías y disfunciones que pueden implicar a múltiples órganos y tejidos**.

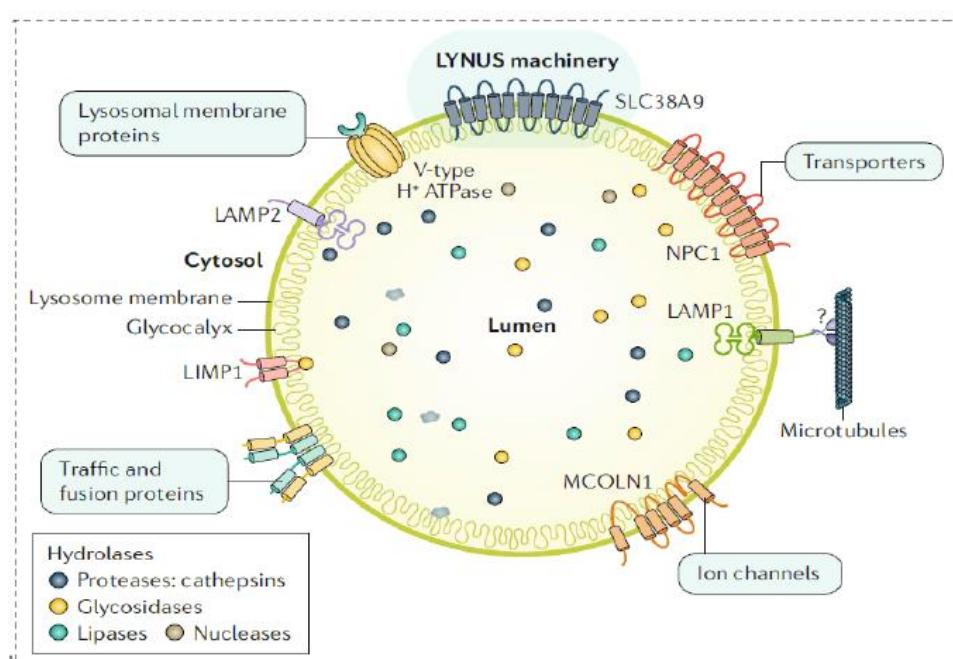
Las **organomegalías** son resultado tanto de una acumulación del material como de la inflamación producida en estas enfermedades.

Algunas de estas patologías son **tratables mediante terapias específicas de enfermedad**, mayoritariamente basadas en el reemplazo enzimático.

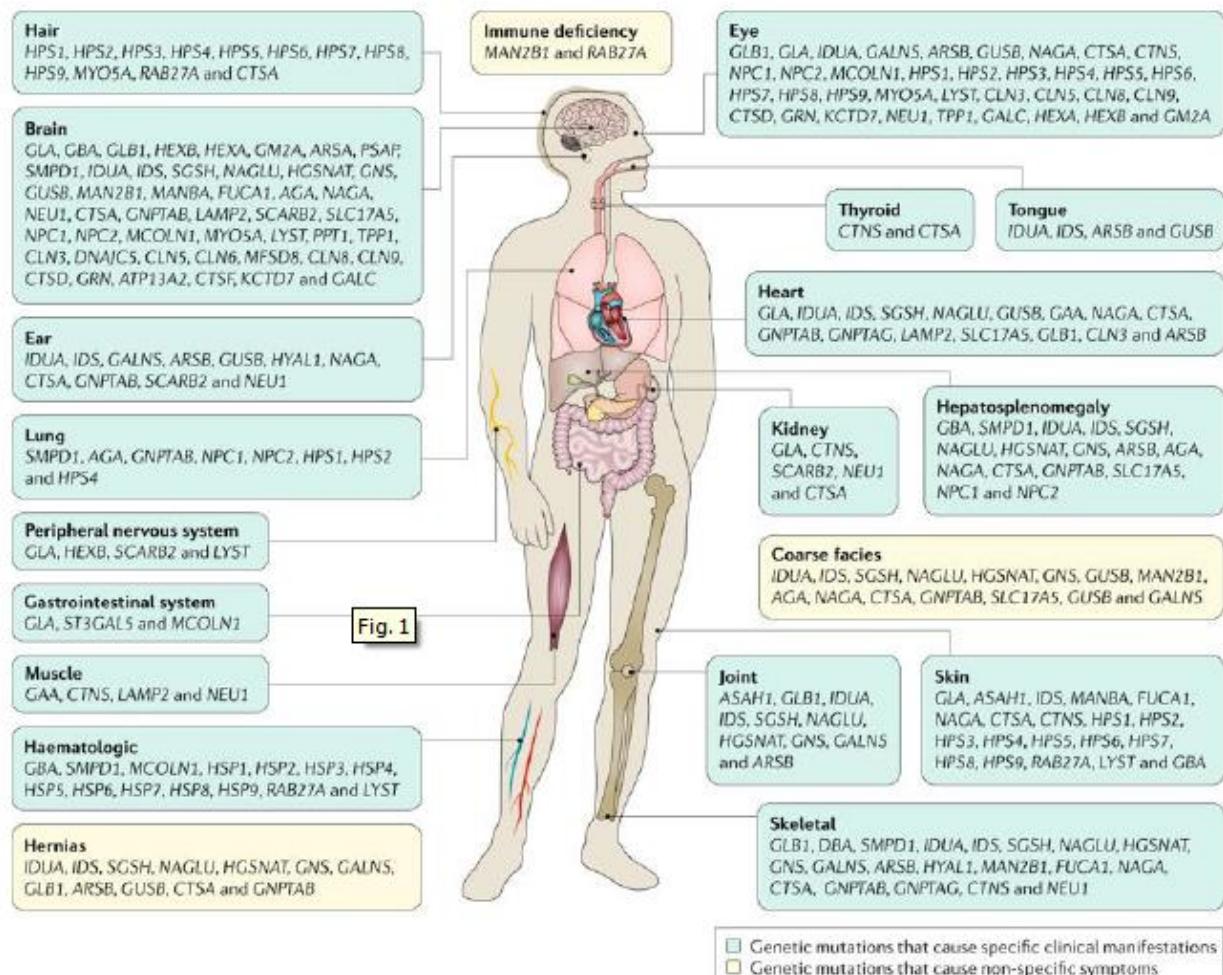
Complejidad del lisosoma y sus funciones

Para comprender las distintas afectaciones de las enfermedades de almacenamiento lisosomal hay que tener en cuenta la complejidad del lisosoma y las funciones llevadas a cabo por las moléculas que lo forman.

- **Hidrolasas de todo tipo.** Se encargan de degradar macromoléculas hacia moléculas más sencillas mediante reacciones de hidrólisis.
- **Transportadores de metabolitos al citoplasma desde el lumen lisosomal.** Por ejemplo, el transportador NPC1 está implicado en la salida del colesterol.
- **Canales iónicos**
- **Proteínas de tráfico vesicular y proteínas de fusión entre membranas.** Se encargan de transportar los lisosomas hacia los lugares adecuados y de fusionar sus membranas con los orgánulos diana, por medio del sistema de microtúbulos que **reconoce a la proteína LAMP1**
- **Proteínas transportadoras de los monómeros resultantes de la acción catalítica de las hidrolasas.**



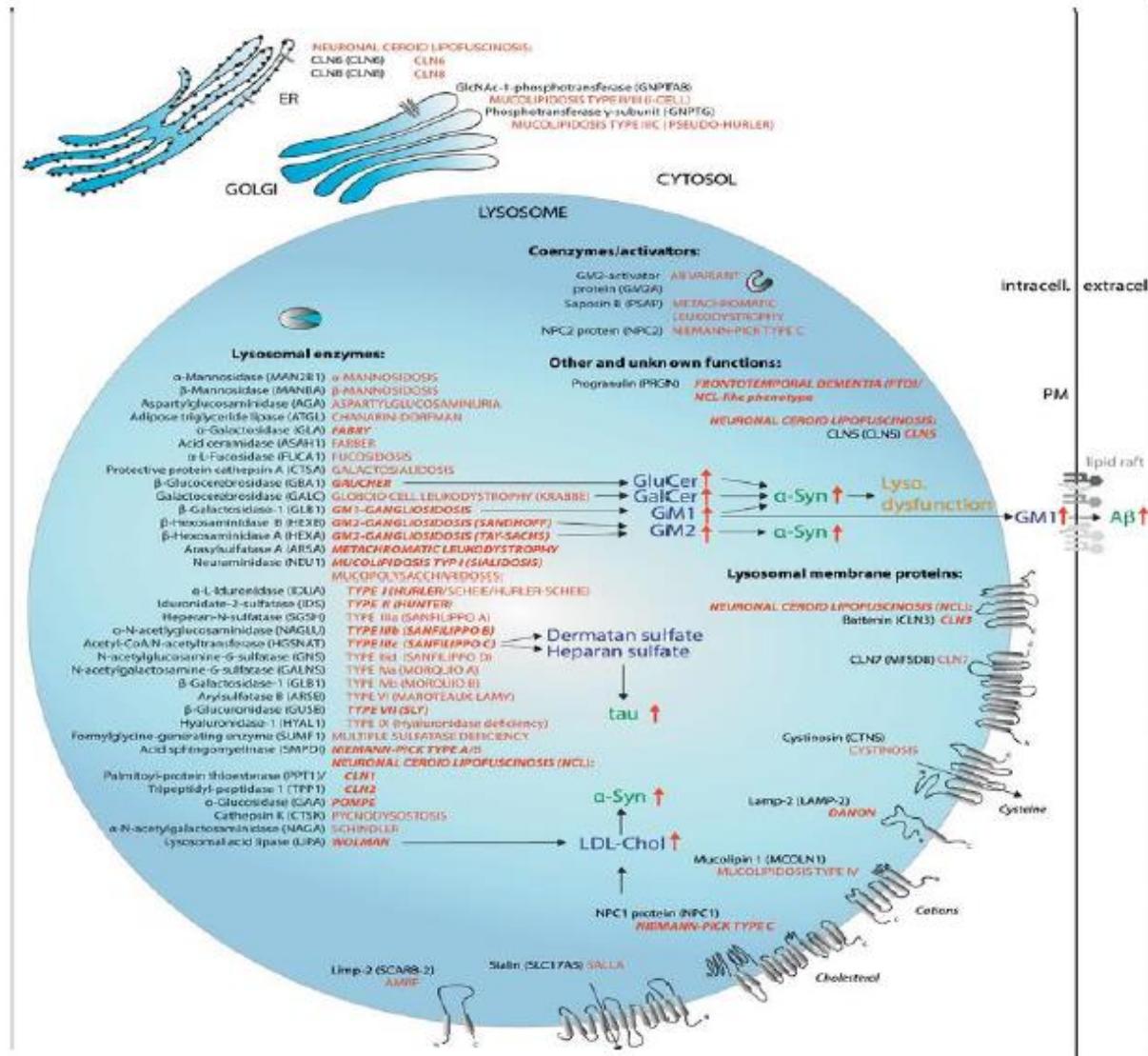
Hay una gran complejidad de genes implicados en estos procesos y por ende, una gran complejidad fenotípica en los pacientes. No obstante, mutaciones en genes que causan enfermedades de almacenamiento lisosomal pueden estar asociadas con síntomas en órganos específicos.



La mayoría de las enfermedades de almacenamiento lisosomal son **resultado de algún defecto de las casi 60 hidrolasas lisosomales**. Se han descrito también un grupo minoritario de deficiencias que afectan a:

- **Defectos en proteínas implicadas en modificaciones post-traduccionales.** Como ejemplo tenemos la **enfermedad de células I (mucolipidosis II y III)** y la **deficiencia múltiple en sulfatasas**.
- **Defectos debidos a proteínas activadoras de hidrolasas lisosomales.**
- **Defectos resultantes de alteraciones en la síntesis o el tráfico intracelular.**

Puede haber patologías que afecten a las propias proteínas cuando están en el retículo endoplásmico, cuando se mueven desde del Golgi o dentro del propio lisosoma. **Dentro del lisosoma, pueden ser las propias enzimas o activadores que tengan que modificar a la hidrolasa lisosomal las que pueden estar afectadas.**



Clasificación de las enfermedades lisosomales

Se han hecho múltiples intentos de hacer una clasificación de las enfermedades lisosomales. Ninguno de estos criterios es del todo adecuado, pero se dividen en:

- **En base al sustrato que se acumula.** Se hablan de **esfingolipidosis**, **mucopolisacaridosis** o **glicoproteinosis**.

Sin embargo, esta clasificación puede llevar a malinterpretaciones, debido a que el sustrato acumulado puede que sea fruto de una acumulación secundaria y no de una acumulación primaria directa fruto de la deficiencia en la proteína mutada.

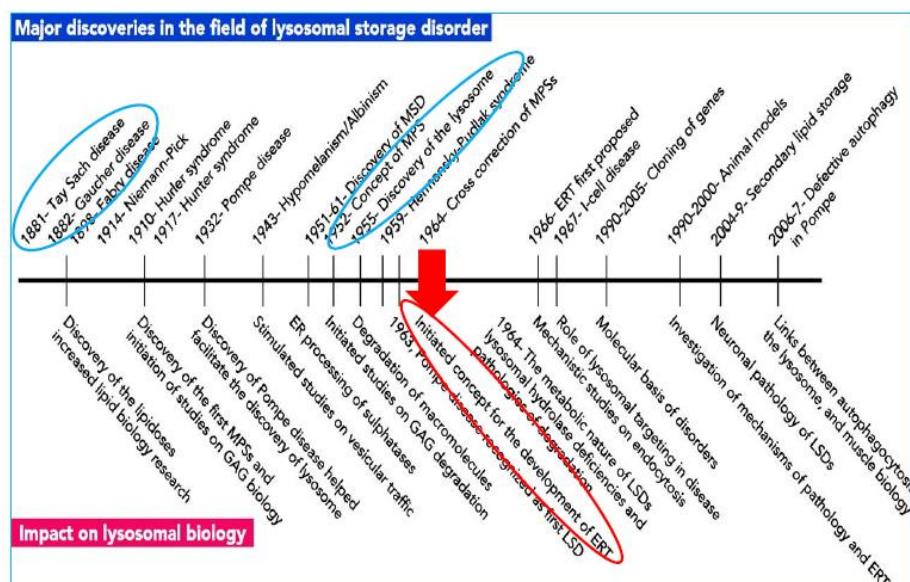
- **Funcional.** Hace referencia a la proteína defectiva.

Table 25-2 Sphingolipid Storage Diseases

Disease	Enzyme Deficiency	Principal Storage Substance	Major Symptoms
G _{M1} Gangliosidosis	G _{M1} β -galactosidase	Ganglioside G _{M1}	Mental retardation, liver enlargement, skeletal involvement, death by age 2
Tay-Sachs disease	Hexosaminidase A	Ganglioside G _{M2}	Mental retardation, blindness, death by age 3
Fabry's disease	α -Galactosidase A	Trihexosylceramide	Skin rash, kidney failure, pain in lower extremities
Sandhoff's disease	Hexosaminidases A and B	Ganglioside G _{M2} and globoside	Similar to Tay-Sachs disease but progressing more rapidly
Gaucher's disease	Glucocerebrosidase	Glucocerebroside	Liver and spleen enlargement, erosion of long bones, mental retardation in infantile form only
Niemann-Pick disease	Sphingomyelinase	Sphingomyelin	Liver and spleen enlargement, mental retardation
Farber's lipogranulomatosis	Ceramidase	Ceramide	Painful and progressively deformed joints, skin nodules, death within a few years
Krabbe's disease	Galactocerebrosidase	Deacylated galactocerebroside	Loss of myelin, mental retardation, death by age 2
Metachromatic leukodystrophy (Sulfatide lipidosis)	Arylsulfatase A	Sulfatide	Mental retardation, death in first decade

Table 25-2
© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Historia de las enfermedades lisosomales



Las primeras enfermedades lisosomales descritas se remontan a principios del siglo XIX. El concepto de terapia de reemplazo enzimático surge en los 60, diez años después del descubrimiento del orgánulo.

En la enfermedad de Gaucher, se ve un aumento en el tamaño del bazo y del hígado. En 1882 se describe una paciente con un bazo muy aumentado con células más grandes y de aspecto inusual, conocidas actualmente como **macrófagos Gaucher**.

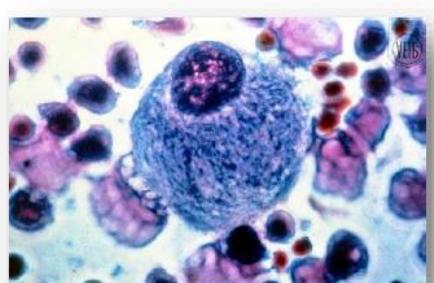
En 1934 se identifica el sustrato acumulado como la glucosilceramida. En los 50-60, se demuestra que en la enfermedad hay un defecto en la enzima glucocerebrosidasa o en la β -glucosidasa, que cataliza la degradación de glucocerebrósidos para dar glucosa y ceramida.

Aunque el defecto es sistémico, el almacenamiento del cerebrósido se restringe sobre todo a los **macrófagos**, provocando **hepato-esplenomegalia** con patología esquelética y pancitopenia. Surge el concepto de la terapia de reemplazo enzimático, consistente en administrar la enzima deficiente. A principio de los 90s, se inicia la comercialización de la **ERT**.

La idea surge porque el lisosoma **puede ser capaz de disponer de una forma de que captara la proteína**. Es sencillo mandar al lisosoma una proteína externa, pues cualquier endocitosis de la célula puede acabar en el lisosoma.

La terapia de reemplazo enzimático sólo funciona en un grupo de pacientes específico, debido a que es necesario dirigir a la proteína a ciertos lugares. Por ejemplo, la terapia de reemplazo enzimático se puede llevar a cabo sobre pacientes **con enfermedad de Gaucher de tipo I porque su afectación no es neurológica**. En otros tipos, la afectación neurológica complica dirigir la enzima hacia el SNC (barrera hematoencefálica).

Gaucher cell 1882



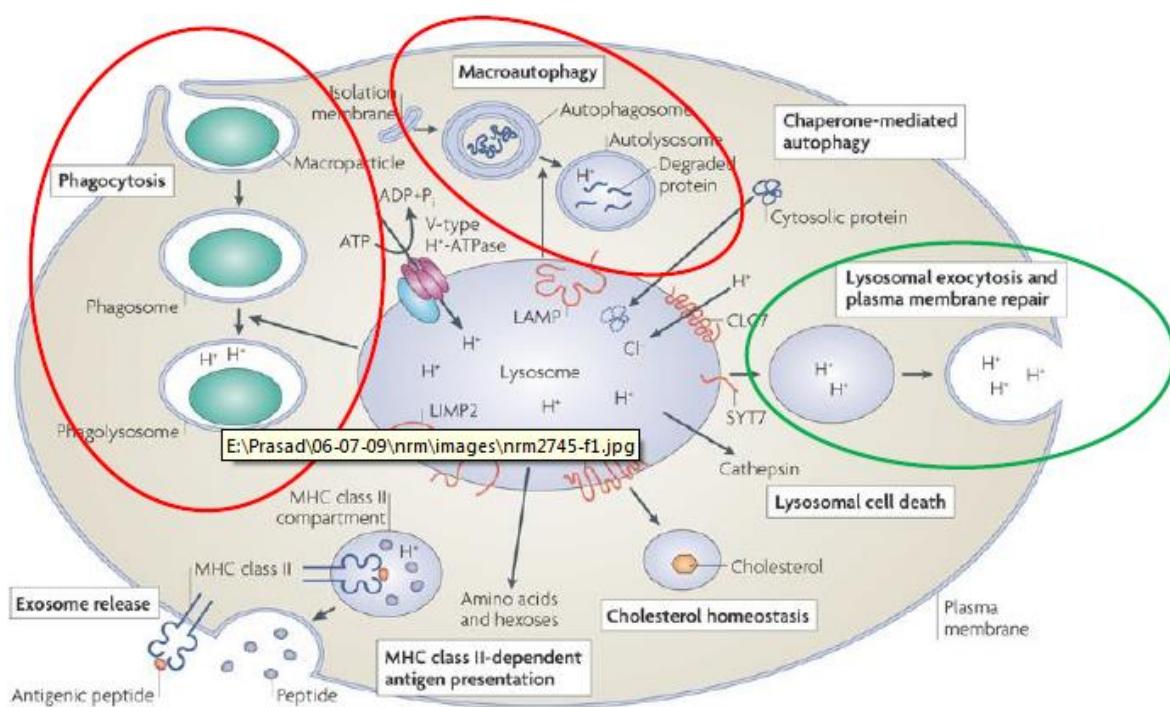
Repasso de la función lisosomal

Función degradativa

Los lisosomas son órganulos subcelulares implicados en la degradación y reciclaje de macromoléculas. Están implicados en distintos procesos como la fagocitosis, la macroautofagia y la exocitosis lisosomal junto con el reciclaje de la membrana plasmática.

El elemento común a todas estas funciones es que los lisosomas son un eslabón más dentro de un **sistema multivesicular en el que participan**.

- Fagocitosis y defensa contra patógenos
- Procesos de macroautofagia
- Exocitosis lisosomal y reparación de membrana
- Liberación de exosomas



Los lisosomas forman parte de un sistema de orgánulos membranosos intracelulares que se conocen como el **sistema endosoma-lisosoma**. El sistema **endosoma-lisosoma** constituye una **red vesicular, dinámica e interconectada**.

Sus principales componentes son:

- **Endosoma temprano.** Se sitúa en la periferia de la célula. Recoge **vesículas procedentes de las invaginaciones desde la membrana**.
- **Endosoma tardío.** Es un compartimento perinuclear. Este, **ha disminuido su pH con respecto al endosoma temprano**, incrementando además la cantidad de vesículas que recibe y adquiriendo, por tanto, una estructura multivesicular.
- **Lisosoma.**

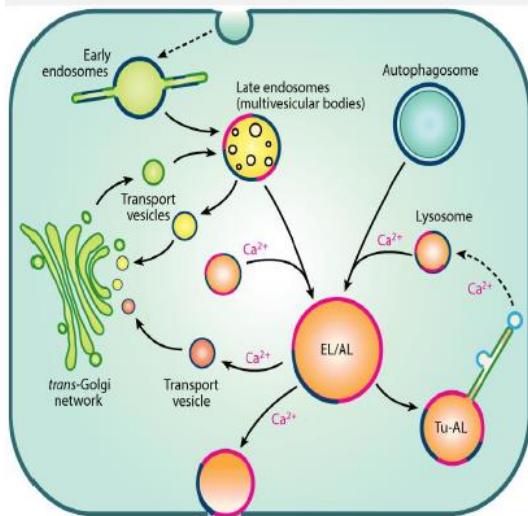
Estos componentes **forman una cadena responsables** del tráfico y digestión de moléculas endocitadas. Estos compartimentos **intercambian su contenido utilizando distintos sistemas de transportes vesiculares, conexiones tubulares o eventos de fusión de tipo kiss and run.**

Hay así toda una red de sistemas vesiculares que van intercambiando material que hace que el último eslabón de la cadena sea el lisosoma. En el lisosoma, se tiene el pH adecuado y ocurre la degradación lítica por la acción de hidrolasas activas.

El tráfico de material entre los distintos compartimentos está gobernado por distintos mecanismos:

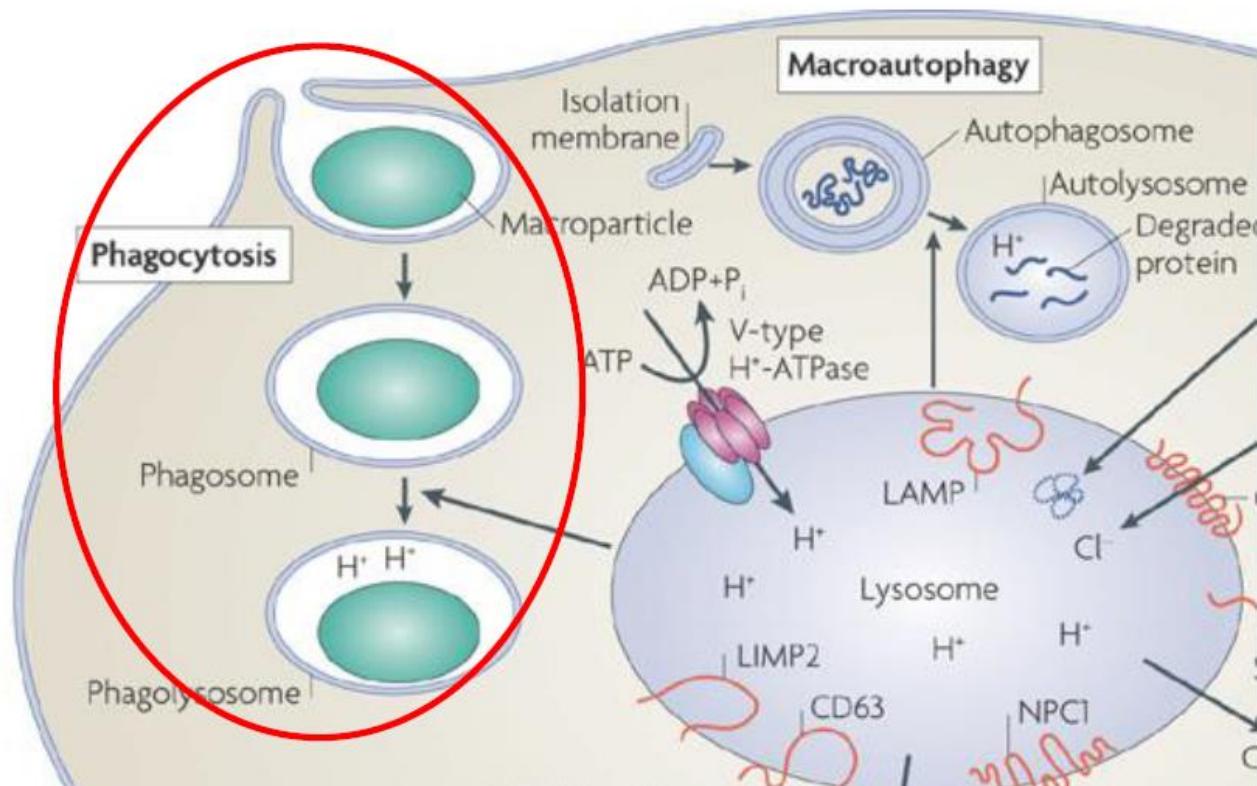
- Endosoma temprano se alarga y forma cuerpos vesiculares con el material a degradar
- Eventos de fusión kiss and run, paso de vesículas de un lugar a otro.

Los lisosomas forman parte de un sistema de orgánulos membranosos intracelulares conocidos colectivamente como sistema endosomal-lisosomal



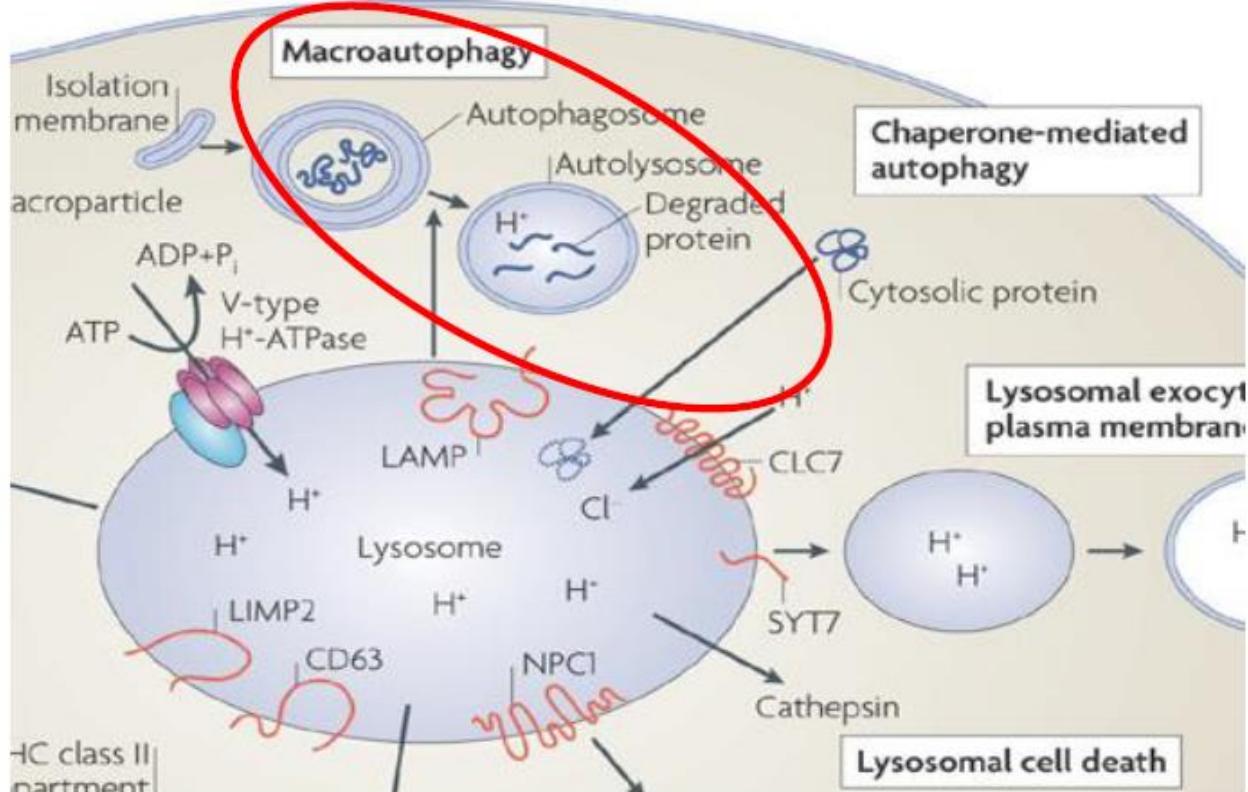
Función de defensa contra patógenos

Los lisosomas son cruciales para la **maduración del fagosomas hasta convertirse en fagolisosomas** durante la fagocitosis. Este paso de fagosoma a fagolisosoma es **fundamental durante los procesos de defensa celular contra patógenos**, permitiendo su eliminación y exposición de antígenos en MHC de clase II en membrana por las células presentadoras.



Función macroautofágica

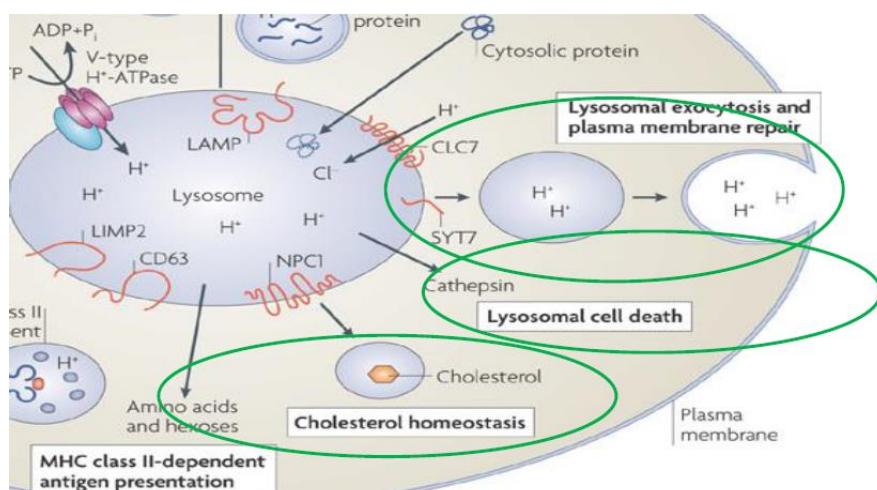
La macroautofagia permite el turnover de los componentes citoplásmicos, incluidos los orgánulos y macromoléculas. Comienza con la formación de membranas aisladas, que se separen regiones del citosol en vesículas llamadas **autofagosomes**. Estas vesículas se fusionan con lisosomas para crear **autolisosomas**, orgánulos ejecutores de la degradación de componentes internos en la célula.



Otras funciones de los lisosomas

Los lisosomas también están implicados en otra serie de procesos:

- **Reparación de la membrana plasmática.** Implicada la proteína sinaptotagmina 7
- **Muerte celular.** Implicadas las distintas catepsinas del interior lisosomal.
- **Eflujo de colesterol.** Implicada la proteína transportadora **NPC1, la proteína de Niemann-Pick**, que se encuentra en la membrana lisosomal.

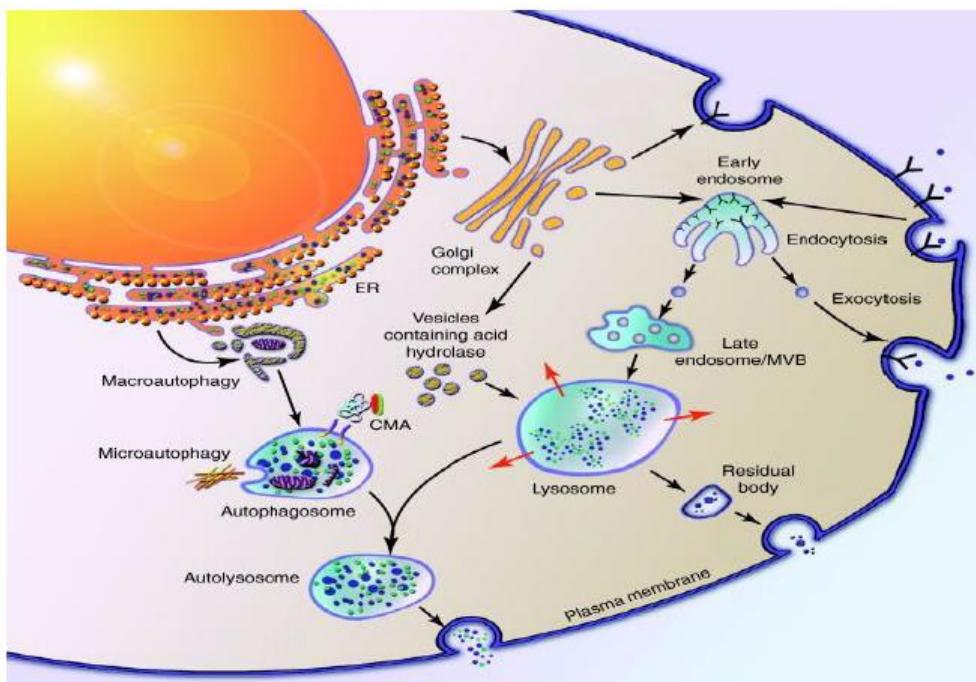


Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades lisosomales – 1-4-2019

Función y biogénesis de lisosomas

Los lisosomas son **frecuentemente gemaciones de membrana procedente de la red trans-Golgi**. Sin embargo, en algunos casos, **son capaces de ensamblarse a partir de endosomas tempranos y tardíos o desde las propias rutas de macroautofagia**, es decir, en vesículas que tienen ya material en su interior.



Los lisosomas no son más que un punto dentro de los distintos sistemas vesiculares dentro de la célula. La biosíntesis de los lisosomas se produce por un intercambio de materiales entre vesículas.

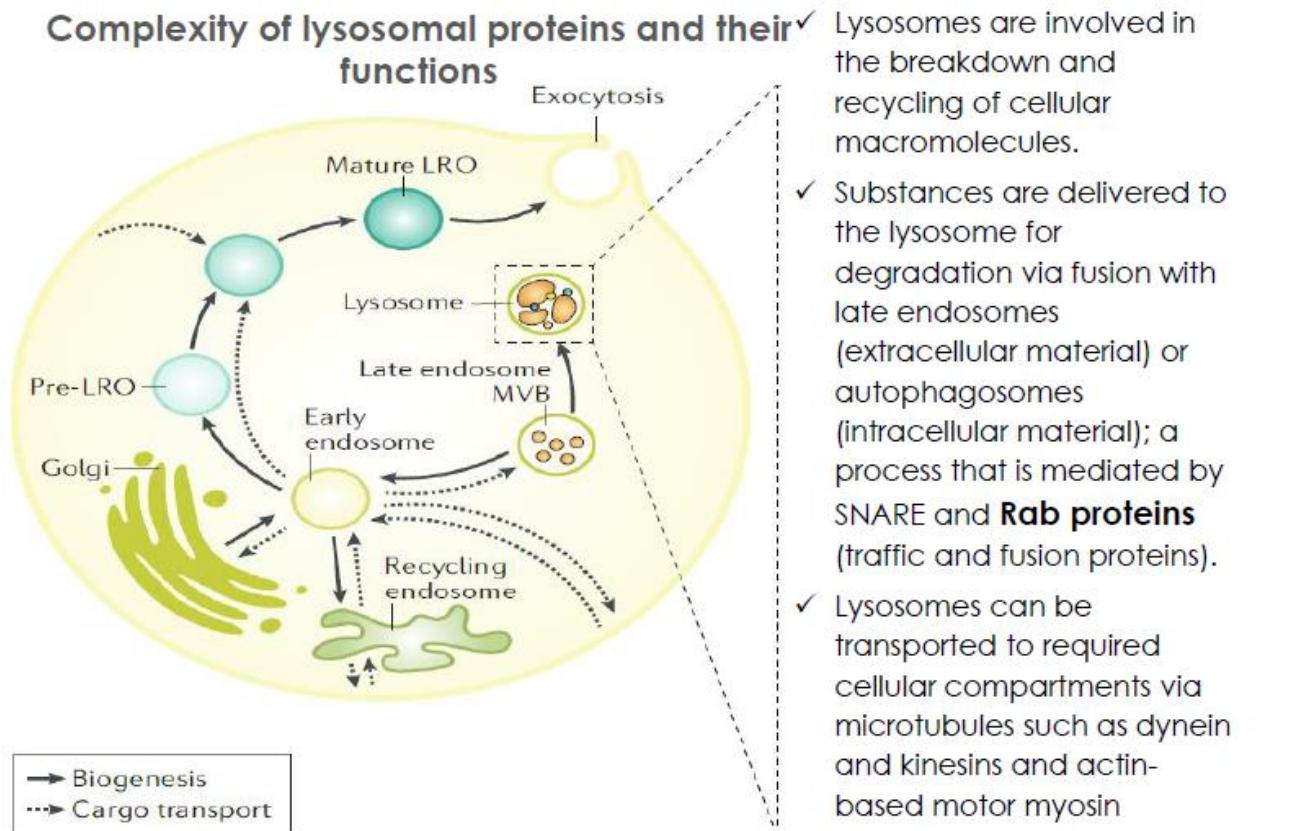
Hasta los lisosomas **tienen que llegar tanto las hidrolasas que degradarán material como el propio material**. Es por ello que es necesario introducir etiquetas en las vesículas de manera que estas no se confundan (el interior de la célula es un caos de vesículas y es necesario saber cuáles de ellas han de sufrir la ruta degradativa y cuáles no).

Tanto los **cargos** que tienen que ir a degradar el lisosoma como aquellas **proteínas** que han de ir para dar lugar a su **función lítica** tienen un **camino parecido**.

Lo más importante es ver qué tipo de etiquetas y qué señales de reconocimiento hacen que membranas que proceden de la membrana plasmática sean capaces de ensamblarse para producirse un endosoma temprano, **qué es lo que hace que un endosoma temprano sea uno tardío con el tiempo y cómo fusionan con o se transforman en un lisosoma**.

La capacidad hidrolítica en todos estos estadios dependerá del pH y de la presencia o ausencia de las moléculas hidrolíticas. Es importante mencionar que en la conversión de unos en otros, **podrían producirse por fusiones**.

Las proteínas de tipo Rab están implicadas en tráfico y fusión. Todas ellas intervienen en estos procesos. En el endosoma temprano, se produce que se adquieran unos tipos de Rab en superficie la presencia de unos u otros Rab hacen que ese endosoma temprano con el tiempo se convierta en algo distinto.



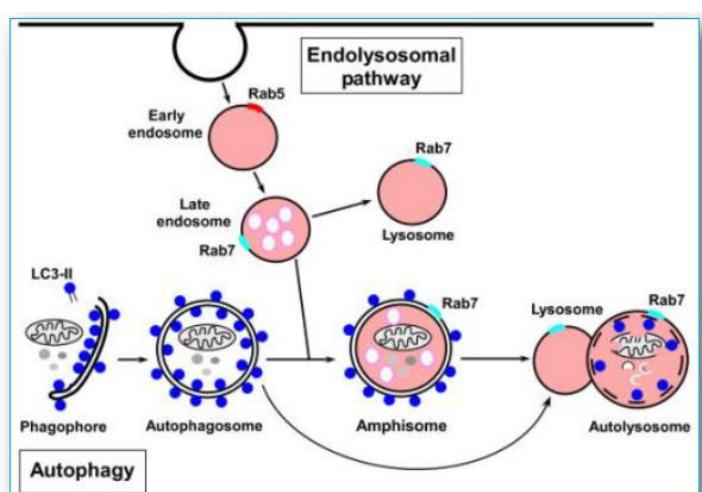
Las Rab GTPasas tienen un estado activo (GTP) y uno inactivo cuando unen ADP. En forma activa reclutan set específicos de proteínas, mediando así procesos como fusión entre endosomas, segregación de receptores, empaquetamientos de vesículas para su envío a otros compartimentos, etc.

Las que nos interesan son sobre todo dos:

- **Rab5**. Es una proteína GTPasa que se localiza en los endosomas tempranos, capaz de mediar la fusión de vesículas endocíticas de la MP para formar el endosoma temprano.

Las señales de reconocimiento entre vesículas son las que producen la fusión. Cuando el endosoma temprano recibe muchas vesículas endocíticas, se vesicula y trae a Rab7.

- **Rab7 media la transformación en endosoma tardío, y de ahí a lisosoma.** Rab7 sería la señal de que el lisosoma pudiera volcar el contenido en el interior del endosoma para la degradación lítica.



La biogénesis de los lisosomas requiere un concierto de un conjunto de rutas biosintéticas y endocíticas controladas por el factor de transcripción TFEB que regula la expresión de 471 genes que constituyen la red CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation).

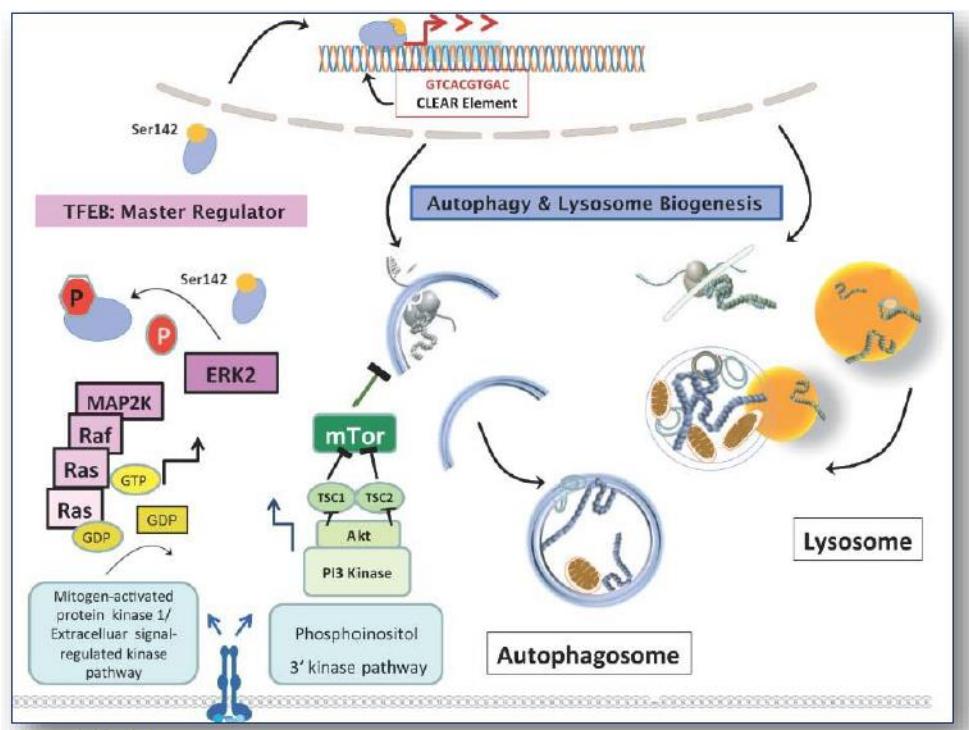
Para la función lisosomal, **hay dos clases de proteínas esenciales:**

- **Hidrolasas solubles.** También llamadas hidrolasas ácidas, implicadas en la degradación de sustratos específicos. Son de distintos tipos, como **cabohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos**.
- **Proteínas integrales de membrana lisosomal (LMPs).** Tienen diversas funciones, entre ellas
 - Acidificación del lumen lisosomal.
 - Importe de proteínas desde el citosol hacia el lumen lisosomal.
 - Fusión de membranas entre lisosomas y otros orgánulos.
 - Transporte de los productos de degradación al citosol (eflujo de monómeros).

TFEB puede estar en dos formas que determinan su actividad traduccional:

- **Defosforilado.** En este estado, TFEB es capaz de desplazarse desde el citosol y entrar en el núcleo, mediando la transcripción de los genes CLEAR. Esta activación de los genes CLEAR activa la ruta autofágica.
- **Fosforilado.** No es capaz de ir al núcleo y se mantiene en el citoplasma, de manera que no se da transcripción de los genes CLEAR.

Esta fosforilación está controlada por una serie de quinasas como **MAPK (Erk2) y la proteína quinasa mTORC1 (inhibidora de la autofagia)**, su activación implica un buen estado nutricional.

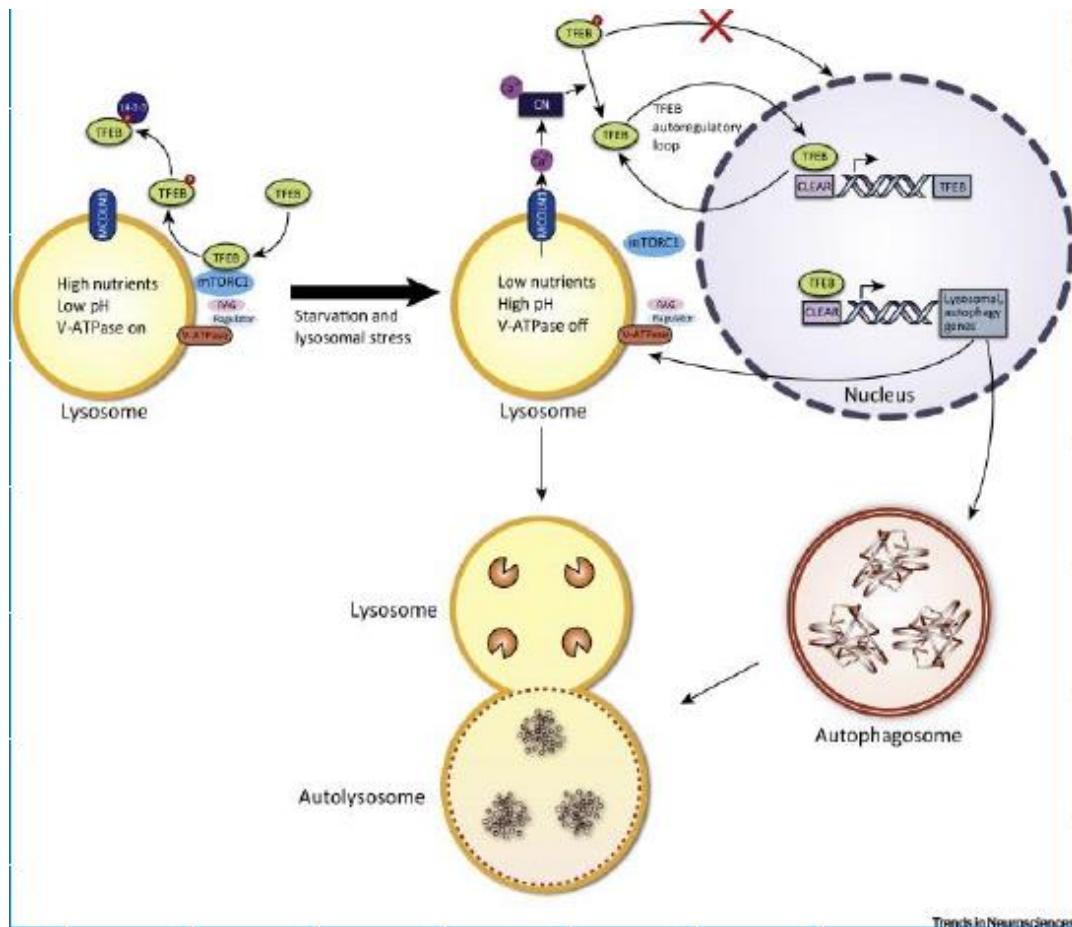


Uno de los mecanismos más reconocidos que modifican la fosforilación o defosforilación de TFEB es el de mTOR.

En condiciones de **nutrientes en el exterior abundantes, como aminoácidos**, la situación en el lisosoma es de **mTOR** en la superficie del lisosoma mediante una interacción con la **Rag GTPasa**, y la **V-ATPasa**. En esa situación basal, **mTOR está activo y es capaz de fosforilar TFEB**.

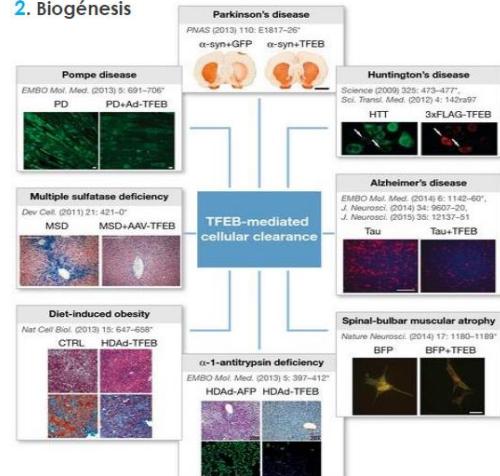
TFEB fosforilado no entra al núcleo y el resultado es que no podemos activar la biogénesis de los lisosomas.

Si bajan los niveles de nutrientes, **provocaría que inmediatamente en la superficie la V-ATPasa se inhibiría, produciendo un desensamblaje del complejo pasando a una forma inactiva**. Al inactivarse **mTOR**, el resultado es que **deja de estar fosforilado TFEB**, siendo capaz de atravesar el núcleo y dar lugar a transcripción de los genes con secuencias CLEAR.



La sobreexpresión de TFEB promueve el **aclaramiento celular** en distintos modelos de ratón para patologías tan variadas como Pompe, Parkinson o Huntington. Así, se promueve la **autofagia**, eliminándose los agregados.

2. Biogénesis

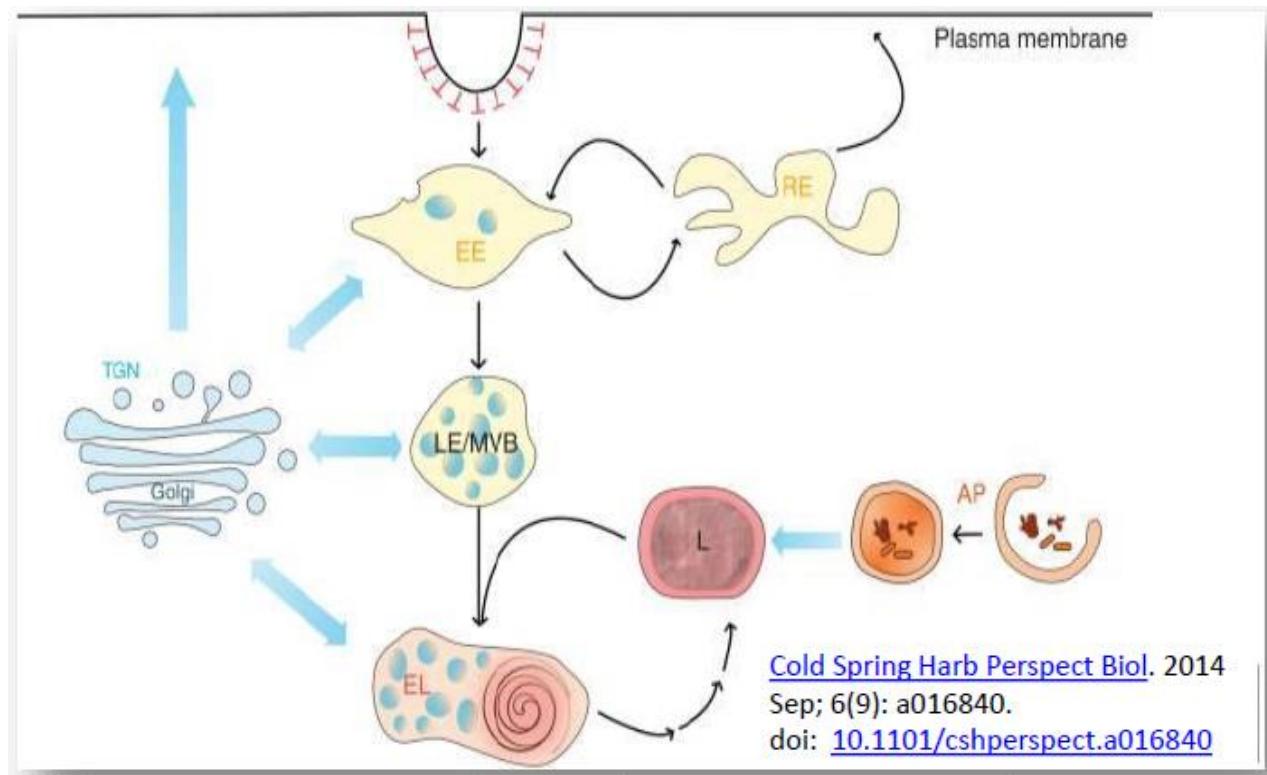


La síntesis y tráfico de proteínas lisosomales es desde el **retículo endoplásmico rugoso**, pero para llegar a los lisosomas **pueden seguir distintos caminos**.

- **Camino directo.** Del **RE al trans-Golgi y de ahí al sistema endosoma-lisosoma**. Entrará en el endosoma temprano, de ahí al tardío y de ahí al endolisosoma.
- **Camino indirecto.** Implica un transporte previo a la membrana plasmática y su posterior endocitosis. Esta endocitosis es **importante en la aplicabilidad terapéutica**.

En el transporte indirecto, se puede seguir la ruta secretora que las manda a la membrana, de donde serán recaptada por endocitosis. Esto fue lo que produjo la idea del reemplazo enzimático.

A los lisosomas, no obstante, también llegan proteínas y cargos para su degradación.



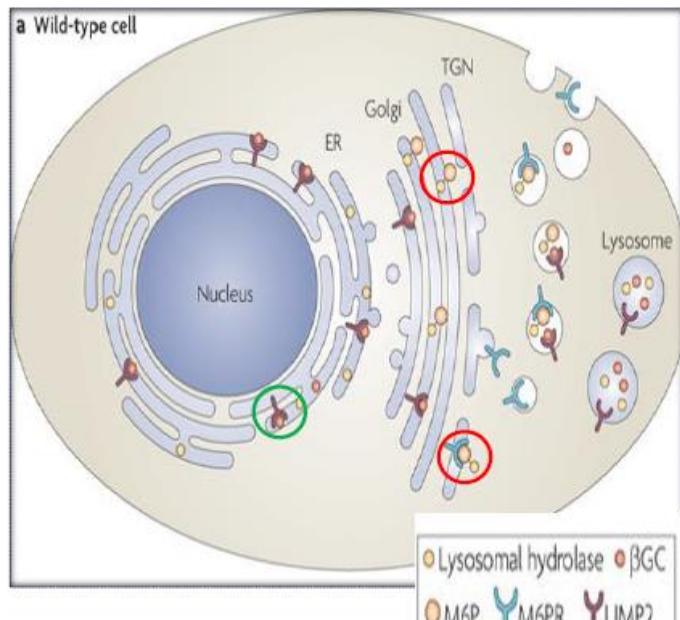
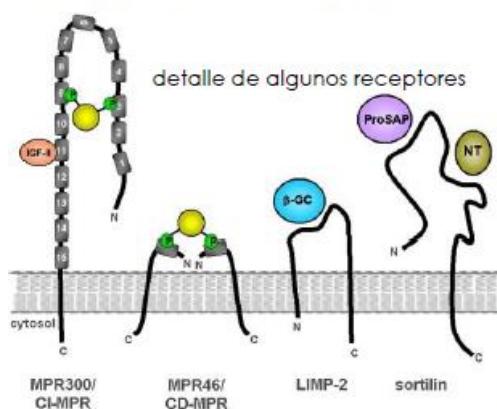
La determinación del destino de las proteínas del lisosoma se produce mediante diversos mecanismos.

La mayor parte de las hidrolasas que pasa por endosoma temprano, tardío y lisosoma, casi todas adquieren una etiqueta, la manosa 6P. La manosa la adquieren por definición, en el Golgi, pero se produce una fosforilación posterior que sirve como etiqueta para dirigir a la proteína al lisosoma.

Esa manosa 6P es reconocida en el trans-Golgi por un **receptor específico, de manosa 6P**. Los receptores de manosa 6P son distintos tipos. Se expresan ubicuamente, **pero no están en el lisosoma, ampliamente distribuidos**.

TRANSPORTE DIRECTO DE HIDROLASAS DEPENDIENTE DE RECEPTOR DE MANOSA 6 FOSFATO

- ✓ La mayoría de las hidrolasas lisosomales adquieren una etiqueta de manosa 6P (M6P) durante su transporte al Golgi. Esta etiqueta será reconocida por receptores M6PR en el trans-golgi (TGN)
- ✓ Hay dos tipos de M6PR y ambos se expresan ubicuamente.

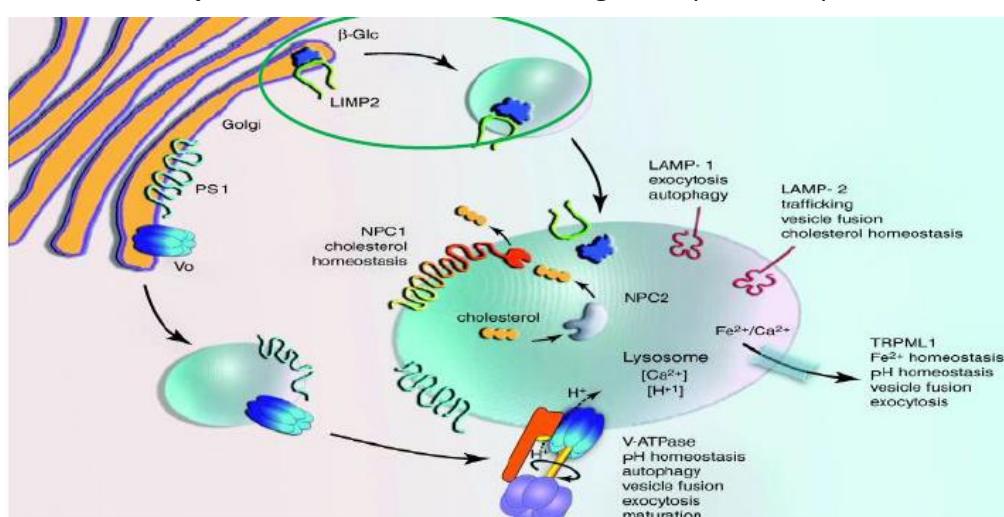


La etiqueta M6-P separa las glicoproteínas destinadas al lisosoma de las que serían secretadas

Otro tipo de transporte hacia el lisosoma pueden ser los mediados por receptores como LIMP2, sortilinas... Son receptores implicados en el reconocimiento proteínas con función lítica.

Por ejemplo, la **β-glucocerebrosidasa** se transporta unida a LIMP2 en el Golgi, una proteína que ensamblada tiene el mismo efecto señalizador y de protección que las de manosa 6P. **Ambas proteínas tienen función en el lisosoma, pues LIMP2 se queda como proteína de membrana lisosomal.** La subunidad Vo de la V-ATPasa, va al lisosoma por medio de unión a la PSEN, por ejemplo.

La existencia de distintas rutas de transporte a los lisosomas



abre distintas posibilidades terapéuticas. En enfermedad de Gaucher, que es una deficiencia de la β GC, se le puede poner una etiqueta de manosa 6P a la β GC en lugar de confiar en su transporte por LIMP2.

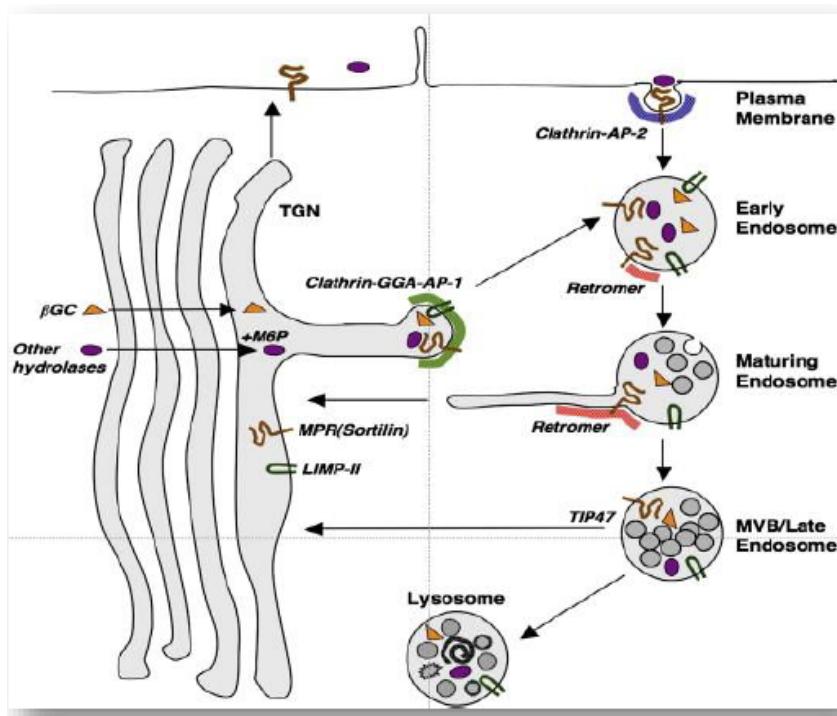
Transporte de proteínas lisosomales desde del TGN.

Lo que sabemos ahora mismo es que en el trans-Golgi, se forman **vesículas similares a las endocíticas con un recubrimiento de clatrina con proteínas adaptadoras que facilitan el desplazamiento a un sentido, permitiendo transportar varias cosas al mismo tiempo (reconocidas por diversos receptores)**. Estas vesículas recubiertas de clatrina viajarían hacia el endosoma temprano, por ejemplo.

Algunas de las proteínas como el receptor de manosa 6P habría que reciclarlo. El mecanismo utilizado es el “retrómero”. En toda la maquinaria, al endosoma temprano llegan: proteínas que tienen que ir al lisosoma, proteínas que tienen que irse a degradar al lisosoma, proteínas unidas a proteínas líticas... Puede haber proteínas sintetizadas en el retículo que se vayan a la membrana, pero se pueden volver a internalizar para llegar a su destino lisosomal.

Por lo tanto es necesario un sistema clasificador. Durante todo este proceso de cambio, se incorporan cada vez más vesículas, cambiando el pH y produciéndose una **liberación de la unión dependiente de pH**.

Cuando llegan al endosoma temprano, la proteína cargo se empieza a quedar acumulada en una zona del endosoma temprano formando vesículas. Dentro del endosoma temprano ya hay distribución, de manera que el receptor se va a una zona tubulada para volver al retículo. El endosoma temprano haría, así, el **sorting** de qué proteínas tienen que volver al TGN y cuáles han de quedarse para la vía lisosomal.



Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Volume 1793, Issue 4, 2009, 605 - 614

✓ El proceso de unión en el RE y liberación al llegar al lisosoma es dependiente de pH (la unión se rompe al pH ácido del lisosoma)

✓ Los lisosomas reciben estas enzimas desde su destino inicial en los endosomas temprano /tardío mediante procesos de fusión

Todas las proteínas hidrolasas tendrán algo de actividad lítica antes del lisosoma.

Una fracción importante de las **proteínas de membrana lisosomal salen del Golgi y viajan hasta la membrana lisosomal**, utilizando la ruta secretora y alcanzan el lisosoma posteriormente mediante su endocitosis por la membrana plasmática o el endosoma temprano.

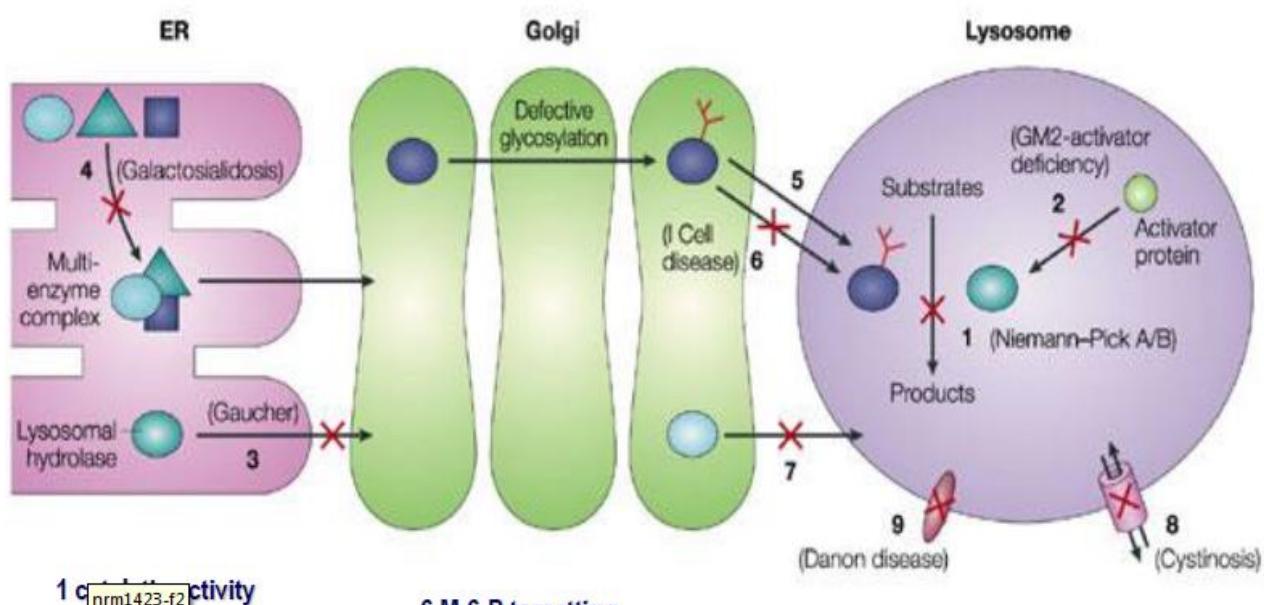
Un caso especialmente problemático es el transporte de **complejos multiproteicos como los canales iónicos**, donde cada una de las subunidades se dirige al lisosoma de manera independiente. Por ejemplo, el tráfico de la subunidad V₀ de la V-ATPasa al lisosoma requiere de la presenilina 1. Se han encontrado mutaciones en la presenilina 1 que alteran dicho tráfico, de manera que no hay V-ATPasa en el lisosoma y este es aberrante, produciéndose una autofagia reducida.

Así, el envío organizado de cargos (en el espacio y en el tiempo) a los distintos intermediarios endosomales es esencial para el ensamblaje de un lisosoma plenamente funcional.

Base bioquímica y celular de las enfermedades de almacenamiento lisosomal

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal tienen distintas causas dependiendo de cuál sea el aspecto de la función lisosomal que encuentre afectado. Entre ellos, estarían:

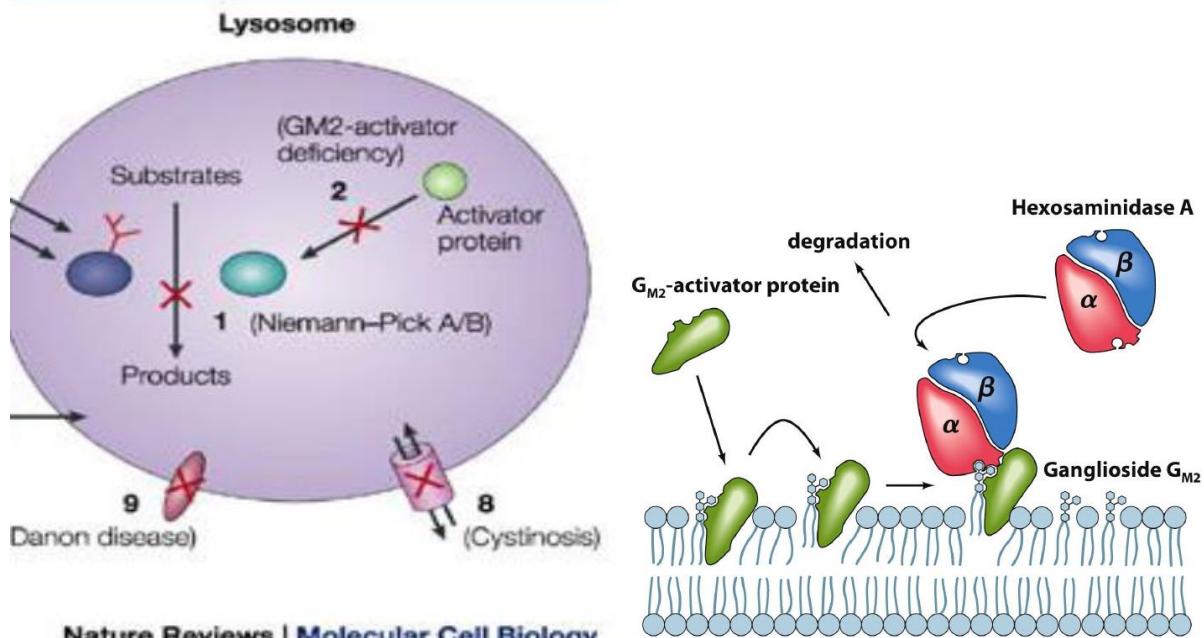
- **Deficiencias en la actividad catalítica de las enzimas hidrolíticas del lisosoma**, como en la enfermedad de Niemann-Pick A/B
- **Deficiencias en la función activadora de proteínas que requieren las hidrolasas.**
- **Defectos en el plegamiento de las proteínas implicadas en la función lisosomal**, que impiden su función y/o localización subcelular correcta, como en algunos tipos de la enfermedad de Gaucher.
- **Defectos en el ensamblaje de complejos multienzimáticos**, como en la galactosialidosis.
- **Defectos de glicosilación que inducen defectos en la localización subcelular de las enzimas.**
- **Defectos en las etiquetas de manosa 6P o en otros pasos del transporte**, como en la enfermedad de células I.
- **Defectos en transportadores membranales de metabolitos a través de la membrana lisosomal.**
- **Defectos en reguladores de la membrana lisosomal**, como la Enfermedad de Danon, o las mutaciones en la proteína LAMP2.



Así, la mayoría de enfermedades de almacenamiento lisosomal son resultado de defectos en la actividad catalítica de enzimas lisosomales. En algunos casos, es la proteína activadora de la

hidrolasa la que está deficiente o ausente. Por otro lado, existen distintas LSDs que son resultado de defectos en proteínas integrales de membrana lisosomales, como transportadores.

- **Cistinosis.** Se produce acumulación de cisteína.
- **Deficiencia en la proteína LAMP2 (crucial para la estabilidad e integridad lisosomal)**



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 25-94
© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Table 1 | Lysosomal storage disorders*

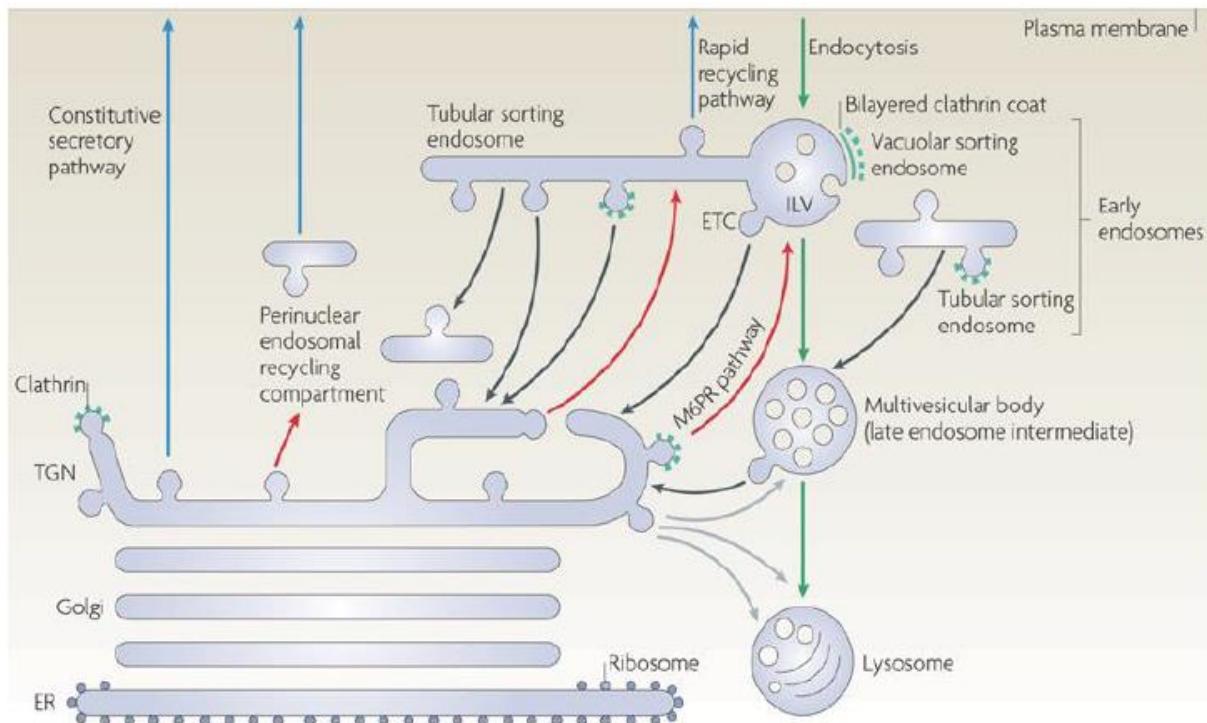
Disease	Defective protein	Main storage materials
Sphingolipidoses		
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriacylceramide and blood-group-B substances
Farber lipogranulomatosis	Ceramidase	Ceramide
Gaucher	β -Glucuronidase	Glucosylceramide
Niemann-Pick A and B	Sphingomyelinase	Sphingomyelin
Sphingolipid-activator deficiency	Sphingolipid activator	Glycolipids
GM1 gangliosidosis	β -Galactosidase	GM1 ganglioside
GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase A	GM2 ganglioside and related glycolipids
GM2 gangliosidosis (Sandhoff)	β -Hexosaminidase A and B	GM2 ganglioside and related glycolipids
GM2 gangliosidosis (GM2-activator deficiency)	GM2-activator protein	GM2 ganglioside and related glycolipids
Mucopolysaccharidoses (MPS)		
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	α -Iduronidase	Dermatan sulphate and heparan sulphate
MPS II (Hunter)	Iduronate-2-sulphatase	Dermatan sulphate and heparan sulphate
MPS IIIA (Sanfilippo)	Heparan N-sulphatase (sulphamidase)	Heparan sulphate
MPS IIIB (Sanfilippo)	N-Acetyl- α -glucosaminidase	Heparan sulphate
MPS IIIC (Sanfilippo)	Acetyl-CoA: α -glucosamine N-acetyltransferase	Heparan sulphate
MPS IID (Sanfilippo)	N-Acetylglucosamine-6-sulphatase	Heparan sulphate
Morquio-A disease	N-Acetylgalactosamine-6-sulphatase	Keratan sulphate, chondroitin-6-sulphate
Morquio-B disease	β -Galactosidase	Keratan sulphate
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetylgalactosamine-4-sulphatase (arylsulphatase B)	Dermatan sulphate
MPS VI (Sly)	β -Glucuronidase	Heparan sulphate, dermatan sulphate, chondroitin-4- and -6-sulphates

Oligosaccharidoses and glycoproteinosis		
Pompe (glycogen-storage-disease type II)	α -Glucosidase	Glycogen
Diseases caused by defects in integral membrane proteins		
Cystinosis	Cystinosin	Cystine
Danon disease	LAMP2	Cytoplasmic debris and glycogen
Infantile sialic-acid-storage disease and Salla disease	Sialin	Sialic acid
Mucolipidosis (ML) IV	Mucolipin-1	Lipids and acid mucopolysaccharides
Niemann–Pick C (NPC)	NPC1 and 2 [‡]	Cholesterol and sphingolipids
Others		
Galactosialidosis	Cathepsin A	Sialyloligosaccharides
I Cell and pseudo-Hurler polydystrophy (ML II and ML III, respectively) [§]	UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosaminyl-1-phosphotransferase	Oligosaccharides, mucopolysaccharides and lipids
Multiple sulphatase deficiency	C α -formylglycine-generating enzyme	Sulphatides
Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL)1 (Batten disease)	CLN1 (protein palmitoylthioesterase-1)	Lipidated thioesters
NCL2 (Batten disease)	CLN2 (tripeptidyl amino peptidase-1)	Subunit c of the mitochondrial ATP synthase
NCL3 (Batten disease)	Arginine transporter	Subunit c of the mitochondrial ATP synthase

Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades lisosomales – 2-4-2019

Interacciones entre las rutas endocíticas y biosintéticas



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Defectos

Enfermedades lisosomales se pueden producir como consecuencia de:

- Defectos en la actividad catalítica de las hidrolasas
- Defectos en activadores
- Defectos que tengan que ver en el transporte de metabolitos
- Defectos que tengan que ver con la estabilidad del propio lisosoma, la función lisosomal o su capacidad de unirse a los autofagosomas
- Defectos en el retículo
- Defectos en el tránsito del retículo al Golgi
- Defectos en la adquisición de manosa 6P en el Golgi

De todas las enfermedades que tienen que ver con el transporte, hay patologías muy relevantes como Niemann-Pick, pero podemos fijarnos en la enfermedad de Danon, producida por mutaciones en LAMP2, una proteína muy abundante en la membrana lisosomal.

LAMP2 tiene que ver con la estabilidad e integridad de los lisosomas, teniendo una acumulación de restos celulares por defectos en autofagia en la enfermedad.

Patologías

Mal plegamiento a nivel de retículo endoplásmico

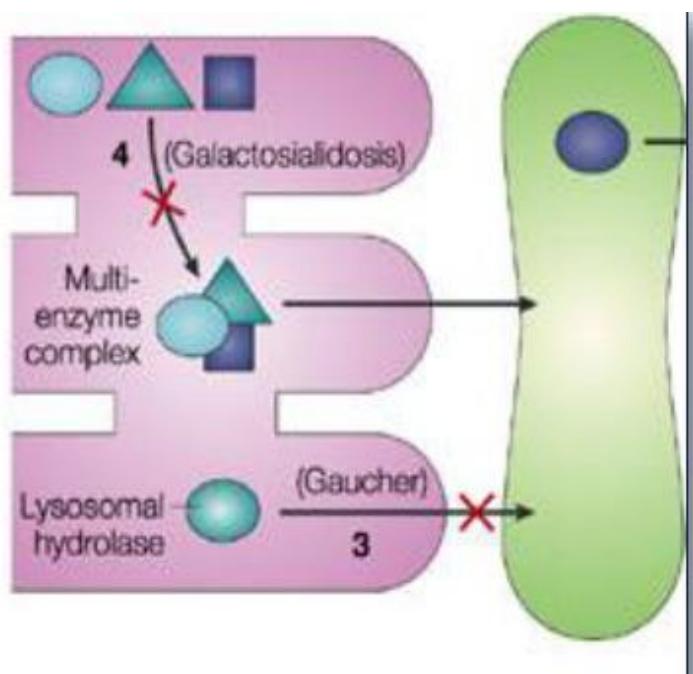
El plegamiento erróneo a nivel de retículo endoplasmático puede producir una **falta de transporte adecuada al Golgi**. Este transporte deficiente se puede producir **bien porque hay un plegamiento incorrecto de la proteína o porque el complejo multienzimático requerido para el transporte no se ensambla correctamente**.

Una patología relacionada con un **misfolding** es una mutación concreta que produce **enfermedad de Gaucher**, que produce un **plegamiento incorrecto en la β -glucocerebrosidasa**, haciendo que esta no se transporte correctamente al Golgi.

Todas las proteínas que tienen que ir al lisosoma a cumplir su función, casi todas adquieren una etiqueta de manosa 6P. No todas las proteínas tienen ese tipo de etiquetas. La β GC es capaz de unirse a LIMP2 y moverse unida a LIMP2.

Otro defecto, esta vez asociado al ensamblaje de un complejo multienzimático, es el de la **galactosialidosis**. En este caso, **hay una deficiencia en tres proteínas que tienen que ensamblarse en el retículo endoplásmico y protegidas son transportadas hasta su destino final en el lisosoma**.

Las componentes de este complejo son la **catepsina A**, **sialidasa** y **β -Gal**. Estas tres proteínas tienen que ver con la degradación de un tipo concreto de glucoproteína. Si la catepsina A no forma un dímero, **el resultado es que no es capaz de ensamblarse con sialidasa y β -Gal, teniendo una deficiencia múltiple de estas enzimas en el lisosoma**. En células de pacientes, se sobreexpresa catepsina A, bajando los niveles de acumulación de los metabolitos.



Modificaciones post-traduccionales

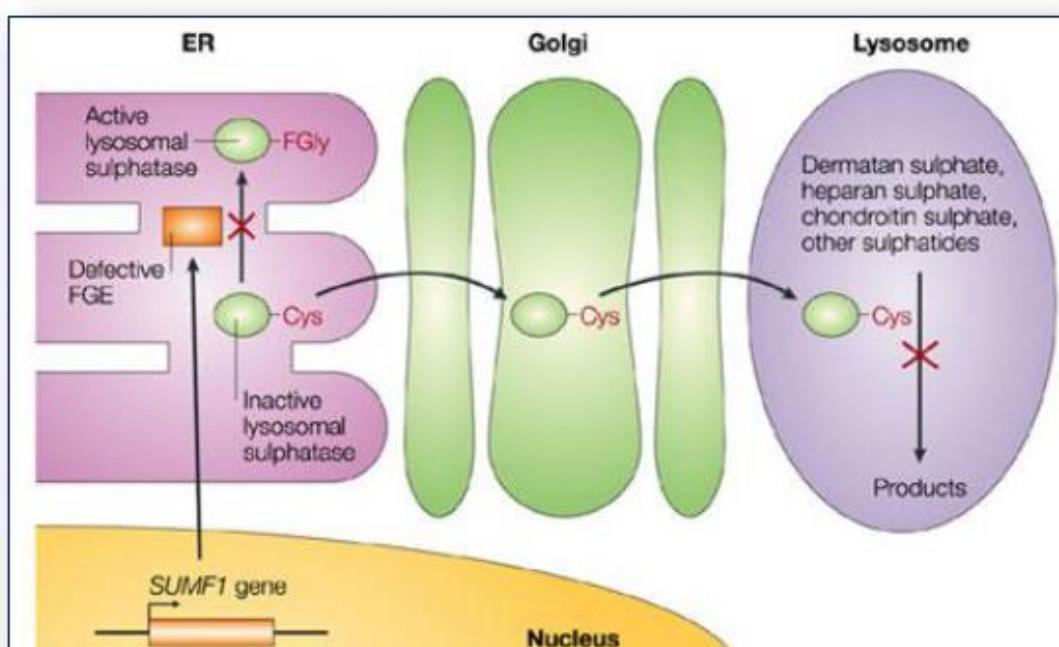
Principalmente, se producen a nivel de glicosilación, etiquetado, etc.

Por ejemplo, una glicosilación deficiente en el aparato de Golgi podría provocar una disminución en la actividad catalítica de la hidrolasa correspondiente o un defecto en la transferencia de fosfato al residuo de manosa provocaría una unión ineficaz de las proteínas lisosomales al receptor de manosa 6P. Las hidrolasas no llegan así a su destino, y se observa un incremento de las mismas en el plasma debido a que toman la ruta secretora.

La pérdida de una etiqueta concreta de manosa 6P, produce la enfermedad de células I en la que no funciona la transferasa del fosfato a la manosa 6P. Esto produce un defecto múltiple, mostrándose cantidades reducidas de proteínas como α -manosidasa, β -hexoaminidasa, 4-sulfatasa, iduronato-2-sulfatasa, α -L-iduronidasa, α -galactosidasa o α -D-glucosidasa.

En la enfermedad de células I, lo que ocurre con las hidrolasas es que no adquieren el fosfato. Muchas de estas enzimas son capaces de salir al torrente circulatorio, pudiendo producir un daño lítico en otros tejidos. Esta es una enfermedad curiosa, pues no es de todas las células.

El hígado de los pacientes, tiene cantidades normales de estas enzimas, lo que quiere decir que en el hígado utilizan rutas diferentes de transporte.



Otra patología llamativa es la deficiencia múltiple en sulfatasas. Las sulfatasas son **proteínas implicadas en eliminar los ésteres sulfato**, habiendo sulfatasas lisosomales y algunas otras de fuera de los lisosomas, pero todas necesitan una modificación.

Se sintetizan con una cisteína en un centro activo que ha de ser transformada en formil-glicina. Si la enzima que produce el residuo de formil-glicina, la SUMF1 (proteína formadora de formil-glicina) no funciona, en el centro activo de la sulfatasas hay un problema de catálisis.

Las proteínas llegarán a su destino, pero no serán funcionales. Por lo tanto, el defecto es múltiple pero monogénico.

Otros defectos

Algunas de estas proteínas se transportan por medio de adaptinas, clatrinias, fusiones de vesículas, etc. Todos estos pasos su susceptibles de fallar y provocar patología que afecten.

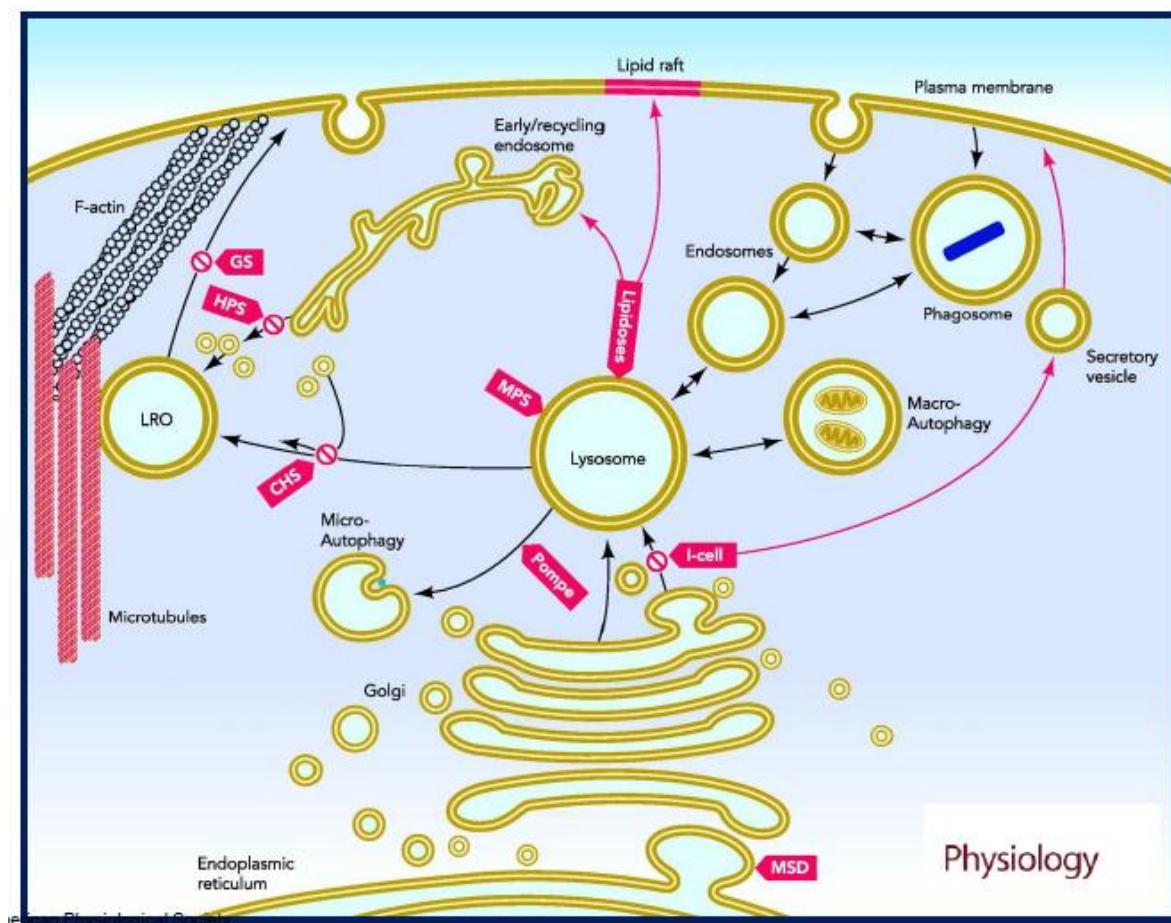
ENFERMEDADES LISOSOMALES RESULTANTES DE DEFECTOS EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA LISOSOMAL

Disease	Clinical pathology	LMP	TM helices	Presumed function
Action myoclonus-renal failure syndrome	Autosomal recessive progressive myoclonic epilepsy associated with renal failure	LIMP2 (also known as SCARB2) ^{110,129}	2	Transport of β GC to lysosomes, lysosomal biogenesis and sorting of vesicles to apical membranes
Cobalamin F-type disease	Developmental delay, stomatitis, glossitis, seizures and minimal methylmalonic aciduria	LMBRD1	9	Lysosomal export of cobalmin
Cystinosis	Pathology of kidney, eye, liver, muscles, pancreas, brain and white blood cells, as well as diabetes, hypothyroidism and end-stage kidney failure	Cystinosin	7	Lysosomal H ⁺ and L-cysteine symport
Danon disease	X-linked vacuolar cardiomyopathy, myopathy and variable mental retardation	LAMP2 (REF. 156)	1	Chaperone-mediated autophagy, macroautophagy, lysosomal fusion and motility
Niemann-Pick type C	Hepatosplenomegaly, thrombocytopenia, ataxia, dysarthria, dysphagia, dystonia, dementia and seizures	NPC1	13	Lysosomal lipid and cholesterol export
Mucolipidosis type IV	Autosomal recessive genetic disorder with delayed psychomotor development and ocular aberrations	MCOLN1 (REF. 126)	6	Lysosomal cation (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Fe ²⁺ and H ⁺) channel
Mucopolysaccharidosis type IIIC	Progressive dementia, mental deterioration in childhood, hyperactivity, sleep disorders and loss of speech	HGSNAT	11	Transfer of cytosolic acetyl-CoA to luminal α -glucosamine residues of heparan sulphate
Malignant infantile osteopetrosis	Anaemia, thrombocytopenia, granulo-cytopenia, blindness, deafness, fractures and infections	CLC7 OSTM1	18 1	H ⁺ and anion (Cl ⁻) antiport CLC7 subunit
Neuronal ceroid lipofuscinosis (late infantile)	Ataxia and seizures with rapid mental deterioration	CLN7 (also known as MFSD8)	12	Transport of sugars, drugs, inorganic and organic cations and other metabolites
Neuronal ceroid lipofuscinosis (juvenile)	Early progressive vision loss, seizures and ataxia or clumsiness	CLN3	6	Membrane transport
Salla disease	Nystagmus, hypotonia, cognitive impairment and reduced muscle tone and strength	Sialin	12	H ⁺ and sugar symport (resulting in the export of sialic acids and acidic hexoses) and asparagine and glutamine import

*A more detailed description and additional primary references for the different diseases can be found in the main text and in a recent review by Ruivo et al.¹¹.
 β GC, β -glucuronidase; CLC7, Cl⁻ channel protein 7; CLN, ceroid-lipofuscinosis neuronal protein; HGSNAT, heparan- α -glucosaminide N-acetyltransferase; LAMP2, lysosome-associated membrane protein 2; LIMP2, lysosome integral membrane protein 2; LMBRD1, limb region 1 domain-containing protein 1; LMP, lysosomal membrane protein; MCOLN1, mucolipin 1; NPC1, Niemann-Pick C1 protein; OSTM1, osteopetrosis-associated transmembrane protein 1; TM, transmembrane.

Resumen de algunas

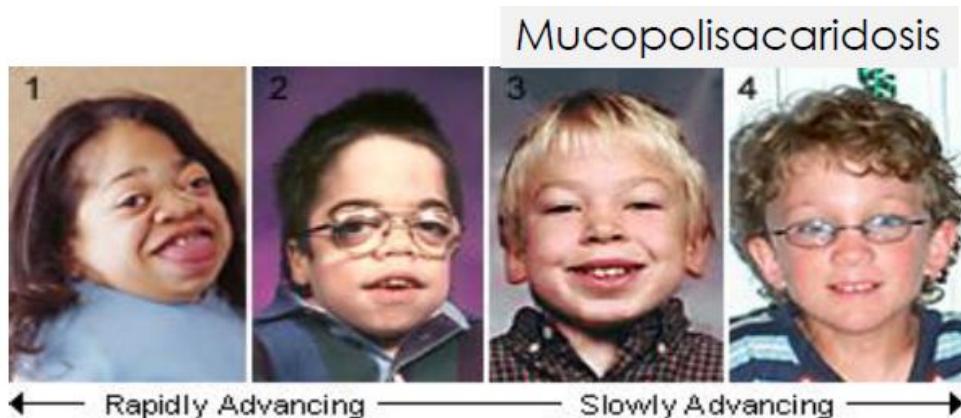
- **Células I.** Se produce por una disfunción en la quinasa de manosa, no produciéndose la etiqueta de manosa 6P y por lo tanto, habiendo un defecto en el transporte de hidrolasas al lisosoma.
- **Deficiencia múltiple en sulfatasas.** Se produce por una disfunción en la proteína formadora de formil-glicina a partir de cisteínas, **crucial en la catálisis de las sulfatasas.** Las sulfatasas no son funcionales sin esta modificación, **de manera que se da una deficiencia múltiple en estas.**
- **Lipidos.** Afectan a la estructura de la membrana y a la composición de lípidos, **producido alteraciones a nivel de señalización celular. Podrán ser más evidentes dependiendo de cuál lípido se acumule.**
- **Enfermedad de Pompe.** Se ve **afectada la microautofagia.** El lisosoma engloba fracciones de citoplasma con glucógeno y se degrada por la α -glucosidasa. Si hay una patología relacionada con ella, **se produce una acumulación de glucógeno en el interior celular. La enfermedad de Pompe es una glucogenosis.**
- **Albinismo, etc.** Tiene que ver con los LROs, lysosomes related organelles.



Fenotipos de los pacientes

Las LSDs afectan a casi todos los órganos y sistemas, pues estos orgánulos están implicados en procesos de remodelación tisular, defensa contra patógenos... La gravedad varía mucho de unas a otras. Muchas de las enfermedades, suelen tener presentaciones neurológicas pero no todas.

Varían en gravedad desde formas relativamente más suaves hasta las formas más graves que rápidamente progresan hacia presentaciones neurológicas.



Algunas enzimas lisosomales se expresan en casi todas las células, porque responden a la necesidad de una remodelación de la célula, correspondiéndose con una remodelación a nivel tisular. No obstante, los sustratos sobre los que actúan tienen una distribución menos uniforme. Esto determina con ello qué tejidos se verán más afectados.

- Por ejemplo, la concentración de gangliósidos es elevada en el sistema nervioso. Es por ello que las gangliosidosis cursan como una enfermedad neurodegenerativa.
- Por otro lado, el queratán y dermatán sulfato son abundantes en tejido esquelético. Es por ello que las mucopolisacardosis que afecten a sus rutas degradativas se caracterizan por presentar anomalías en el hueso y el cartílago esquelético.

Mucopolisacardosis

Son un grupo de enfermedades de depósito lisosomal causadas por deficiencias de diversas enzimas implicadas en la degradación de los glicosaminoglicanos (GAGs), conocidos también como mucopolisacáridos.

Clasificación: Metabolismo de las moléculas complejas » Enfermedades lisosomales

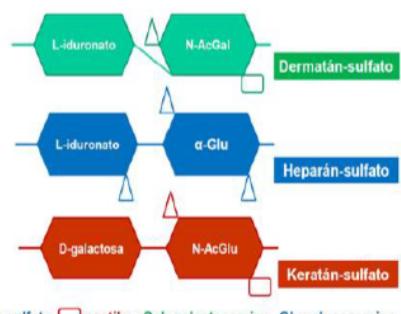
¿Qué GAGs se acumulan en las MPS?

Los más importantes son el dermatán sulfato, el heparán sulfato y el keratán sulfato, aunque también se acumulan en algunas MPS el condroitín sulfato y el ácido hialurónico. En general, están formados por repetición de dos unidades de azúcares simples, algunos sulfatados o acetilados unidos a un ácido urónico (idurónico o glucurónico).

¿Qué son los mucopolisacáridos (GAGs)?

Son largas cadenas lineales de azúcares complejos, muchos de ellos unidos a proteínas formando proteoglicanos. Están situadas en la superficie de las células y en la matriz extracelular, a la que aportan viscosidad. Intervienen en la formación de los huesos, cartílagos, tendones, córnea, piel y tejido conectivo. Se hallan también en el líquido sinovial (líquido viscoso que lubrica nuestras articulaciones).

Estructura de GAGs acumulados en MPS



El **dermatán sulfato** está formado por N-acetilgalactosamina sulfatada unida a ácido idurónico y glucurónico. Se degrada por acción de glicosidasas y sulfatasas, enzimas que liberan a los componentes de la cadena.

Fenotipos clínicos en LSDs

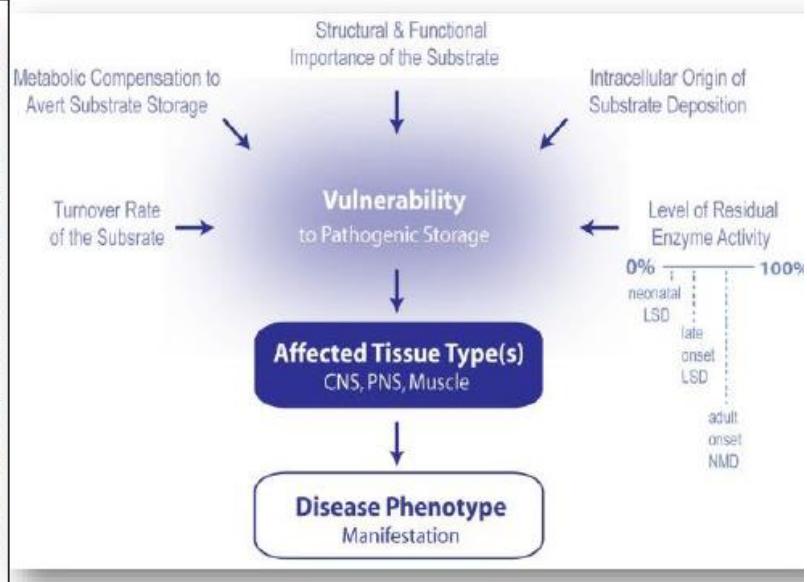
El fenotipo clínico presenta **una heterogeneidad, no solo entre las distintas categorías de LSDs**, sino también incluso dentro de una única patología. Esta amplia variedad clínica se relaciona con los diferentes tipos de sustratos almacenados y las localizaciones del almacenamiento.

Las manifestaciones clínicas **tienden a ser de clínica progresiva**, a medida que se acumula el sustrato sin degradar.

Hay presentaciones clínicas muy variables,

- **Dependiendo del material que no se pueda degradar.**
- **Dependiendo de la cantidad de sustrato que se acumula en el determinado tejido.**
- **Dependiendo de la capacidad de compensación metabólica del tejido en cuestión**
- **Dependiendo de la tasa de remodelación tisular del tejido, dependiendo del daño que reciben: enterocitos, queratinocitos, hematíes...**
- **Dependiendo de la actividad residual.** No es lo mismo que la hidrolasa tenga una mutación disfuncional y lo esté con una actividad residual del 15% o del 1%. Esto producirá una gradación en la gravedad y precocidad de la presentación de la enfermedad.

La figura ejemplifica alguno de los factores relevantes para entender las distintas expresiones fenotípicas. Variaciones celulares en el turnover, respuesta metabólica compensatoria, actividad residual, tipo de sustrato, diferencias celulares en cuanto al papel en este caso del lípido acumulado para la estructura celular o en procesos de señalización son factores que afectan a la vulnerabilidad tisular y que por tanto tienen su reflejo en la manifestación fenotípica

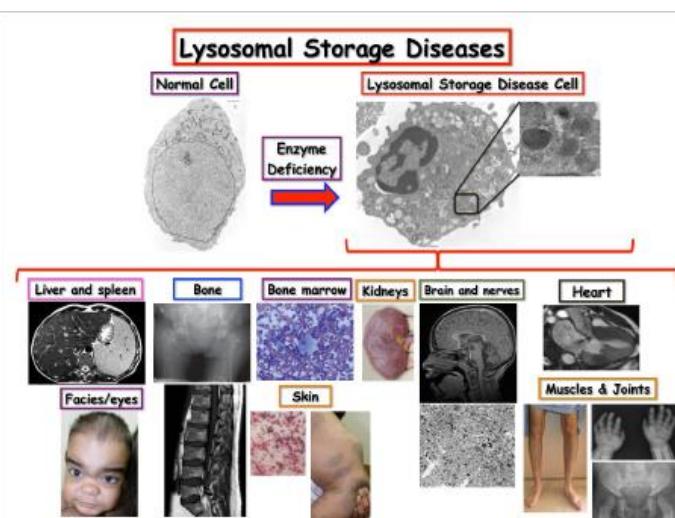
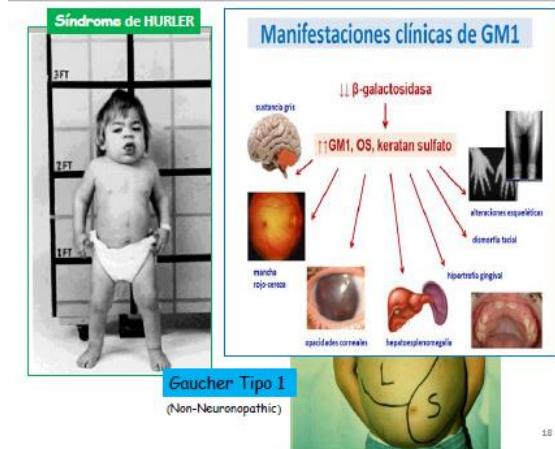


Síntomas

- **Rasgos faciales toscos, en ocasiones con macroglosia.** Es importante en este caso comparar con los rasgos faciales propios de la familia.
- Opacidad corneal o anomalías oculares relacionadas.
- Angioqueratoma. **Enfermedad de Fabry.** Se acumulan globósidos, en la membrana de los endotelios capilares.
- Hernias umbilicales o inguinales
- Baja estatura

- Retrasos en el desarrollo
- Deformidades articulares
- Viscero-megalía en hígado y bazo especialmente
- Debilidad muscular o falta de control motor (ataxias, convulsiones, etc)
- Disminución o pérdida de desarrollo adquirido, incluidas habilidades motoras y cognitivas.

En Pompe: cardiomegalia (por acumulación de glucógeno, produciendo **hipertrofia cardíaca**).



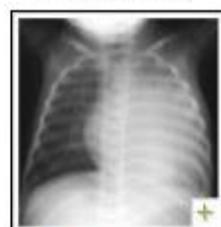
Angioqueratoma



Deformidades articulares



Cardiomegalia



Pompe

Causas primarias y secundarias

El acúmulo es causa de patología en ocasiones, pero no hay una relación estrictamente directa entre el almacenaje, sino que hay alteraciones en complejas cascadas de señalización.

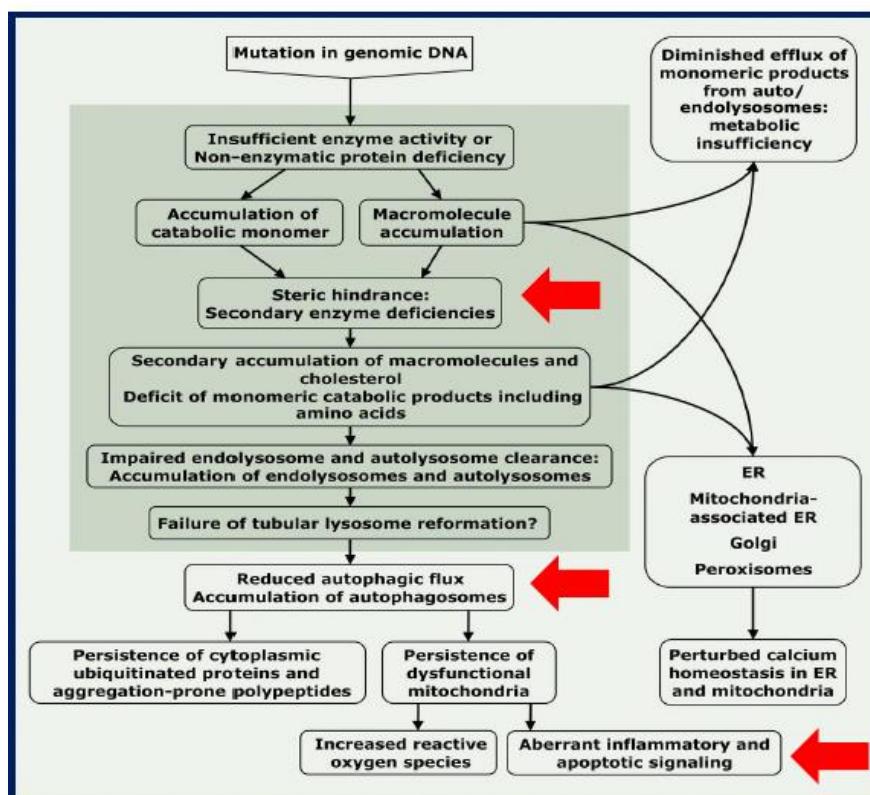
Por otro lado, el efecto final será una serie de cambios bioquímicos y celulares con importantes implicaciones en la progresión de la enfermedad y la terapia.

Hipotéticamente, se puede llegar a trazar una cascada de eventos que podrían ocurrir durante el transcurso de las enfermedades de almacenamiento lisosomal.

- **Acúmulo del sustrato en forma de macromolécula o el monómero catabólico.** Tanto si se produce un acúmulo como si se produce una “no-llegada” del monómero para regenerar, hay defectos en la **remodelación**.
- **Alteraciones a nivel estérico dentro del lisosoma.** Esta alteración estérica podría **modificar secundariamente otras actividades enzimáticas**.
 - Se pueden modificar otras rutas.
 - El equilibrio hídrico y estérico puede modificar la actividad enzimática de otras rutas, **producido la acumulación de otros metabolitos**. Es decir, **puede ser que el metabolito acumulado primariamente no tenga nada que ver con dónde se encuentra el defecto a nivel genético**.

Uno de los materiales que se pueden acumular es, por ejemplo, el colesterol. Así, se puede alterar la remodelación de muchas de las estructuras celulares.

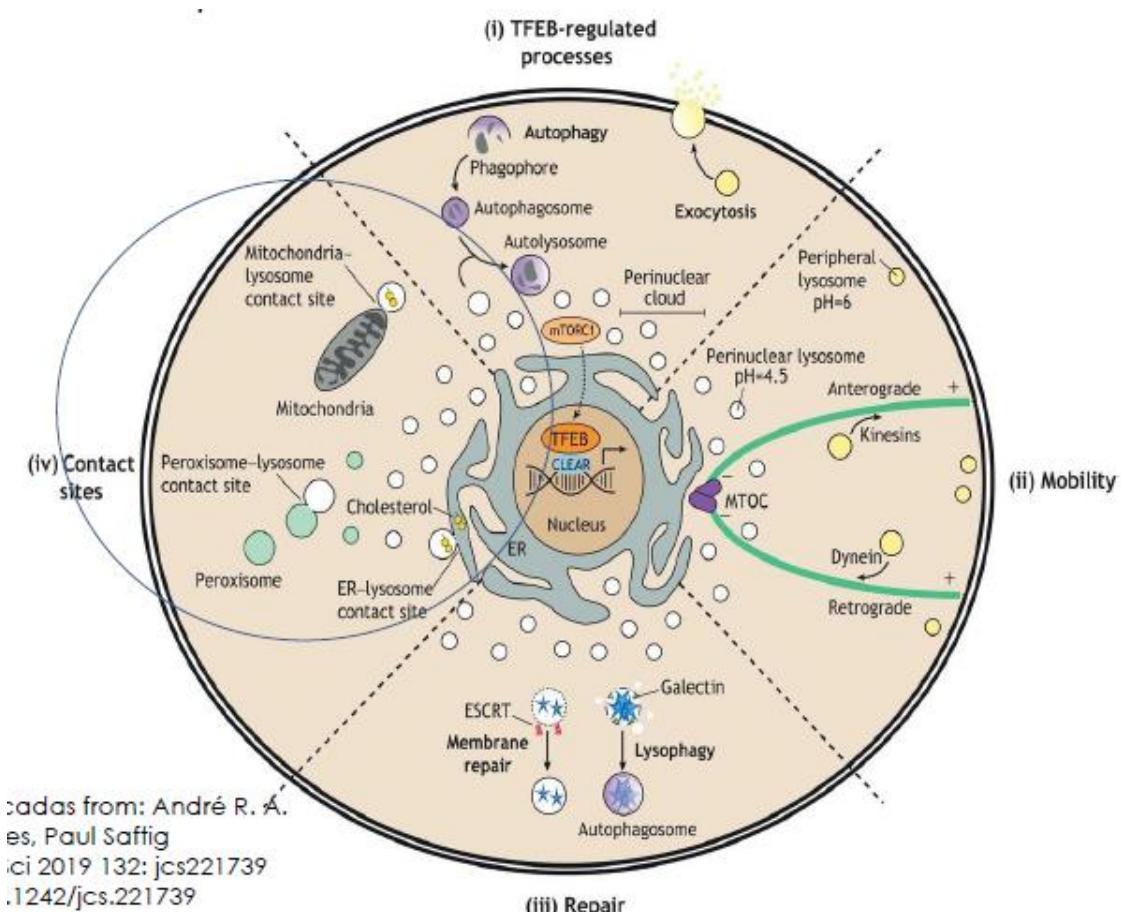
- **Alteraciones en la capacidad de interacción inter-organular del lisosoma.**
 - **Reducción en el flujo autofágico.** Se puede suplir por otras vías, though.
 - Se ve implicada la lisofagia, es decir, la autofagia de los propios lisosomas.



Mecanismos generales de patogenia

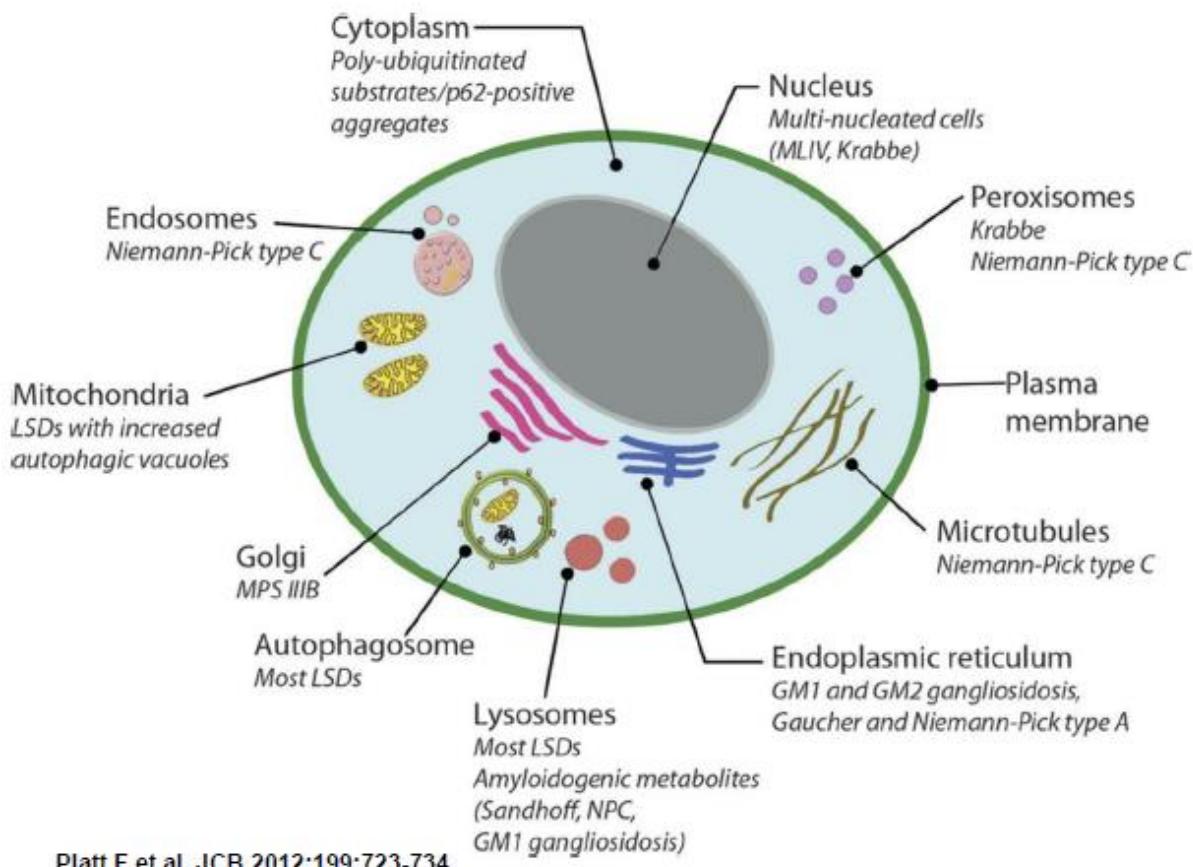
- Alteraciones en el transporte celular.
 - Acumulaciones a nivel de fosfolípidos de membrana, proteínas de membranas...
- Alteraciones en los procesos degradativos.
 - Autofagia, endocitosis, fagocitosis, exocitosis lisosomal...
- Homeostasis del calcio.
- Estrés oxidativo
- Inflamación y respuesta inmune. En el hígado de pacientes con enfermedad de Gaucher, se produce una fibrosis.
- Muerte celular apoptosis.
- Otros mecanismos son inflamación crónica y neuroinflamación.

Los lisosomas están interaccionando con prácticamente todos los orgánulos subcelulares. En esas regiones de contacto, cualquier alteración a nivel de la composición lipídica o proteínica, pueden producir patologías que afecten a estos orgánulos con los que están en contacto.



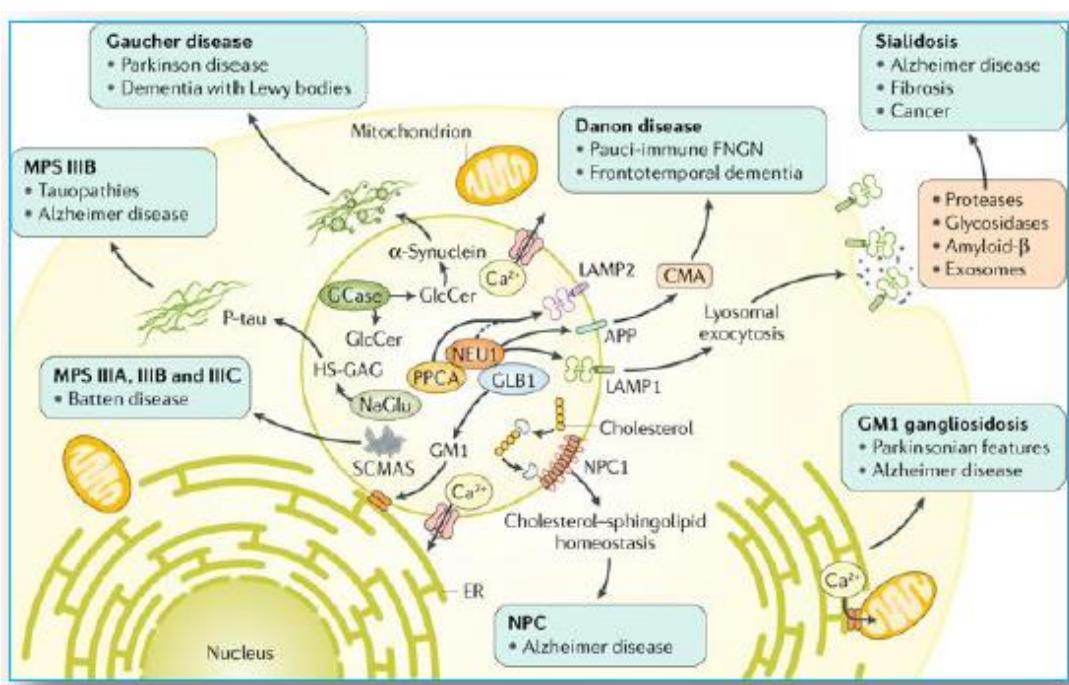
En la homeostasis del calcio, hay que tener en cuenta por ejemplo las interacciones RE-lisosoma, que produce cascadas de señalización no deseadas, por ejemplo.

En otros casos, se ha visto que los lisosomas son capaces de desplazarse. Una afectación por acúmulo produce afectaciones a nivel neurológico, afectando a la movilidad por los axones.



Por otro lado, también se puede dar una acumulación de sustratos secundarios.

- La acumulación de **colesterol** en los lisosomas suele ser una marca de identidad de muchas LSD. El transporte mediado por NPC tiene **características observables en Alzheimer**.
- En patologías como enfermedad de **Gaucher** o **mucopolisacaridosis** se han observado un aumento de **metabolitos amiloidogénicos**, cuyo mecanismo exacto de agregación se desconoce.

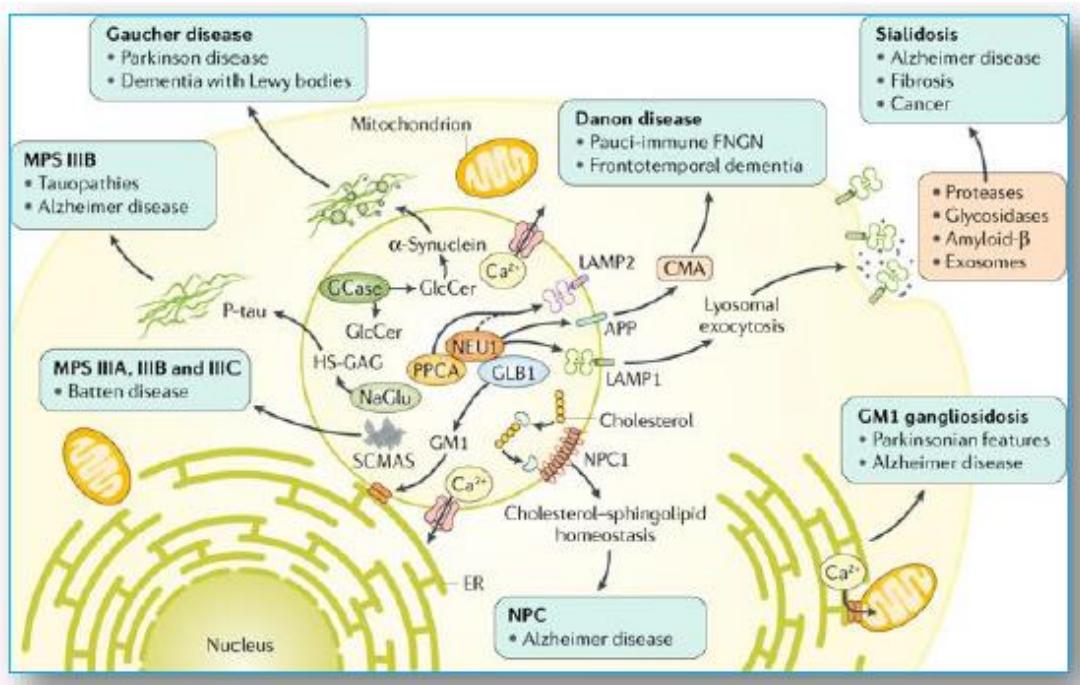


Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades lisosomales – 4-3-2019

Acumulación de sustratos secundarios

La acumulación de colesterol en los lisosomas suele ser una marca de identidad de muchas LSD aunque el defecto primario no afecte a su exportación. NPC tiene características observables en alzheimer. En patologías como Gaucher o MPS se ha observado acumulación de metabolitos amiloidogénicos cuyo mecanismos exacto de agregación se desconoce.



Es importante resaltar que como metabolito secundario está el colesterol.

Reducciones de procesos degradativos: autofagia

En las enfermedades de almacenamiento lisosomal, **hay una reducción en el flujo autofágico**. Esto, tiene un gran impacto sobre la **función mitocondrial**, provocando la persistencia de mitocondrias disfuncionales (muy pronunciada en enfermedades como la enfermedad de Batten). En pacientes con **gangliosidosis GM1, mucolipidosis IV y enfermedad de células I** también se observan pérdidas de potencial de membrana mitocondrial.

Se sabe que algunas moléculas que se almacenan en las LSDs pueden escapar del sistema y **quizar afectar a la función de otros orgánulos**.

Alteración de los procesos de autofagia en el sistema nervioso

Las alteraciones en los procesos de autofagia son **especialmente relevantes para explicar la clínica neurodegenerativa**. Las neuronas no se replican y tienen un metabolismo oxidativo muy activo, presentan una red lisosomal desarrollada para facilitar el reciclaje de sus membranas.

Los lisosomas son traficados por los axones gracias a la acción de motores moleculares filamentosos. En muchas LSDs se ven neuronas con formaciones vacuolares en el axón, con la maquinaria lisosomal muy distendida. Esto provoca un efecto a nivel de morfología de la neurona, que tendrá un efecto a nivel del potencial de transferencia.

Estas formaciones vacuolares acumuladas provienen del aumento de cargo (orgánulos subcelulares, glucógeno y fragmentos de membrana), que constituyen una **evidencia directa de la alteración del proceso de autofagia**.

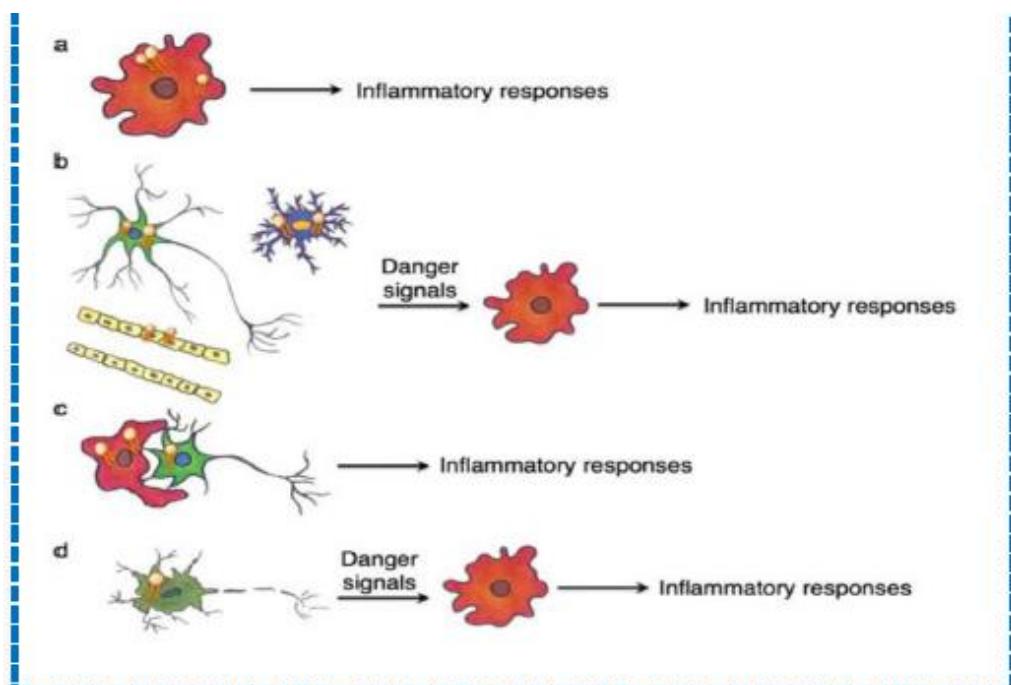
Activación de la respuesta inmune

Entre los mecanismos generales de patogenia se encuentra una **inflamación crónica y una neuroinflamación, posiblemente ligada a respuesta autoinmune**. Varios estudios indican que células implicadas en la respuesta inmune como **microglía en el cerebro, macrófagos en la periferia**. Contribuyen de forma activa a la progresión de la patología.

Sabemos que en el sistema nervioso hay una activación de la microglía. La razón no está clara. Esto, ejemplifica las distintas opciones de respuesta inflamatoria ante la acumulación de esfingolípidos, por ejemplo:

- La microglía puede estar activada por sé, produciendo una respuesta inflamatoria
- La microglía puede estar detectando una señal de peligro de las neuronas por acúmulo de los esfingolípidos
- La microglía puede estar detectando células apoptóticas y por ello da lugar a una respuesta inflamatoria...

Hay múltiples situaciones en cada patología.

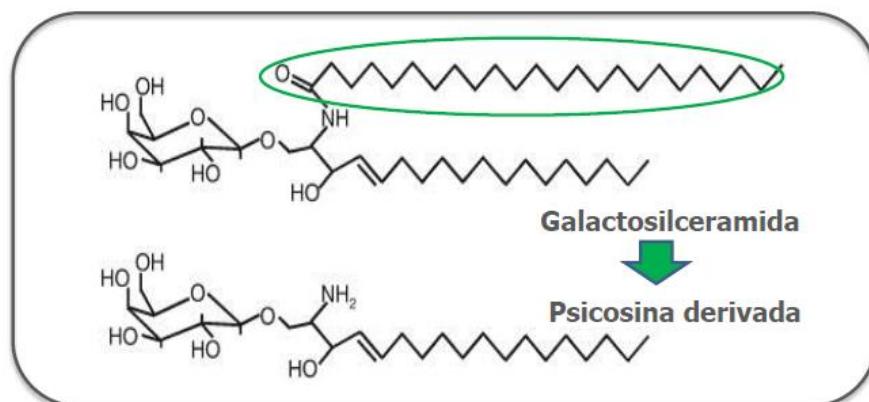


Otros aspectos relacionados con la patogenia de las enfermedades lisosomales

Se produce un **cambio en la función de receptores, glucolípidos implicados en procesos de señalización, etc.** Esto es especialmente aplicable a glucoesfingolípidos.

Por otro lado, se puede producir la formación de lípidos bioactivos con efectos sobre la función celular (**psicosinas**).

La psicosina es un lisolípido que se acumula en muchas LSDs de almacenamiento de esfingolípidos. Derivan de **cerebrósidos o gangliósidos**. Con respecto a los lípidos, han perdido el grupo acilo. Va a tener la capacidad de **modificar y activar cascadas de señalización entre otras cosas**.



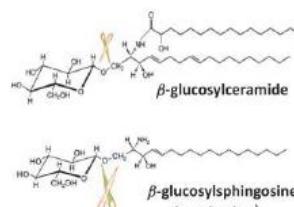
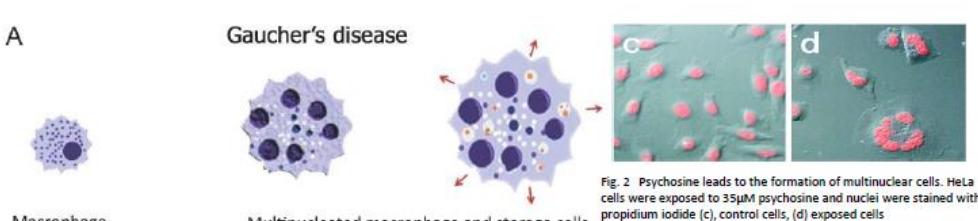
Se detectaron primero en células de pacientes de enfermedad de Gaucher y Krabbe. En el caso de Gaucher, se ve cómo analizando los macrófagos de Gaucher tienen un incremento grande de tamaño por un derivado bioactivo. Muchos de esos macrófagos eran multinucleados.

Analizando las células de Krabbe, lo que falla es la β -galactosidasa. En Gaucher es lo mismo pero con una glucosa. En Krabbe hay **implicaciones neurológicas** y en Gaucher hay **hepatoesplenomegalia**.

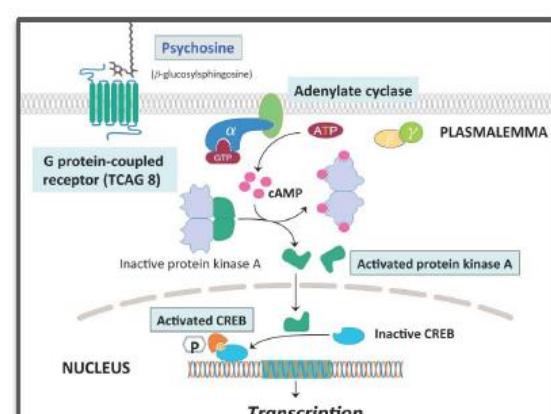
Lo que se encuentra son **células globoides en las que no hay galactosil ceramida, sino la psicosina**. Desde un punto de vista funcional, es más tóxica que la acumulación de la molécula primaria.

Analizando qué es lo que podían hacer, se pusieron células en cultivo con psicosinas y aparecieron células multinucleadas.

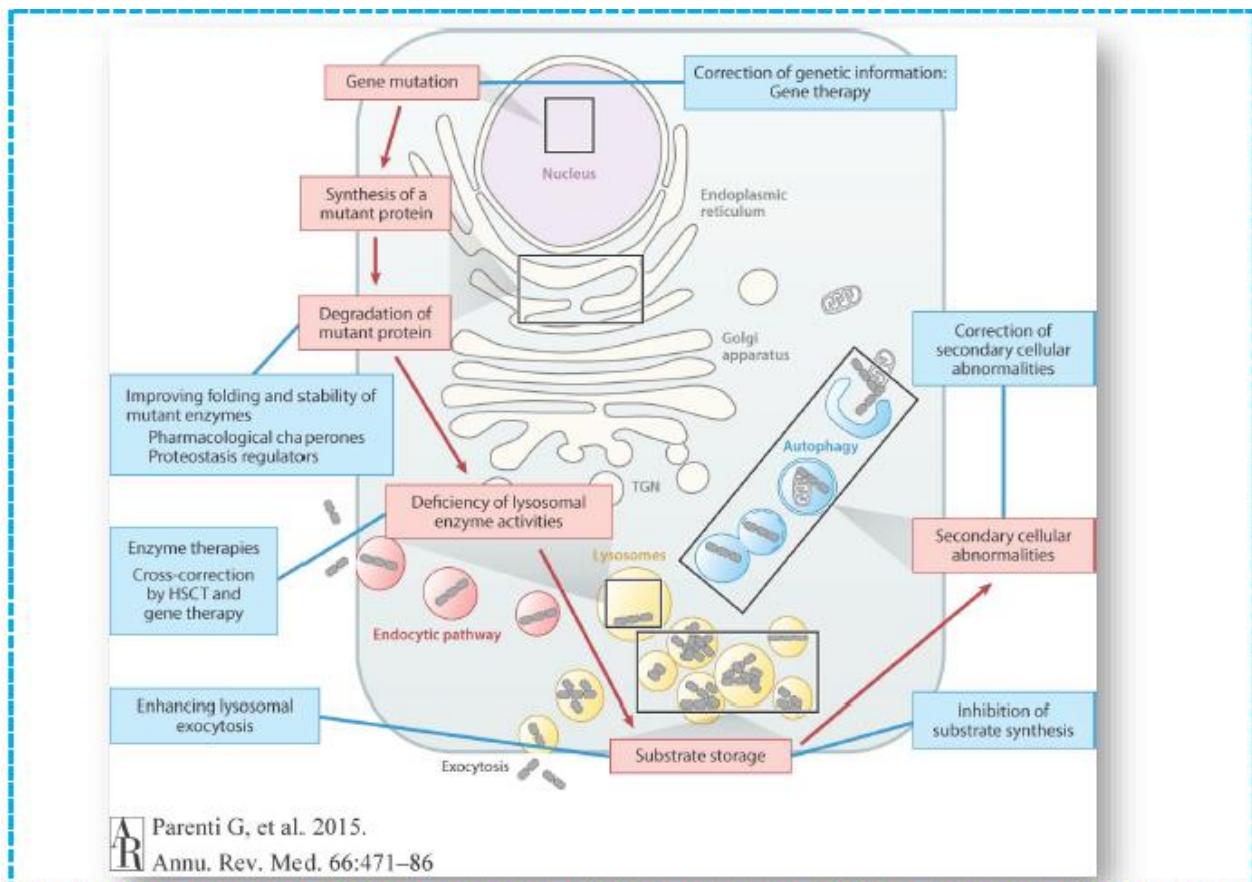
Analizando más en profundidad su papel es que pueden funcionar como agonistas de GPCRs acoplados a G_as.



Journal of Pathology
e 226, Issue 2, pages 241-254, 1 DEC 2011 DOI: 10.1002/path.3021
onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.3021/full#fig3



Cascada de patogenia en enfermedades lisosomales y aproximaciones terapéuticas



- Si el defecto es una **mutación génica**, se puede recurrir a la **terapia génica**. Esta aproximación se está llevando a cabo en el tratamiento de la enfermedad de Batten.
- Si el defecto está a nivel de un **exceso de degradación de la proteína mutante**, las terapias **estarían implicadas en aumentar la eficiencia de plegamiento correcto o en modular la proteostasis**.
- Si la diana es a nivel de la deficiencia lisosomal, la **terapias que engañan a los sistemas de corrección de proteínas o la terapia de reemplazo enzimático**. Se ha ensayado más, en algunos casos no funciona. En otros casos, **cross-correction en Enfermedad de Hurler**. Se hacen **transplantes de médula ósea**. Otras aproximaciones son la **modificación genética en las células de la médula**.
- **Aumentar la exocitosis lisosomal**.
- **Inhibición de la síntesis del sustrato**.
- **Correcciones secundarias a las anormalidades celulares**.

El problema en todas estas enfermedades es que no pretendemos conseguir un 100% de actividad. Lo que pretendemos es conseguir una mejora, **pues con un poco de actividad, la vida del paciente mejorará significativamente**. Por ejemplo, **dentro de los pacientes de Gaucher hay una forma menos grave con hepatosplenomegalia**, pero un porcentaje reducido tiene la forma neurológica.

La mutación de los primeros tienen una actividad residual alta, concentrándose más en las células reticuloendoteliales, pero no en las neuronas.

Terapia de incremento de actividad residual

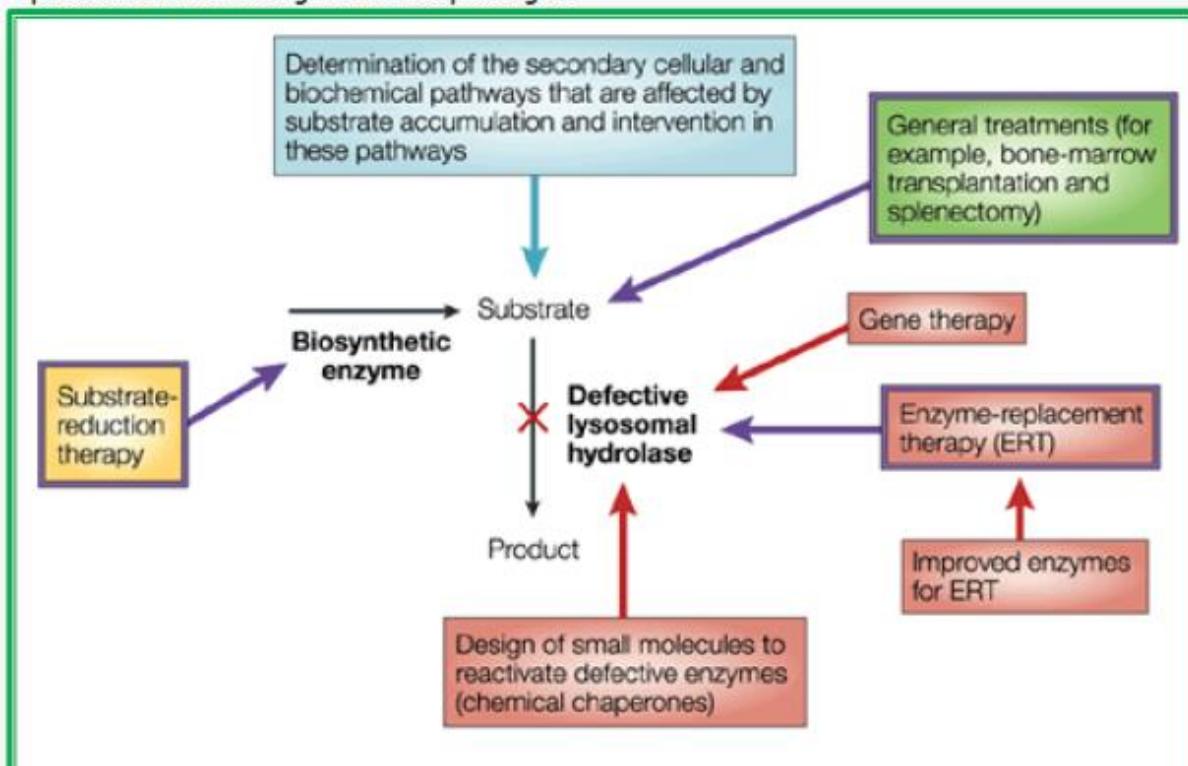
Se puede:

- Suministrar la enzima normal a través de la ruta endocítica por administración intravenosa o como proteína recombinante.
- Suministrar la enzima en forma de precursor secretado al sistema por células previamente manipuladas o no, procedentes del propio paciente o de un transplante.

Restablecimiento del equilibrio entre síntesis y degradación lisosomal.

- Reducción de la síntesis del sustrato cuya degradación es deficiente.
- Aumentar los mecanismos de secreción del metabolito acumulado
- Manipular rutas celulares específicas (mediante enhancing de los factores TFEB, por ejemplo)

Recuadrados en malva las que se usan actualmente en la práctica clínica de alguna de las patologías



In the following article:
of lysosomal storage disorders

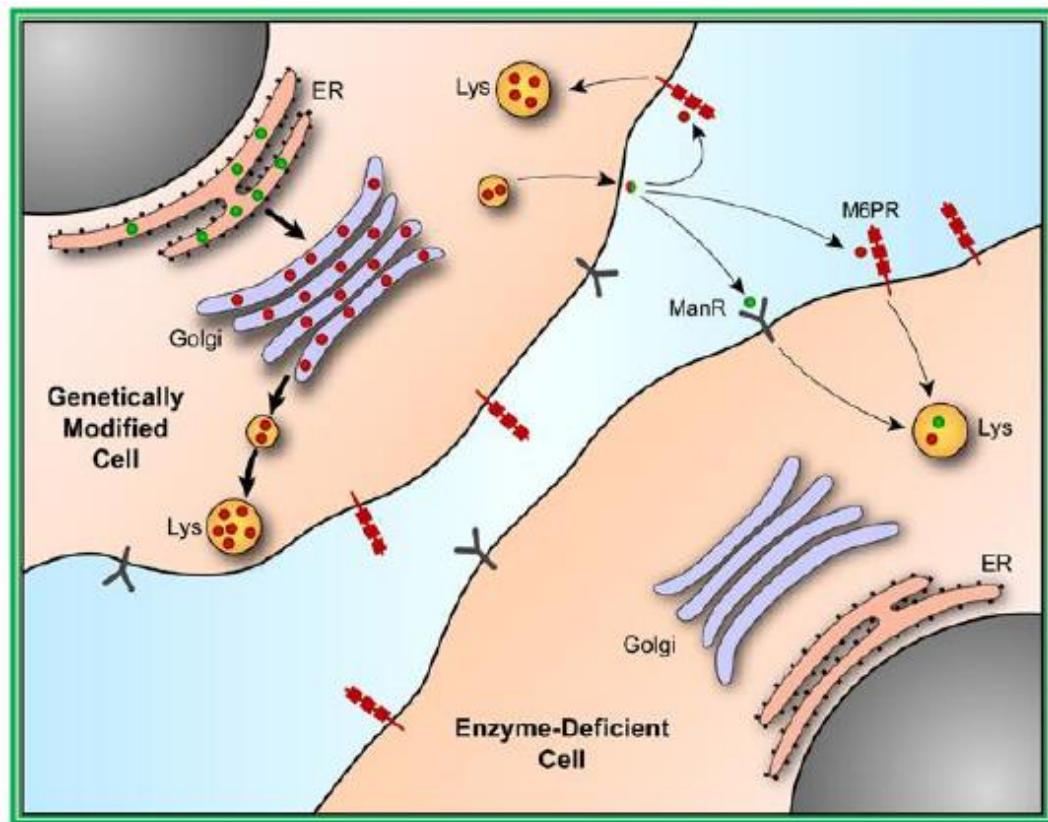
by H. Futterman & Gerrit van Meer

Nature Reviews | Molecular Cell Biology
Reviews Molecular Cell Biology 5: 554-565 (July 2004)

Terapia de corrección metabólica cruzada

Se aprovecha la **utilización de la ruta secretora por la que se transportan hasta el lisosoma un pequeño porcentaje de enzimas lisosomales para asegurar la llegada de enzimas a células deficientes.**

Se basa en que no todas las hidrolasas que llegan hasta el lisosoma utilizan la vía directa, **sino que un cierto porcentaje se escapan por la vía secretora. Estas pocas que se escapan**, pudiendo ser capaces de llegar al entorno de la célula deficiente y ser recaptadas por la misma. Sólo nos estamos aprovechando del “leakage enzimático”.



En casi todos los pacientes con la enfermedad de Hurler se reduce la visceromegalia y algunos también tienen un efecto sobre neurodegeneración (microglía, primeras etapas de la vida).

En todas las células el receptor más extendido en la membrana es el receptor de manosa 6P. En el caso de las células reticuloendoteliales hay también receptores de manosa. En la terapia de reemplazo, **habrá que ponerle una etiqueta de manosa**.

Lo que se ha intentado hacer es modificar las células de la médula ósea para que expresen una cantidad mayor de proteína, que lo que se escape será más y por consiguiente podremos incrementar más la proporción de células con actividad enzimática normal.

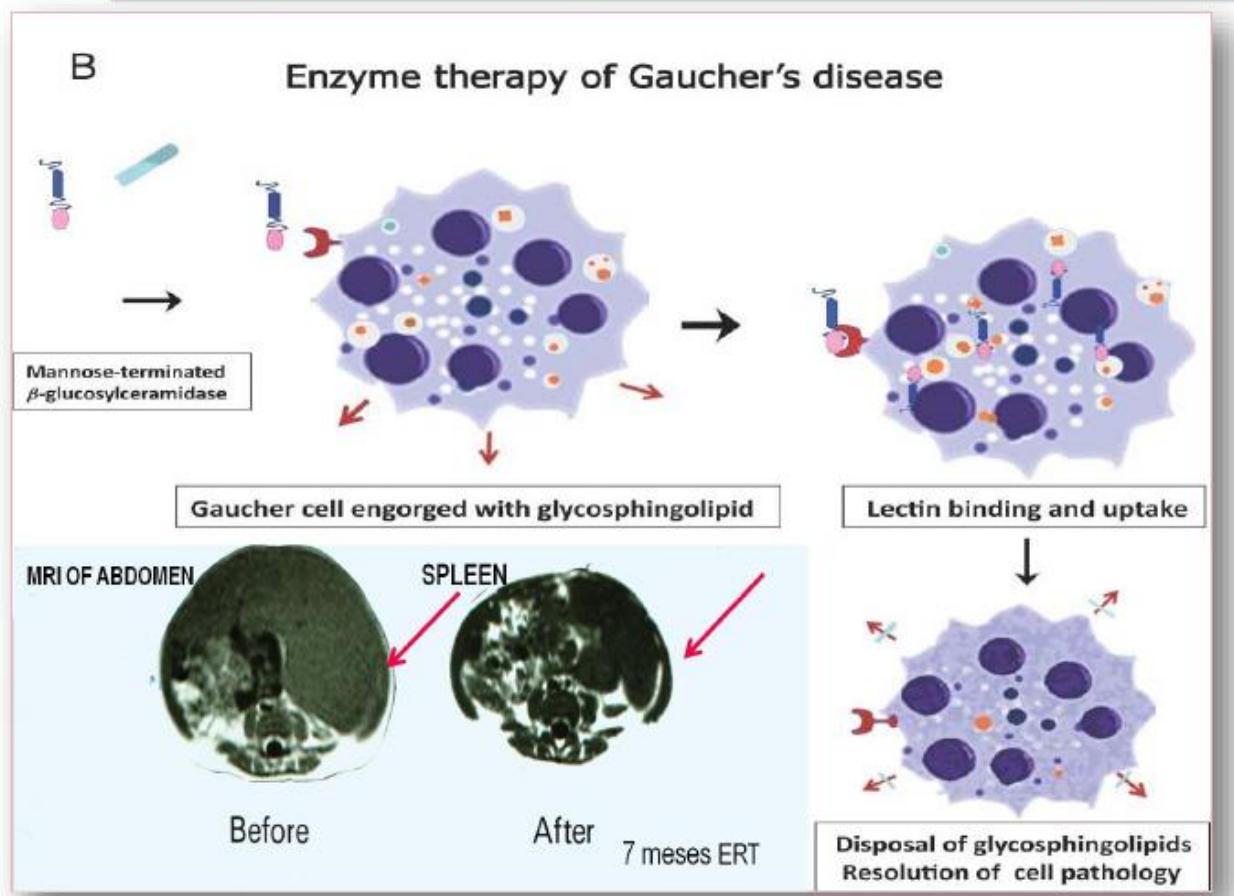
Terapia de reemplazo enzimático

Administración intravenosa de la proteína a la que se le ha incluido una etiqueta sacáridica que interesa más para el tejido diana.

- **Gaucher → Etiqueta de manosa para llegar a las células reticuloendoteliales**

Esta estrategia se está intentando añadir secuencias de tipo receptor de insulina o transferrina para que pasen la barrera hematoencefálica.

Terapia de reemplazo enzimático (ERT)



El reemplazo enzimático funciona según la enfermedad y dónde se dirija. Además, es importante también porque los macrófagos de Gaucher mandan una serie de productos de secreción que permiten evaluar el tratamiento: citoquinas y quemoquinas que hablan del daño inflamatorio y otras enzimas lisosomales.

Estas enzimas lisosomales pueden tener efectos secundarios sobre los tejidos a los que llegan. El tratamiento se puede ver por la reducción del bazo.

Para los Gaucher tipo II no funciona por daño neurológico. La patología es neurológica y la enzima no llega en las condiciones necesarias. Los pacientes de tipo II se están ensayando otro tipo de terapias.

En el resto, funciona más o menos bien, dependiendo de cuánto queda en el hígado antes de llegar. Además tiene un gran coste.

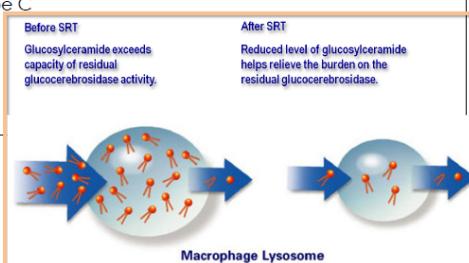
Terapia de reducción de sustrato o SRT

La terapia de reducción de sustratos utiliza drogas que inhiben parcialmente la biosíntesis del sustrato a degradar.

Si tengo algo que falla y como no funciona bien la degradación se acumula, **lo suyo sería disminuir la síntesis.** Ha llegado a la clínica en algunas de las patologías. Son inhibidores parciales.

Todas las enzimas deficientes de este proceso se ven beneficiadas, pudiendo tarjetear muchos puntos.

- La terapia de reducción de sustratos utiliza drogas que inhiben parcialmente la biosíntesis de glucoesfingolípidos, usando como diana la glucosilceramida sintasa, enzima que cataliza el primer paso en la biosíntesis de GSL. La SRT se introdujo por primera vez en 2002 para pacientes Gaucher Type I que no mejoran con ERT
- Actualmente en fase preclínica para otras LSDs como
 - GM2-gangliosidosis
 - Niemann-Pick type C
 - Fabry



Terapia de reducción de sustrato (SRT)

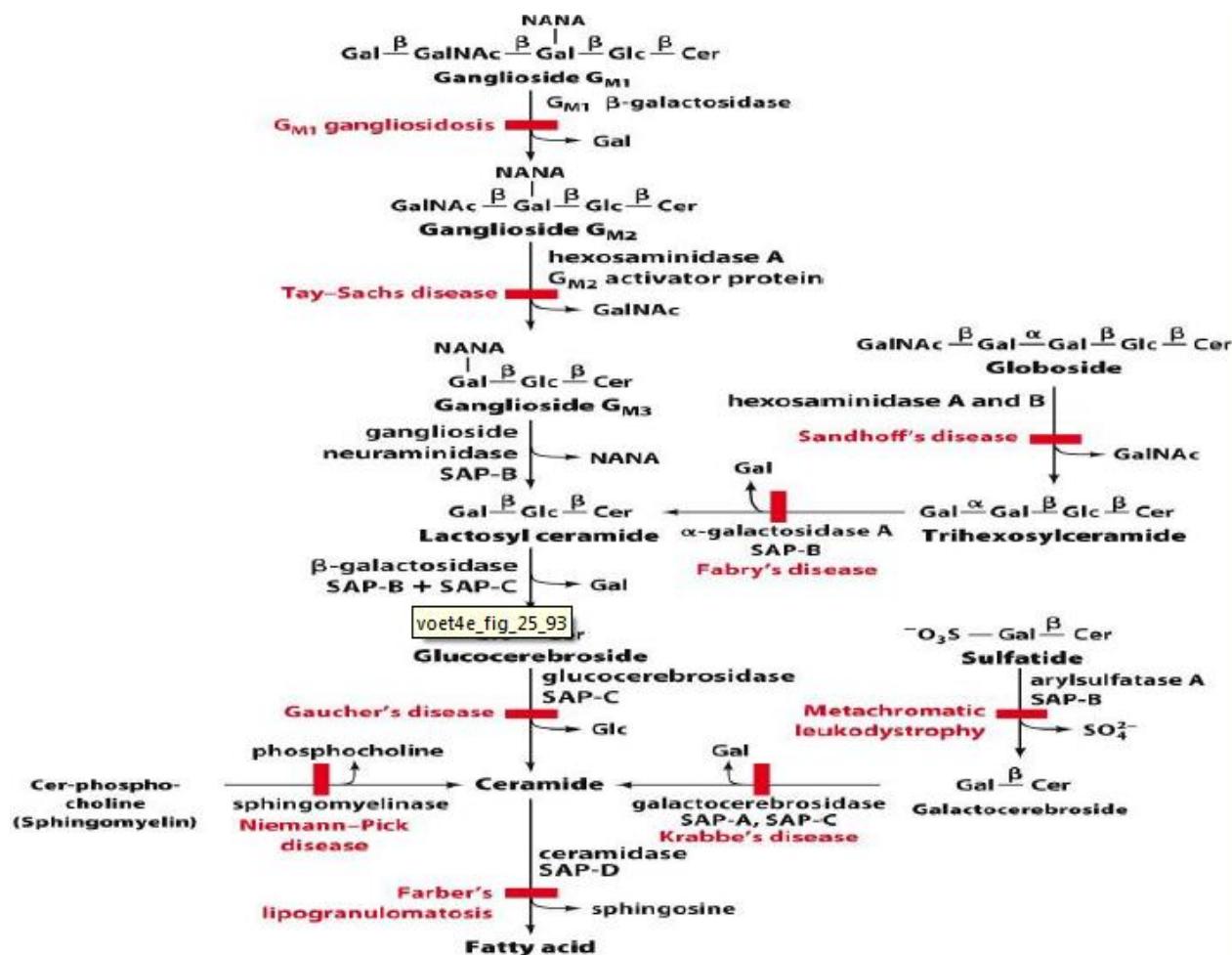
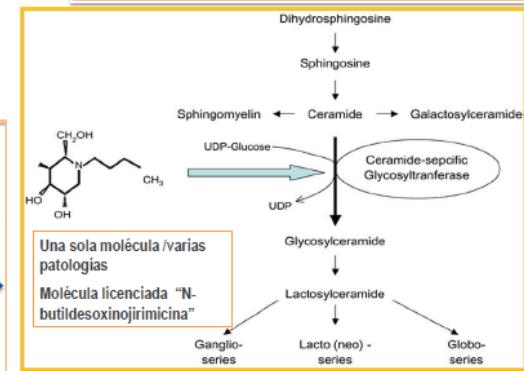


Figure 25-93

© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Chaperonas farmacológicas

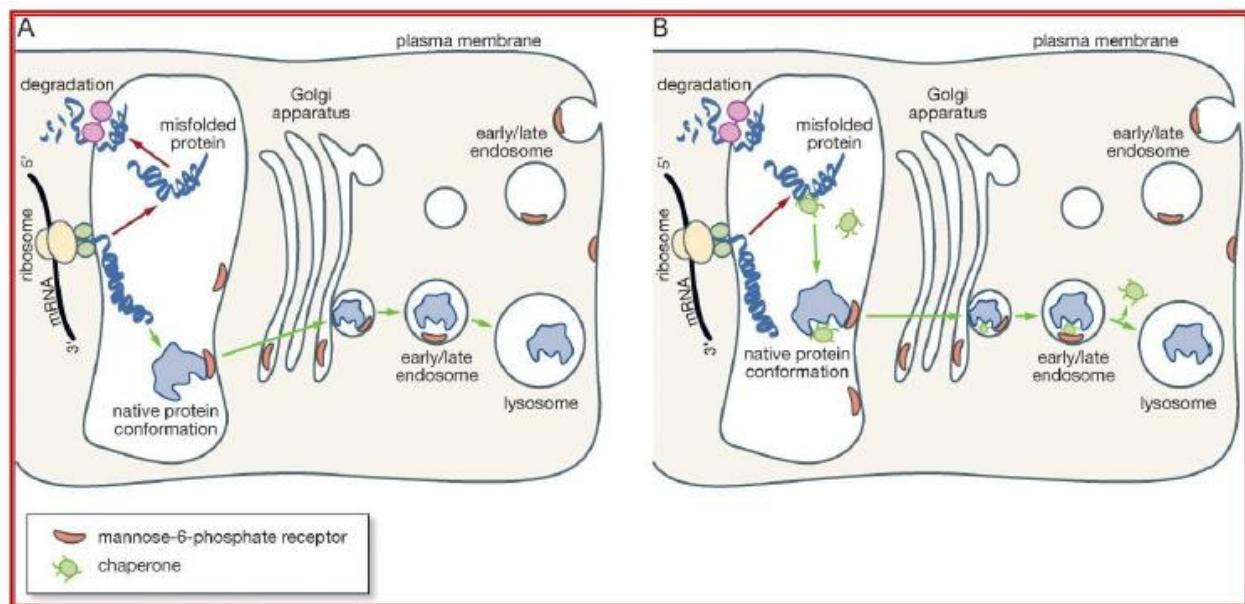
Se están ensayando distintos tipos. El fundamento del trabajo con chaperonas es ayudar a una **proteína que tiene una mutación de plegamiento a que se pliegue mejor**. Una de las mutaciones **más frecuentes en Gaucher provoca un plegamiento incorrecto en la proteína**.

Los sistemas de control de calidad suelen degradarlas, **no llegando a salir del retículo**. Si conseguimos que la proteína se pliegue razonablemente, se puede **conseguir que se trafique hasta el endosoma temprano/tardío y tenga algo de función**.

Estas mutaciones liberan actividades residuales útiles. La estrategia de una chaperona, hasta ahora, ha sido que sean **inhibidores del centro activo de la enzima, facilitando que toda la proteína se pliegue adecuadamente**.

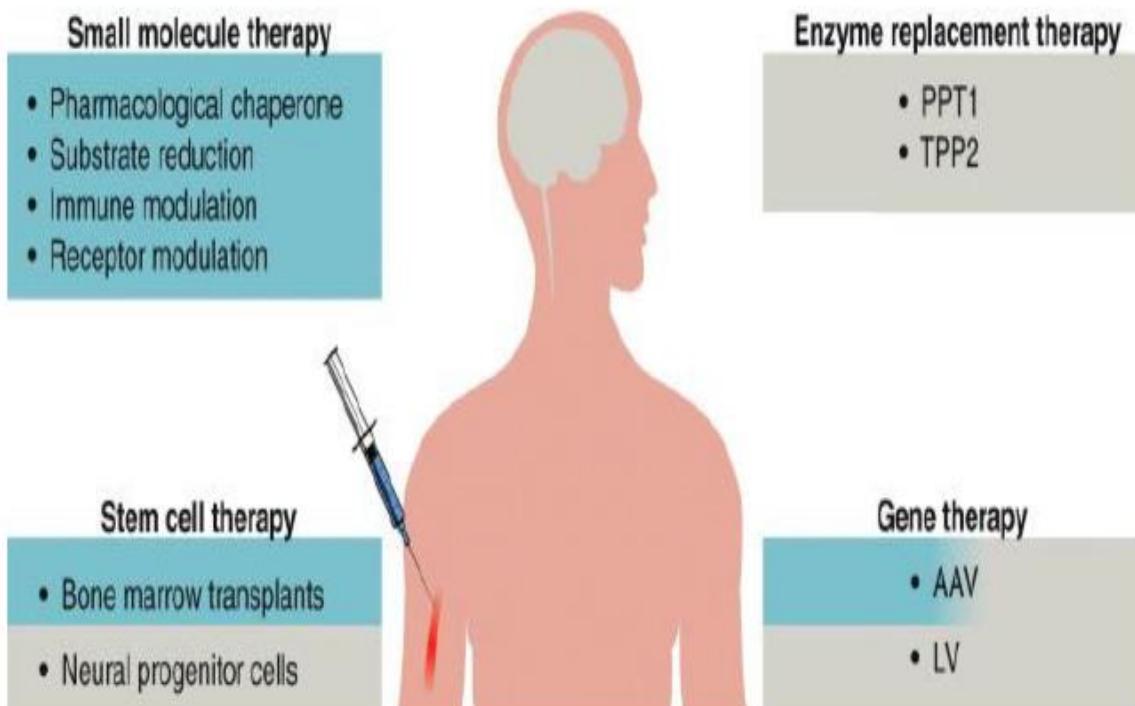
Esto hace que escape de los sistemas de control de calidad y sea traficada hacia el lisosoma. Esto tiene varios problemas, pues hay que medir la concentración y unión de la chaperona (que dependa de pH y que funcione por debajo de la concentración del sustrato natural, para que no lo inhiba competitivamente).

Se está trabajando en chaperonas **que se unan a sitios alostéricos**, con lo cual no tendríamos la posibilidad de inhibición.



Experimentales en enfermedad de Batten

TERAPIAS EXPERIMENTALES PARA EL TRATAMIENTO DE LAS LIPOFUSCINOSIS CEROIDES (ENFERMEDAD DE BATTEN)



Esquema de la enfermedad de Gaucher

ENFERMEDAD DE GAUCHER

- ✓ **Se produce como resultado de la deficiencia en la enzima β -glucocerebrosidasa (β -Glc)** (gen GBA). Es una de las escasas hidrolasas que no utiliza la etiqueta de maltosa 6P para ser reconocida por receptor M6PR en el trans-Golgi y viajar hasta el sistema endosoma-lisosoma. β -Glc se une en el trans Golgi (TGN) a la proteína de membrana lisosomal LIMP2
- ✓ Su defecto provoca la acumulación de glucosilceramida y del lisolípido "glucosilesfigosina" en macrófagos, que adquieren una apariencia de "papel arrugado" (macrófagos de Gaucher).
- ✓ Se han descrito tres fenotipos diferentes:
- ✓ Gaucher tipo I –forma menos grave de la patología, asociada a mutación p.N370S que proporciona actividad residual suficiente para evitar el almacenamiento y la neurodegeneración. Afecta sobre todo a los macrófagos del sistema retículo-endotelial que por su papel de fagocitos de células sanguíneas degeneradas almacenan grandes cantidades de glucosilceramida. Los pacientes responden a terapia de reemplazo
- ✓ Gaucher tipo II neurinopático (mutación p.L444P) más grave, los niños progresan rápidamente a discapacidad y muerte a los 2 años. En general no responden a terapia de reemplazo
- ✓ Gaucher tipo III presentación más insidiosa, algunos pacientes responden a terapia de reemplazo o de reducción de sustrato.
- ✓ Entre los procesos responsables de la inflamación crónica y de las alteraciones hematológicas detectadas en los pacientes se han identificado alteraciones en procesos de macro-autofagia probablemente reflejo de la acumulación del glucoesfingolípido.
- ✓ También en los Gaucher tipo II y III, se ha detectado activación de microglia y neuro-inflamación asociada a disfunción y pérdida neuronal en cerebro y médula espinal

Bases Moleculares de la Patología

Hipercolesterolemia familiar – 5-4-2019

La patología es muy **compleja**, teniendo **distintas etiologías**. Algunos de los síntomas característicos son los **xantomas**, el **arco corneal**. Se caracteriza por síntomas como:

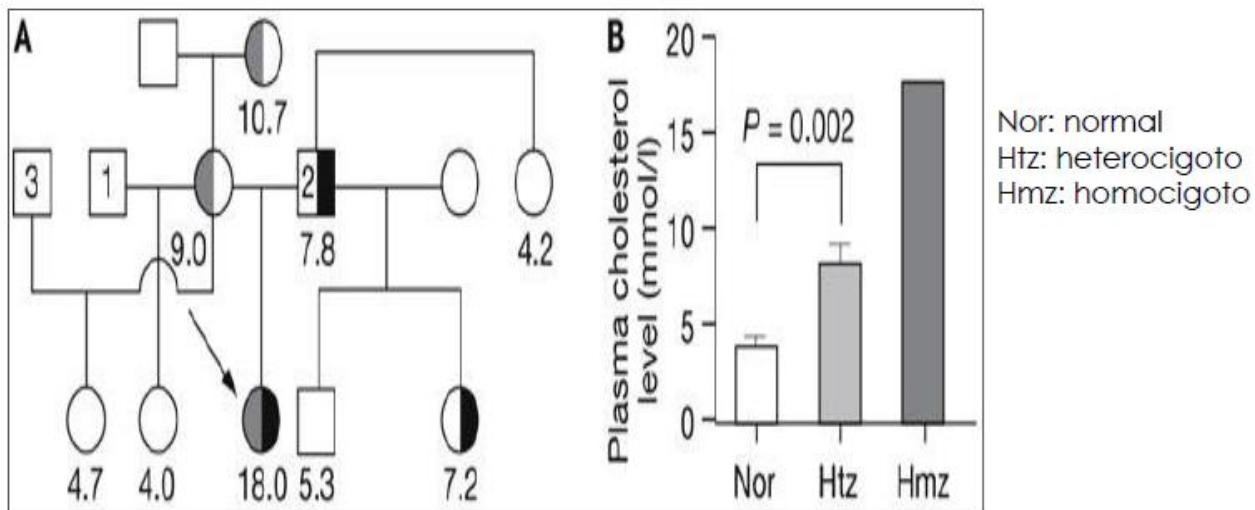
- Altos niveles de **colesterol total y LDL-C**
- Historias **familiares del ataque del corazón**
- **Resistencia** a la terapia con **estatinas**
- Depósitos de colesterol en piel y tendones, **conocidos como xantomas**.
- **Arco corneal** por depósitos
- **Síntomas varios de enfermedades cardíacas**
- Los pacientes **homocigotos tienen síntomas a edad temprana** y mueren antes de los 30 años.

Historia

El perfil de **herencia de la FH** fue primero **descrito en tres grandes grupos** atendiendo a su **concentración plasmática de colesterol**.

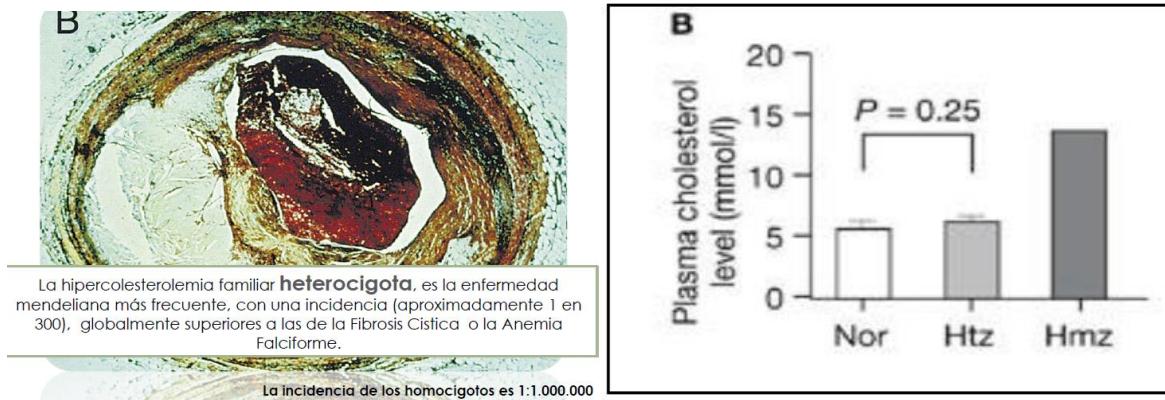
- Individuos **con niveles normales**
- Valores **x2 elevados**. Correspondiente a individuos heterocigotos.
- Valores hasta **4 veces elevados**. Correspondientes a individuos homocigotos.

Herencia **autosómica dominante** pero con **efecto dependiente de dosis génica**, responsable de fenotipos suaves (heterocigotos) y graves (homocigotos).



Es la enfermedad **heterocigota mendeliana** más frecuente, con una incidencia de **aproximadamente 1 en 300**. Son globalmente superiores a las de la fibrosis cística o la anemia falciforme.

La incidencia de homocigotos es de 1:1.000.000



Otro grupo reducido de pacientes tenían perfiles de homocigosis recesiva. En este caso, se hablaba de un patrón de herencia autosómico recesiva. Por lo tanto, debería ser una enfermedad multigénica, pues tenemos dos tipos de herencia diferente (ARH).

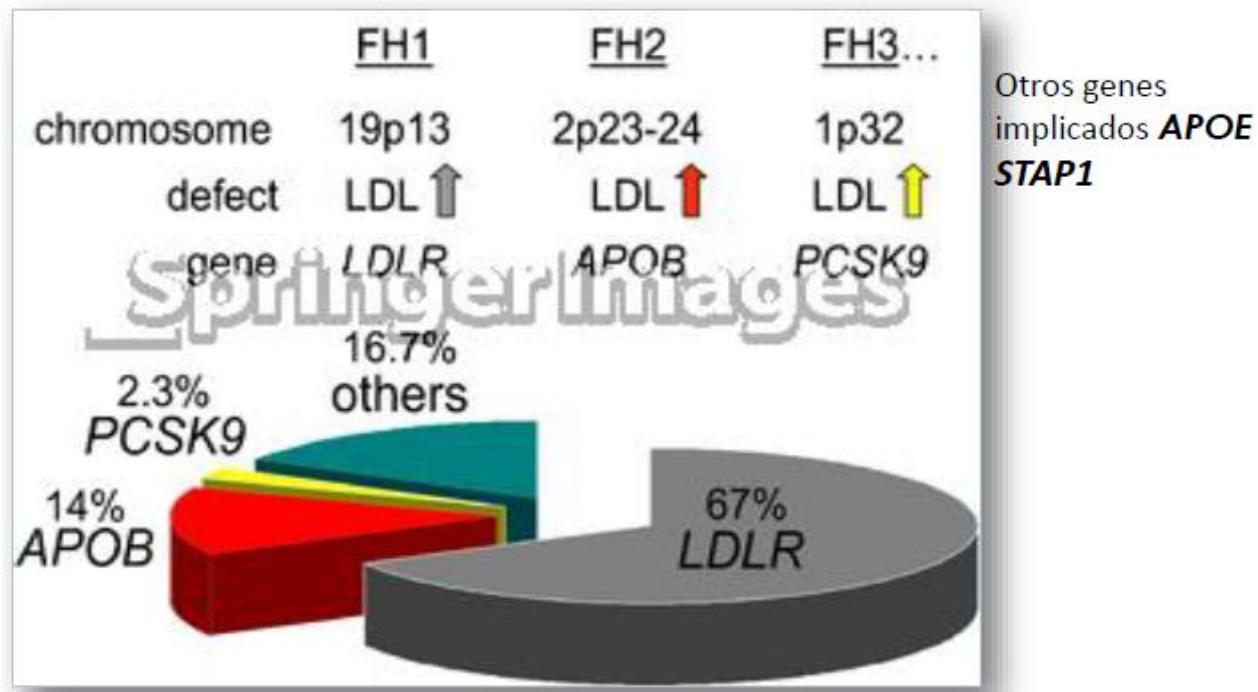
Hipercolesterolemia familiar

La enfermedad es genética, pudiendo ser monogénica o poligénica.

- La causa monogénica tiene defectos en los genes de LDLR, APOB y PCSK9, responsables de la forma dominante.
- La LDLRAP1 produce la forma recesiva de la enfermedad.

Las mutaciones en estos genes dan cuenta del mayor porcentaje de pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Sin embargo, hay muchos pacientes sin diagnóstico. Se identifican más de 50 loci en las que la combinación de variantes comunes pueden dar lugar a una hipercolesterolemia familiar, llegando a hablar de una causa poligénica. Hay un porcentaje de pacientes en la que la causa es poligénica.



Incluso cuando las mutaciones están en **los genes causantes de la monogénesis**, se pueden tener **fenotipos muy variable (suaves, severos, paradójicos)**. Sobre las causas monogénicas pueden estar influyendo una **serie de marcadores polimórficos que den cuenta de este fenotipo modificado**.

Table 1 Distinction in the Clinical Versus Genetic Nomenclature of Familial Hypercholesterolemia

Genetically (Genotype)	
Homozygous	Homozygous for a mutation in one of the candidate genes ^a known to cause FH
Combined Heterozygous	Heterozygous for two different mutations in the same or different candidate genes known to cause FH
Heterozygous	Heterozygous for a mutation in one of the candidate genes known to cause FH
Unknown	No causative mutation could be detected after screening all candidate genes known to cause FH
Clinically (Phenotype)	
Severe	LDL-C levels that are three to four times the normal and external ^b or cardiovascular ^c manifestations of FH
Mild	Elevated LDL-C levels that do not exceed three times the normal
Pardoxical	LDL-C levels that are three to four times the normal and with no external or cardiovascular manifestations of FH OR Normal to slightly elevated LDL-C levels with external or cardiovascular manifestations of FH

^a Candidate genes include *LDLR*, *ApoB*, *PCSK9*, and *ARH/LDLRAP1*.

^b External manifestations means one or more of tendinous xanthomas, xanthelasmas, or corneal arcus.

^c Cardiovascular manifestations means the presence of premature cardiovascular disease as judged clinically.

Dentro de una misma familia nos podemos encontrar con distintas expresiones fenotípicas, **pudiendo producir un cambio**.

Mayoritariamente, los pacientes tienen mutaciones en el LDL-R. Otro porcentaje más pequeño tiene **formas de APOB y PCSK9**. Algunos otros genes se han visto implicados en la **forma autosómica dominante, como APOE**.

Genotipos y fenotipos

En cuanto al genotipo

- **Homocigotos**
- **Heterocigotos**
- **Heterocigotos compuestos.** Mutaciones en uno de los genes y otra mutación en otro de los genes puede provocar patología.
- **NPI.**
- **Causas poligénicas.**

Fenotipo:

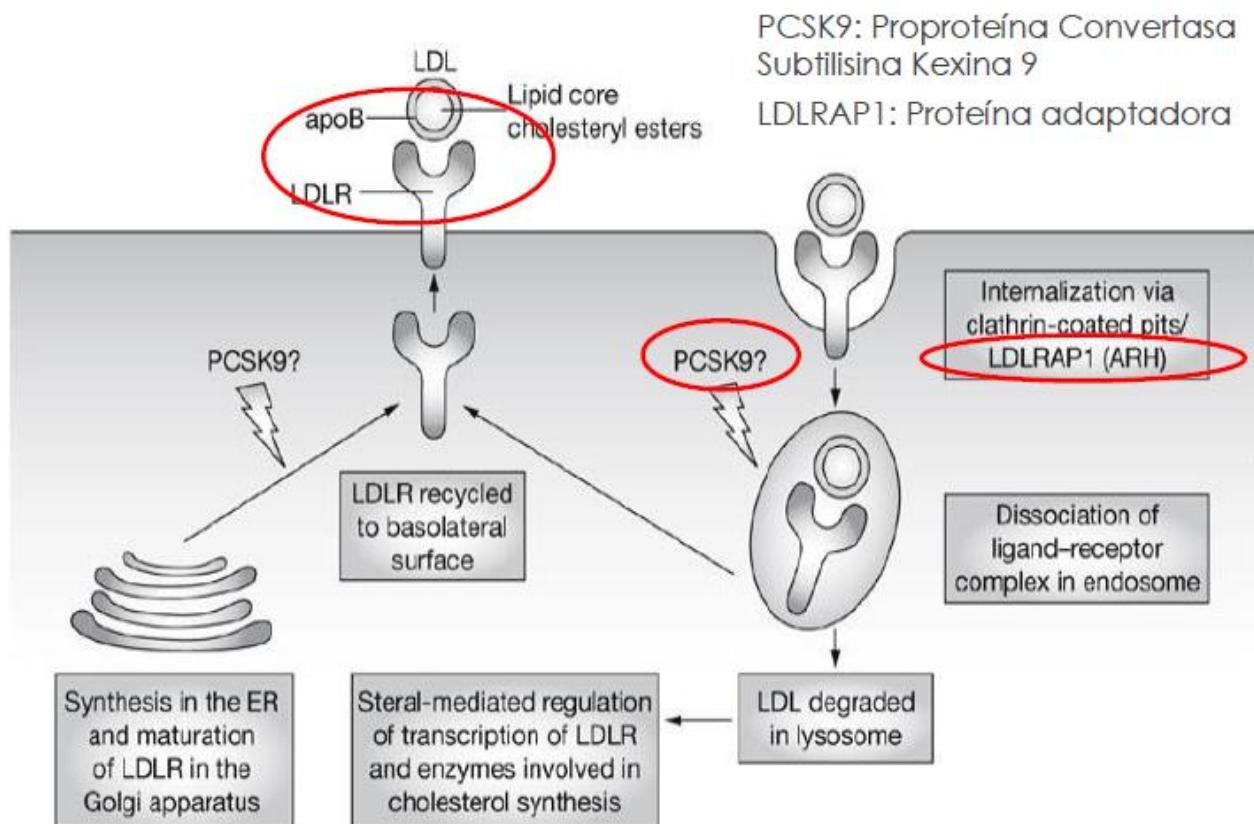
- **Severa.**
- **Suave.** Pacientes de LDL-C no suele exceder las tres veces.
- **Paradójicas.** LDL-C altos sin patología cardiológica y otros que tienen LDL-C bajos pero patología cardiológica.

Implicación de las proteínas LDLR, ApoB100, PCSK9 y LDLRAP1

Todas estas proteínas tienen un **papel en el proceso de síntesis, tráfico, etc. del colesterol**.

Normalmente, el receptor está anclado en la membrana plasmática. Reconocería a **apo B100**, se haría una vesícula recubierta de clatrina con una proteína adaptadora. En esta vesícula se movería hacia el **sistema endosoma-lisosoma, llegando al endosoma temprano**.

El cambio del temprano al tardío favorecería el **soltar el receptor a la membrana y la LDL va al lisosoma donde sería degradada**.

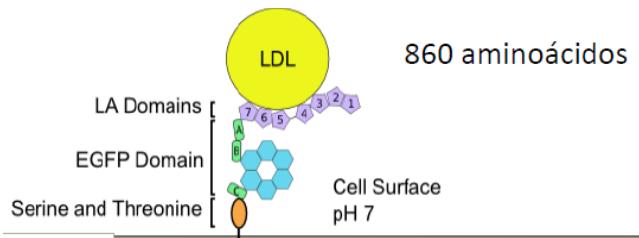


La mayor parte de los pacientes tienen mutaciones en el **receptor o la funcionalidad de la proteína receptora**. Hay otras mutaciones que afectan a la **unión al receptor (ApoB)** o (**PCSK9: Proproteína convertasa subtilisina kexina 9**, que se secreta al torrente circulatorio y tiene como funcionalidad mandar al receptor a degradar).

La **LDLRAP1** es la única cuyos defectos provocan patología autosómica recesiva, que tiene que ver con la vesiculación.

LDLR

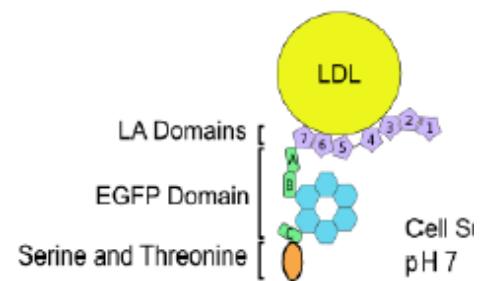
El receptor que reconoce las LDL es una **glicoproteína que está codificado por el gen LDLR que se sintetiza como proteína inmadura en el RE, que viaja al Golgi, se glicosila con un perfil de glicosilación amplio y posteriormente se va a transportar hasta la membrana plasmática de hepatocito**.



Tiene distintos dominios dentro de su funcionamiento.

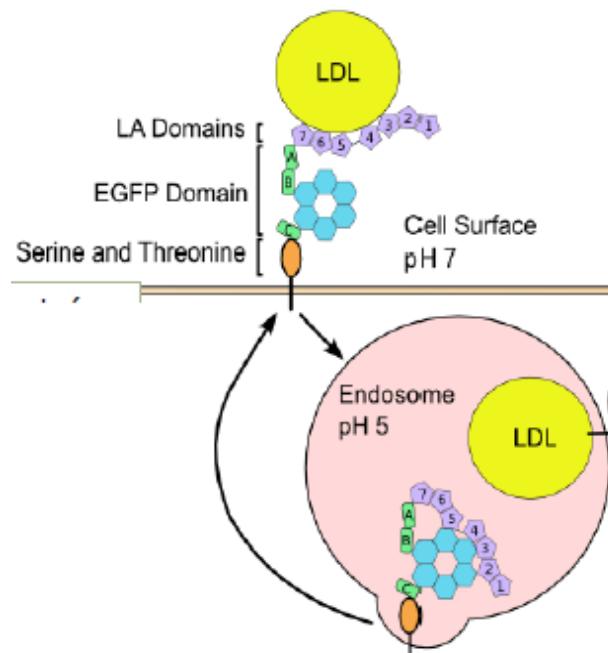
Tiene:

- Zona de **reconocimiento de LDL**
- Dominios de homología con el EGF, para que se una la PCSK9
- **Región de estructura β importante para el reciclaje del receptor**

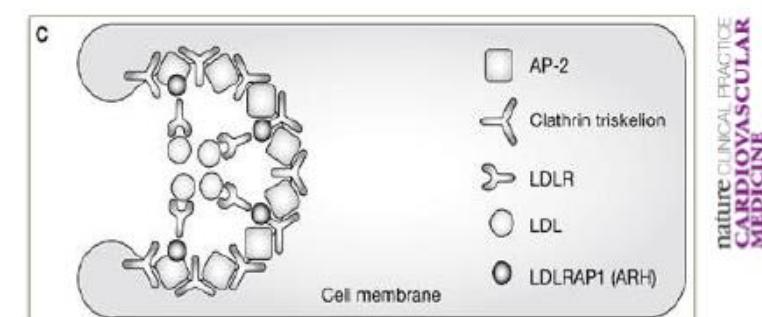


Cuando la proteína receptora llega a la membrana, va a reconocer específicamente a ApoB, sobre todo ApoB100. El complejo ligando-receptor entra por endocitosis por clatrina y en el que es importante la proteína AP1 LDLR. El cambio de acidez, al llegar al endosoma, produce que se desprendan del receptor.

El β propeller vuelve a cerrarse sobre sí mismo cuando se produce el desanclaje, lo que promueve el reciclaje. El receptor iría de nuevo a la membrana y la LDL se va al lisosoma.



La LDLRAP1 es una proteína adaptadora que se ancla a la proteína receptora. Interacciona con una porción citosólica del receptor.



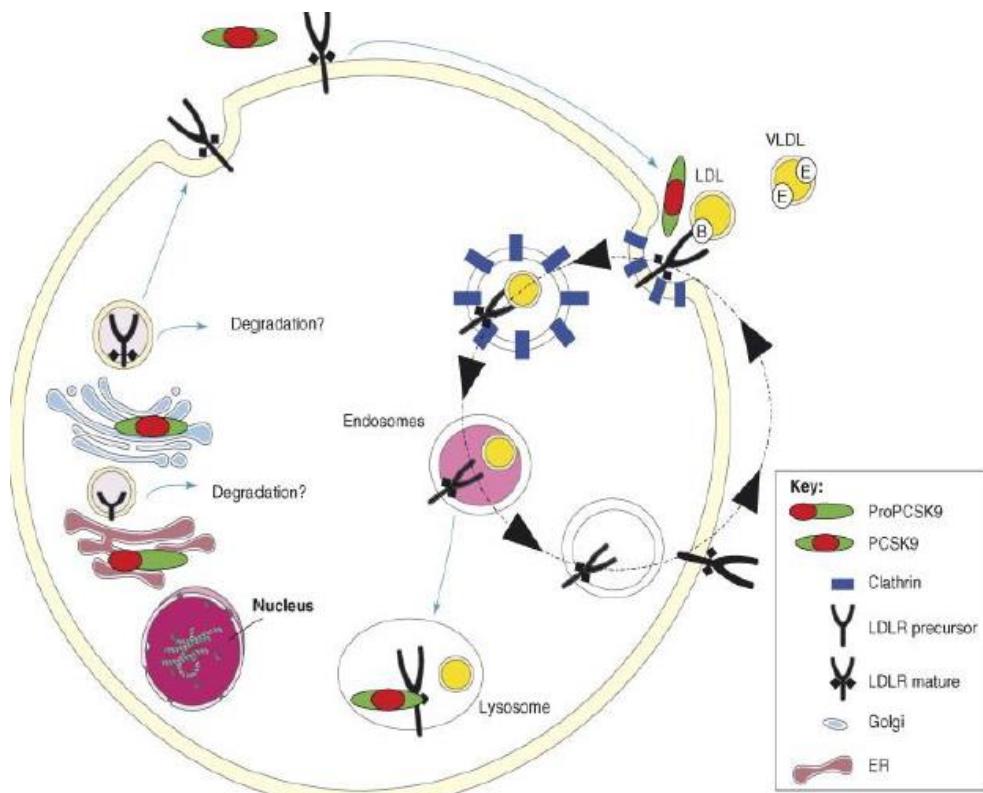
✓ Esta proteína contiene un dominio de fosfo-tirosina que interacciona con dominio citoplasmático del receptor permitiendo que dicho receptor se ancle a la invaginación recubierta de clatrina para su posterior endocitosis.

✓ Es decir funciona como **accesorio adaptador**

La PCSK9, es una proteína descrita en 2003. Es una proproteína convertasa. Esta familia de proteínas tendrían un papel como proteasas celulares. Su papel fundamental es controlar los niveles de LDLR en la membrana del hepatocito, reduciéndolos, mandándolo a lisosoma por su unión en el exterior celular.

Se sintetiza como zimógeno. Curiosamente, ese fragmento se queda unido no covalentemente, pero cierra el centro activo de su actividad proteasa. Sólo si se produce la autocatálisis, es capaz de migrar hasta el Golgi. Si no hay autocatálisis, la proteína se queda retenida en el retículo.

Se ha visto que es una proteína que aparece en sangre y que es capaz de reconocer el dominio EGF al receptor de LDL, uniéndose. El cambio de pH, en lugar de provocar que la proteína se libere de su unión, aumenta aun más la afinidad de la proteína por el receptor, haciendo que vaya al lisosoma. Esto implica que cuanto más PCSK9 hubiera en superficie, menos LDLR habría en el hepatocito.



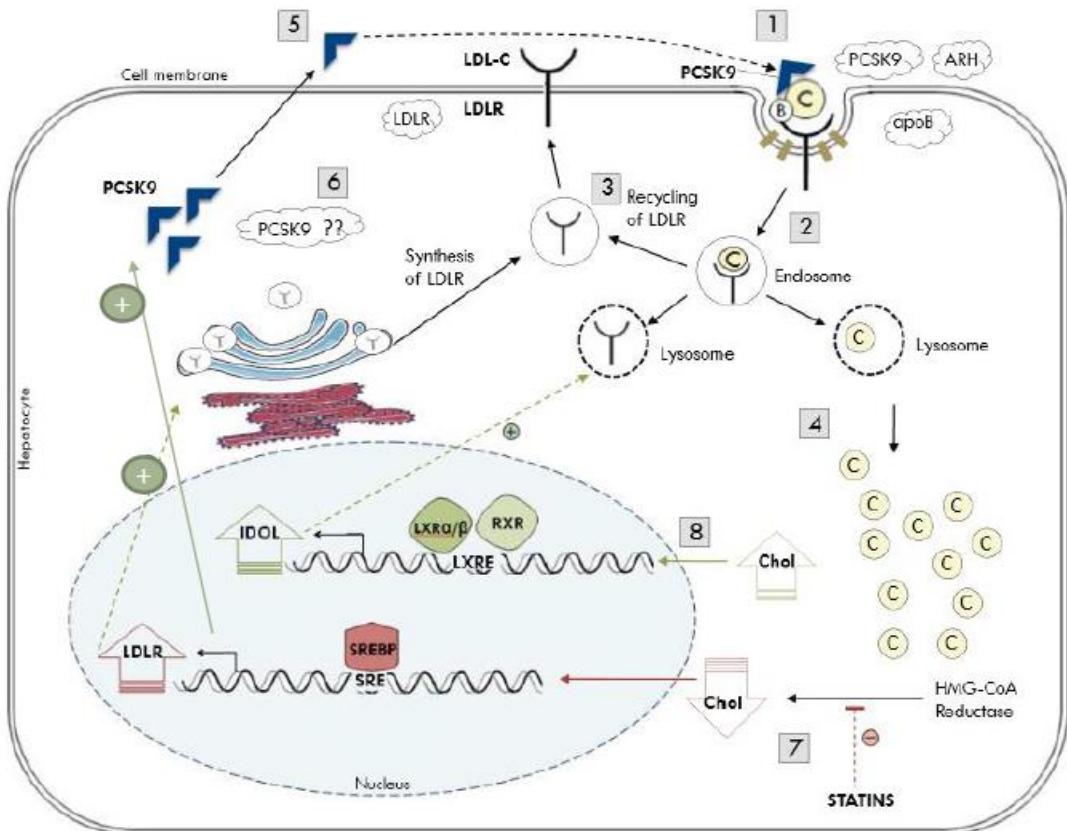
Sólo entre un 1-5% de los LDLR se unen a la PCSK9.

El reciclaje normal del receptor puede dar hasta unos 150 ciclos. Cuando nos pasamos de vueltas de ciclo, el receptor puede poliubiquitinarse e irse a degradación. La PCSK9 con un porcentaje reducido de receptores es capaz de interaccionar (no se sabe si solo sobre la unión a LDL-R o el receptor solo). Esto, por consiguiente, manda a todo el conjunto a degradación lisosomal.

Los niveles de colesterol intracelulares provienen en una quinta parte de colesterol dietético. Los niveles de colesterol están determinados por SREBP y también por la IDOL, una proteína que manda al receptor a degradación.

Sabemos que cuando los niveles de colesterol están bajos, se activan los genes SRE, y entre otros se sintetiza el receptor pero también PCSK9. Esto permite controlar y regular los niveles de receptor.

Una propuesta es que en el retículo se pudiera bloquear la translocación, pero esto no está lo suficientemente probado.



PCSK9 es un target terapéutico.

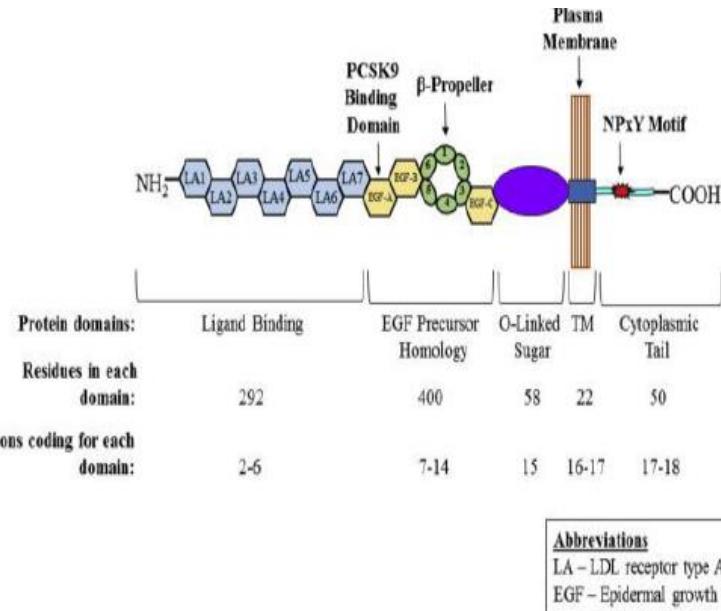
Mutaciones en el gen LDLR

Dependiendo de dónde sean las mutaciones, **tendremos un defecto más o menos grave con la proteína receptora, de gravedad variable.**

Los pacientes con mutaciones patogénicas con la forma homocigota van a ser las formas más graves. **Mueren jóvenes con enfermedad coronaria y en muchas ocasiones precisan aféresis.**

Las mutaciones en el gen de LDLR pueden causar: **ausencia de síntesis, disminución de la liberación desde el retículo, defectos en la unión al ligando, defectos en el transporte a membrana, defectos en la internalización o defectos en el reciclaje.**

Los pacientes **ADH** con **mutaciones en el LDLR** presentan los fenotipos más graves y con niveles más altos de lípidos, **con temprana aparición y grado de severidad.** Tienen una peor respuesta a la terapia con estatinas.

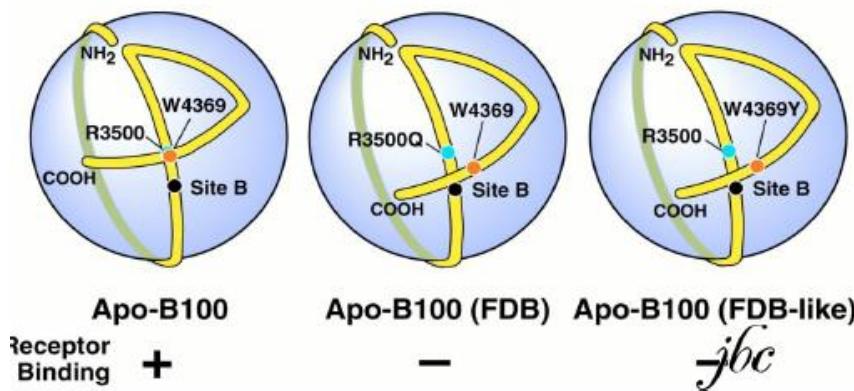


Abbreviations

- LA – LDL receptor type A repeat
- EGF – Epidermal growth factor
- TM – Transmembrane

Mutaciones en APOB100

Dan lugar a una **enfermedad autosómica dominante**, hay pocas mutaciones. Tienen que ver con el sitio de unión al receptor, que provoca una mutación en el extremo carboxi-terminal. Son algo menos graves.



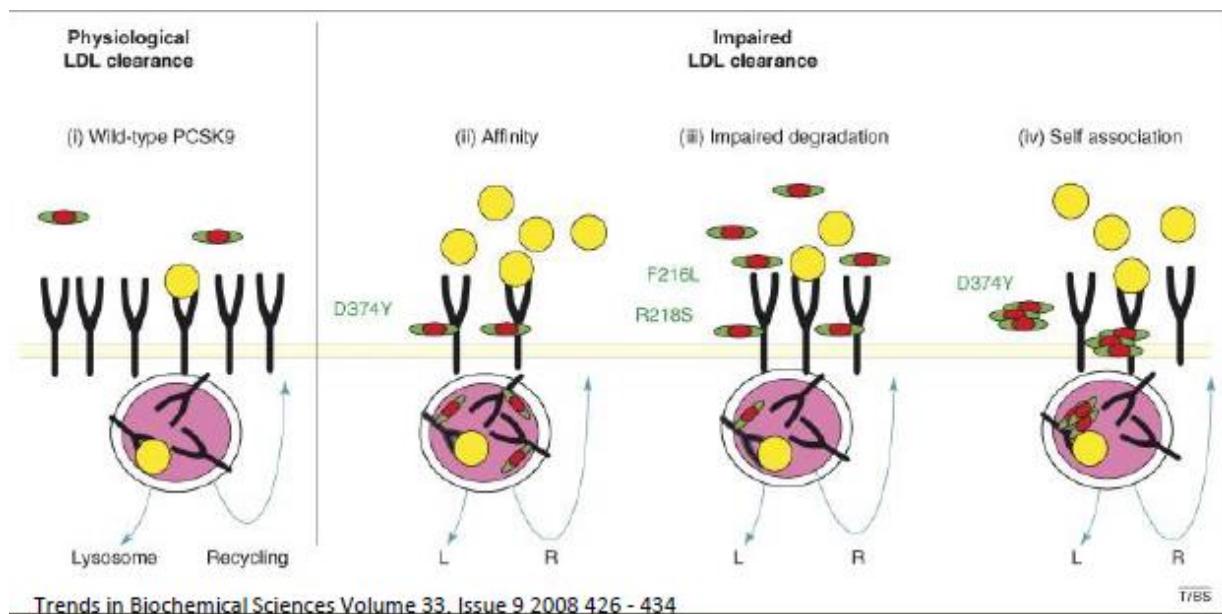
La interacción entre la **arginina 3500** y el **triptófano 4369** es esencial para el correcto plegamiento del extremo carboxi-terminal de ApoB100 que permite la interacción de LDL con su receptor. Mutaciones en cualquiera de ambos residuos disminuyen dicha unión.

Mutaciones en PSCK9

Dos tipos de mutaciones:

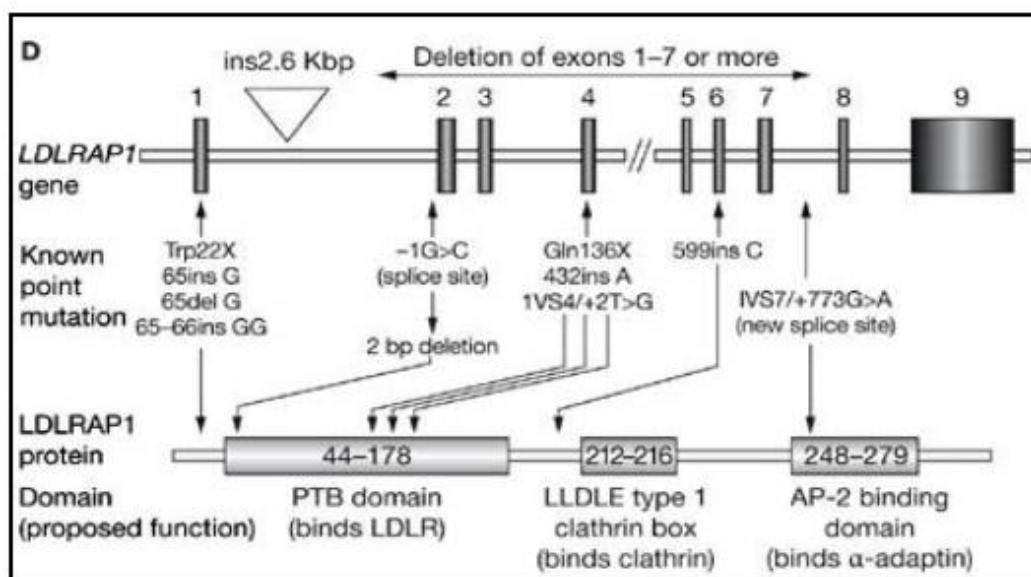
- **Mutaciones de ganancia de función.** Provocarían que la proteína sea capaz de agregarse consigo misma, ligando mucho más fuertemente al receptor y produciendo una mayor degradación del mismo.
- **Mutaciones de pérdida de función.** No es patogénica en hipercolesterolemia, provocaría hipコレsterolemia. Base de terapias de bloqueo.

	Phenotype	Notes
A:S127R	Gain-of-Function	Possible susceptible to proteolysis for removal of auto inhibition. Associated with hypercholesterolemia.
B:D374Y	Gain-of-function	In P' region and may alter specificity of active site regions thus increasing affinity for substrate. Associated with hypercholesterolemia.
C:H417Q	Gain-of-function	On helix in region adjacent to another histidine 449. Mode of operation unclear
D:F515L	Gain-of-function	Second beta-turn-beta of putative binding site in SD1 of resistin-like CRD.
E:R469W	Gain-of-function	Putative binding region of resistin-like CRD. Completely conserved in mammals
F:H553R	Gain-of-Function	Situated at bottom of SD1 of resistin-like-CRD
G:E482G	Gain-of-Function	Highly conserved in mammalian proprotein convertases.
H:G106R	Loss-of-function	Exposed loop of pro-domain – likely to restrict conformation and have folding issues
I:N157K	Loss-of-function	Introduction of steric clashes probably hindrance to folding.
J:R237W	Loss-of-function	Exposed loop at opposite side from active site - mode of action for loss-of-function is not clear
K:L253F	Loss-of-function	Active site in S2 pocket, highly conserved across species, increasing the bulk of the side chain will clearly lead to loss of specificity/ability to process.



Mutaciones en LDLRAP1

La herencia es **autosómica recesiva**, el **número de pacientes es más reducido** y los pacientes tienen **síntomas más suaves**. También otros genes implicados en la forma autosómica recesiva como **LIPA**, **ABCG5** y **ABCG8**.



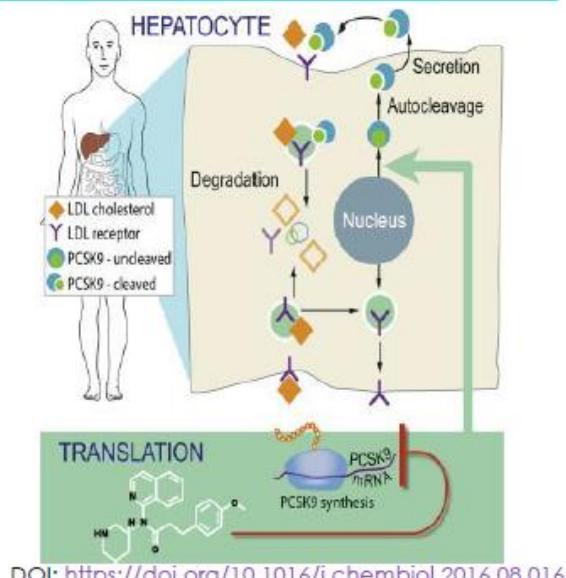
Tratamientos de la hipercolesterolemia familiar por inhibición de PCSK9

Se ha propuesto:

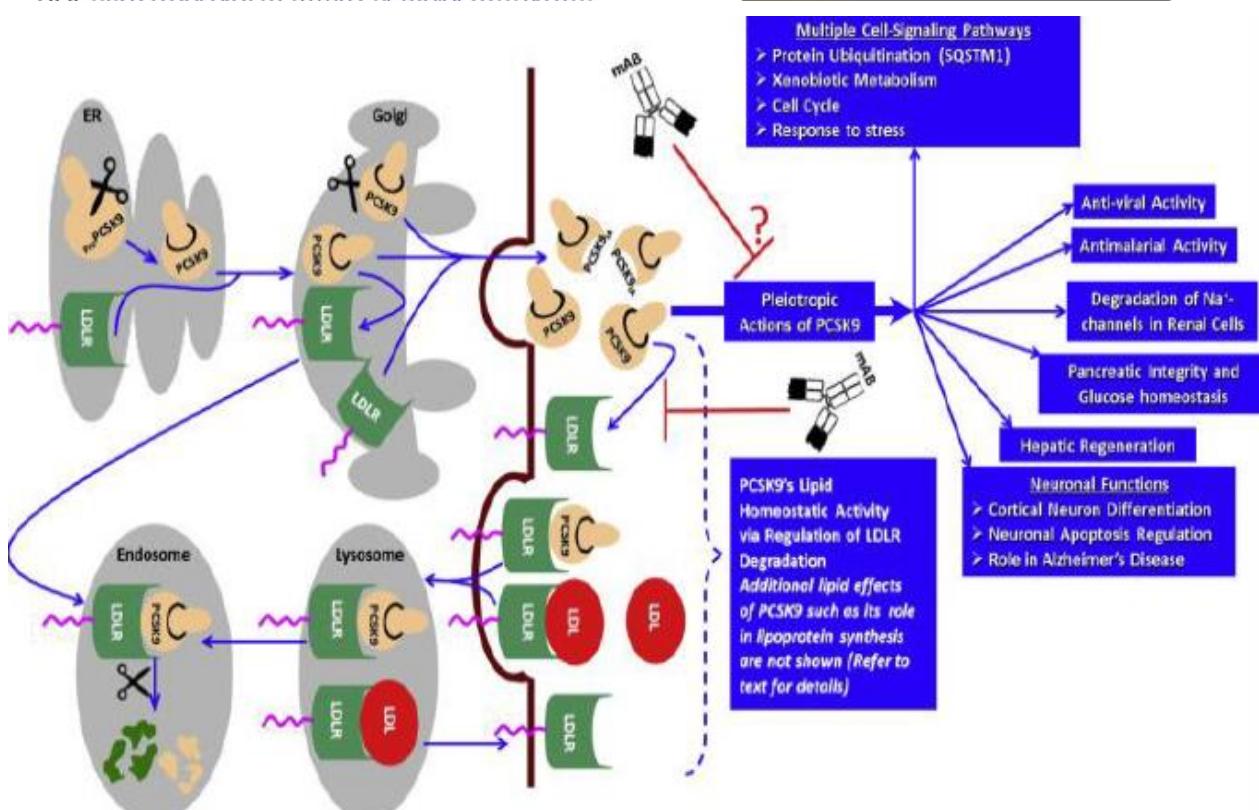
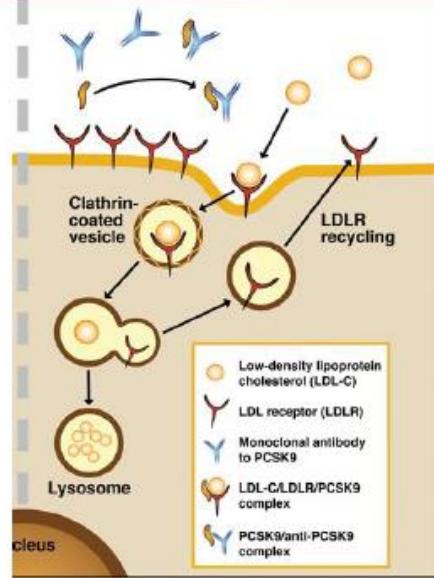
- siRNA para evitar la expresión
- Bloqueo en la traducción de la proteína PCSK9. Fármaco en trial clínico.
- Anticuerpos neutralizadores en uso clínico

Se están dando incluso antes de saber todo el perfil de funcionalidad de PCSK9. Podría tener otras funciones, generando efectos secundarios.

A small-molecule anti-secretagogue of PCSK9 targets the 80S ribosome to inhibit PCSK9 protein translation

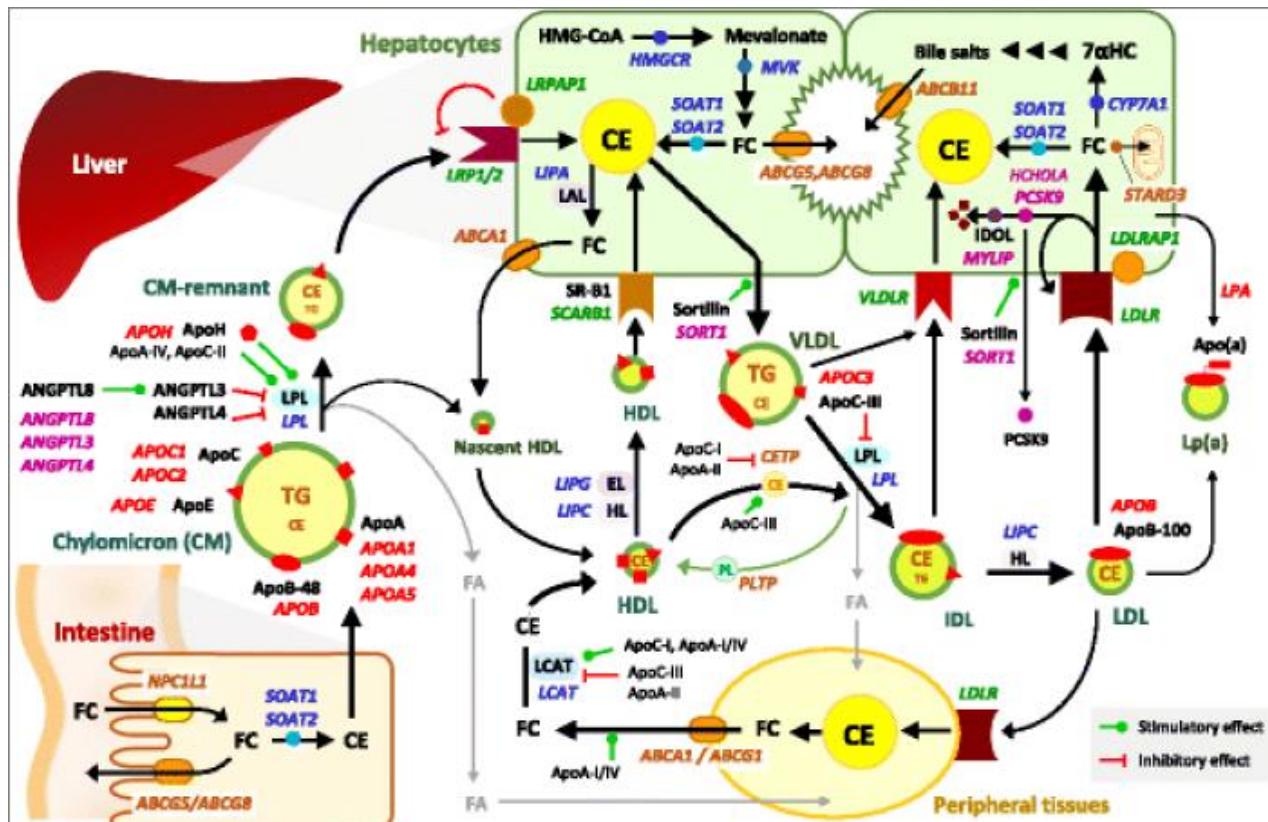


Anticuerpos neutralizadores que reconocen la región de unión PCSK9-LDLR como AMG145 ó REG727 ya aprobados



Causas poligénicas

En el metabolismo de colesterol, puede haber montones de cambios polimórficos que afecten a la síntesis de colesterol. Combinaciones de **cambios polimórficos en los distintos genes son los causantes de la patología..**

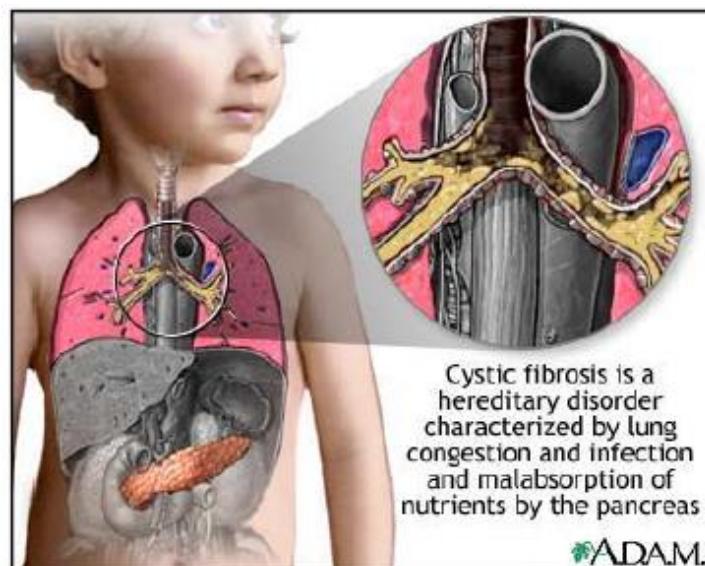


Bases Moleculares de la Patología

Fibrosis quística – 08-04-2019

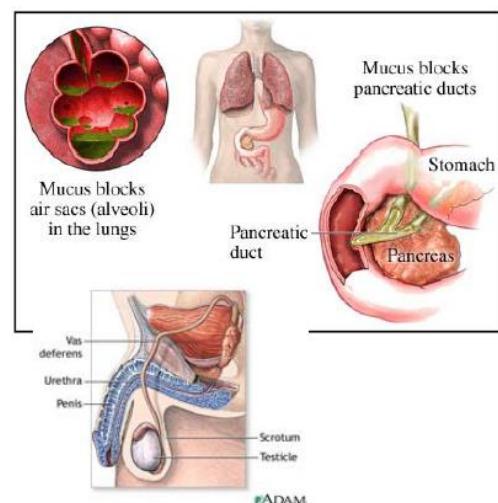
Muy frecuente en población caucásica. Se conoce también como la “enfermedad de las 65 rosas – Sixty five roses – Cystic fibrosis”. Principalmente, mueren por problemas pulmonares, infecciones recurrentes.

Tienen un sudor salado en la piel. No crecen ni ganan peso adecuadamente, denominado el “**fallo de medro, failure to thrive**”. Tienen **problemas digestivos, infecciones pulmonares recurrentes, neumonía y bronquitis**. Algunos recién nacidos tienen obstrucción intestinal. En varones es frecuente la esterilidad, por **ausencia de vas deferens**.

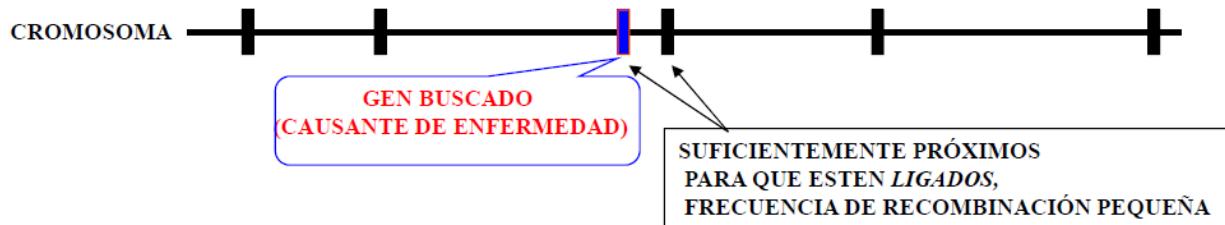


Debido a que afecta a todo el organismo (pulmones, tracto gastrointestinal, hígado y páncreas, sistema endocrino, aparato reproductor masculino...) fue **difícil denominar la causa**. Es una enfermedad rara, siendo **muy frecuente en población caucásica**.

El gen causante de la enfermedad se aisló por **clonaje posicional**. Se usa la técnica de desequilibrio de ligamiento y mapeo posicional. Se busca un gen causante de enfermedad, **para ver si se hereda con un alelo de un marcador polimórfico porque físicamente está muy próximo**.

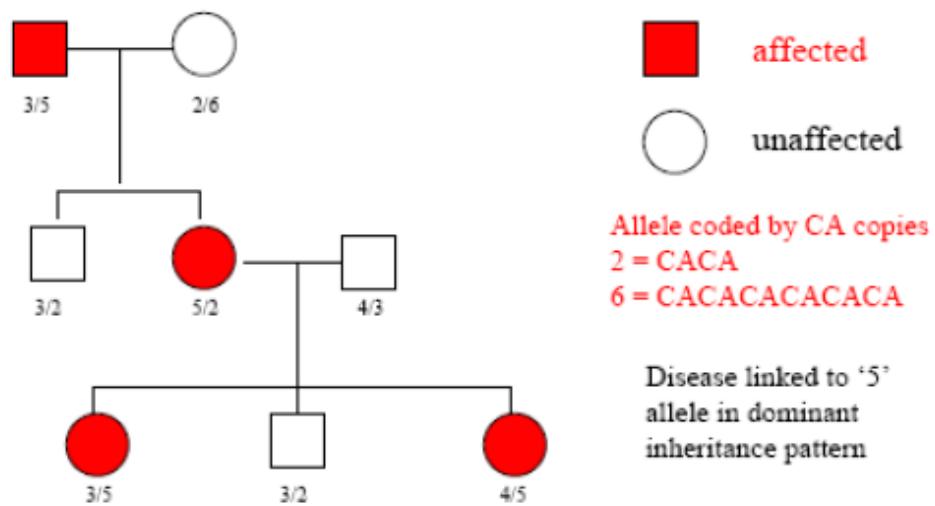


Si no hay recombinación entre los dos locos, estos dos genes están ligados y físicamente próximos.
La manera de estimar la distancia es por medio de la frecuencia de recombinación.

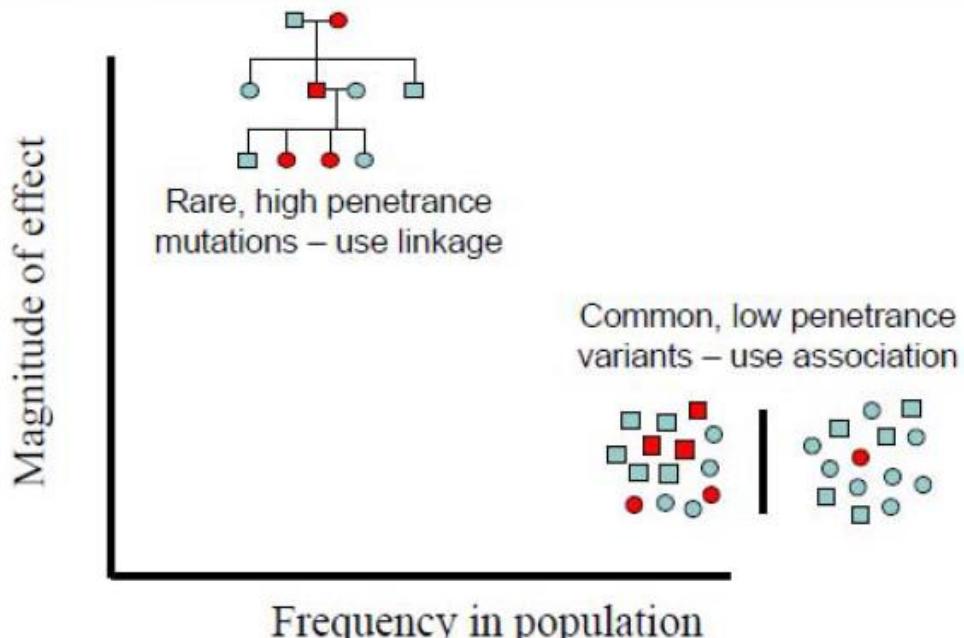


Necesitamos pedigreees extensos, con familiares donde veamos los afectados de la enfermedad, analizando polimorfismos a lo largo de todo el genoma:

- **Microsatélites, VNTRs...**

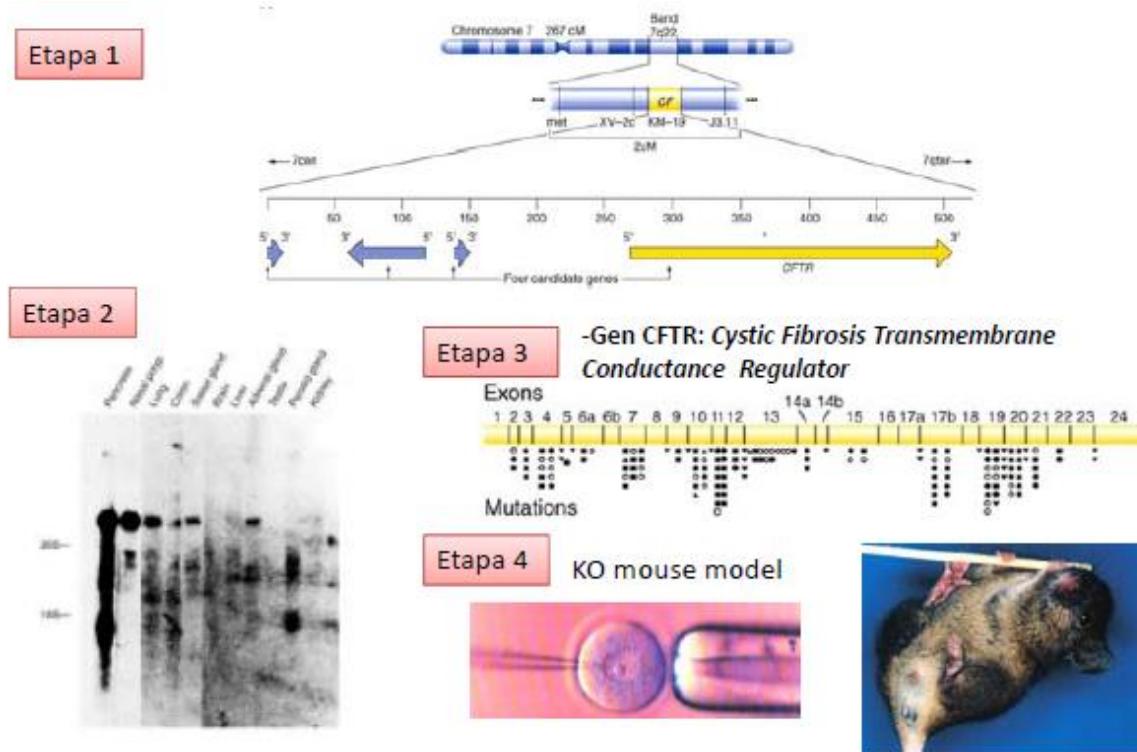


Esto es totalmente opuesto de los **estudios de asociación**. Los estudios de asociación suelen utilizarse con estudios poblacionales con estudios caso/control. En este caso, se busca que uno de los alelos predisponga a la enfermedad, suelen ser polimorfismos funcionales.



El gen de la fibrosis cística se aisló por **clonaje posicional** en 1989, por medio de marcadores polimórficos a lo largo de todo el gen en el cromosoma 7. En dicha región del cromosoma 7 sólo había 4 genes. Usaron northern blot para ver en qué lugar se expresaban los genes.

Secuenciaron el gen en los pacientes, encontrando mutaciones. Como última evidencia, necesitaban un ratón KO para el gen.



Distintos modelos **animales de fibrosis quística reproducen en mayor o menor medida**. El ratón no reproduce los problemas pulmonares, pero sí obstrucción intestinal. Otros de los modelos son cerdos y hurones, mimetizando los síntomas de la enfermedad.

Table 1 | Phenotype features in humans and animal models with mutated CFTR

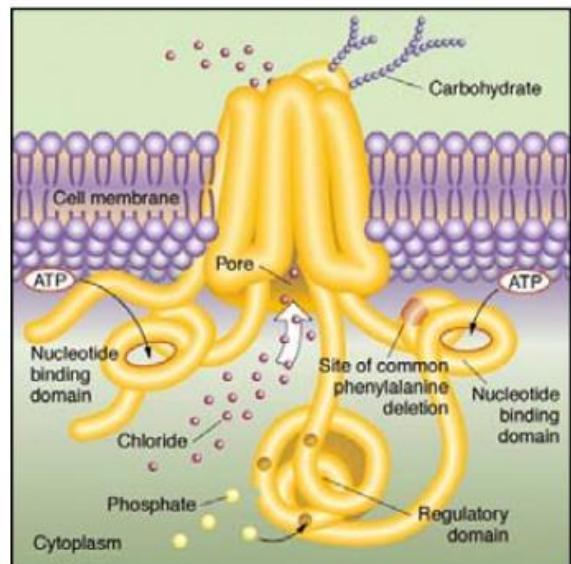
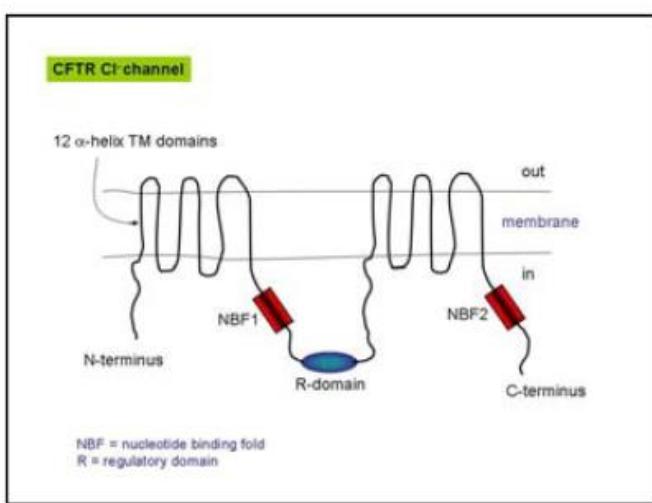
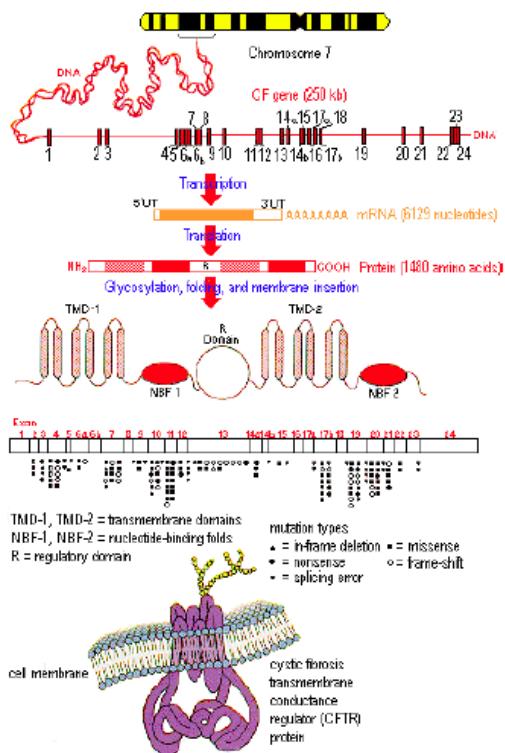
Features*	Human	Pig	Ferret	Mouse	Rat	Zebrafish
Aberrant chloride transport	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Intestinal obstruction	↑	↑↑	↑↑	↑↑‡	↑↑‡	-
Growth disturbance	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑	-
Maldevelopment of trachea	↑	↑	↑	↑	↑	-
Pancreatic exocrine dysfunction	↑	↑↑	↑	-	-	-
Obstructive lung disease	↑	↑	↑	-	-	-
Liver dysfunction	↑	↑↑	↑	-	-	-
Diabetes mellitus	↑	↑	↑	-	-	-
Anomalous vas deferens	↑	↑	↑	-	↑	-

CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Data are summarized from reviews^{43,48} and primary publications^{39,42,56,59,147}. ‡Intestinal obstruction occurs after the neonatal period in murine models around the time of weaning.

La proteína afectada, la CFTR, tiene **dos dominios transmembrana con varias hélices**, siendo un miembro de la familia de transportadores ABC. Es un **transportador de cloro que utiliza ATP**. Tiene dos dominios de unión a ATP, con **12 hélices transmembrana**. **Forman un poro que transporta cloro.**

Tienen un dominio de tipo regulador que tiene varios subdominios que le sirven para interaccionar con varias proteínas, **en concreto otros canales de la membrana, aquaporinas, canales de potasio, etc.**

Su función, en conjunto, es mediar la regulación del transporte de iones y de líquidos a través de los epitelios en los que se encuentra. En **condiciones fisiológicas y patológicas incluye estos tipos de regulación.**



En el epitelio pulmonar, el principal problema en los pacientes con fibrosis quística se ha encontrado por técnicas novedosas un nuevo tipo de células donde se localiza el canal CFTR, los **ionocitos pulmonares**. Se distinguieron por single-seq RNAseq.

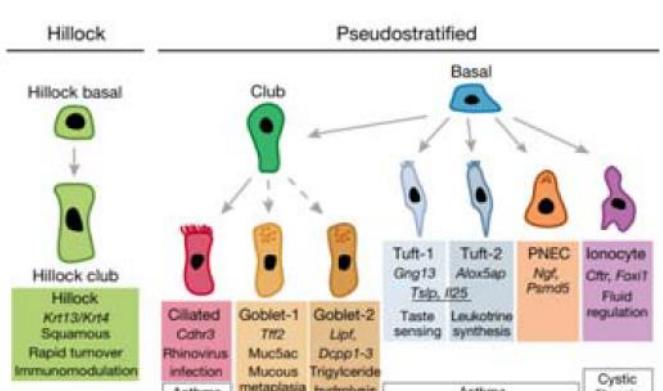
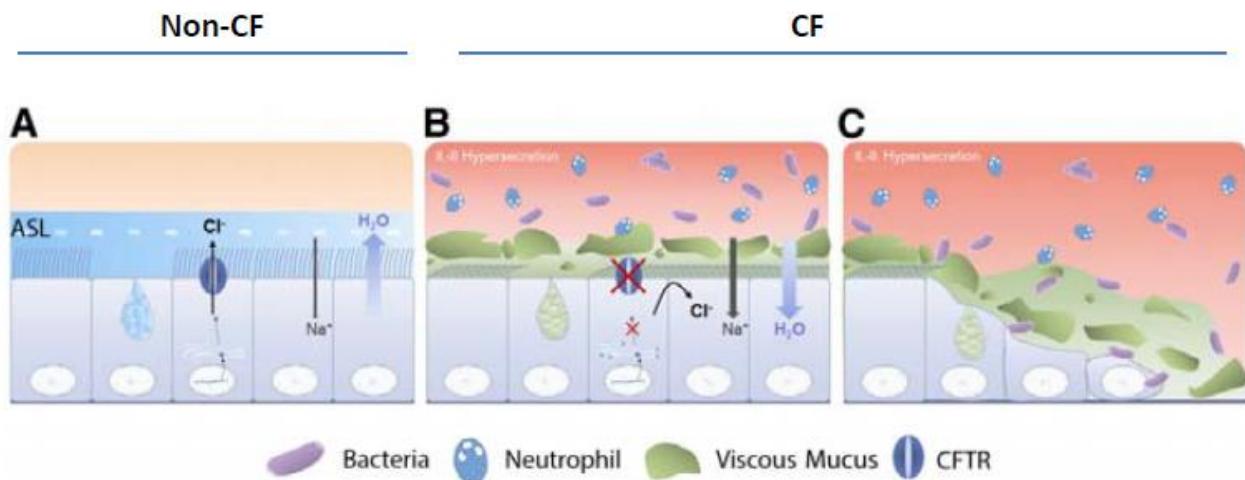


Fig. 6 | Lineage hierarchy of the airway epithelium. Specific cells are associated with novel cell-type markers, pathways and diseases.

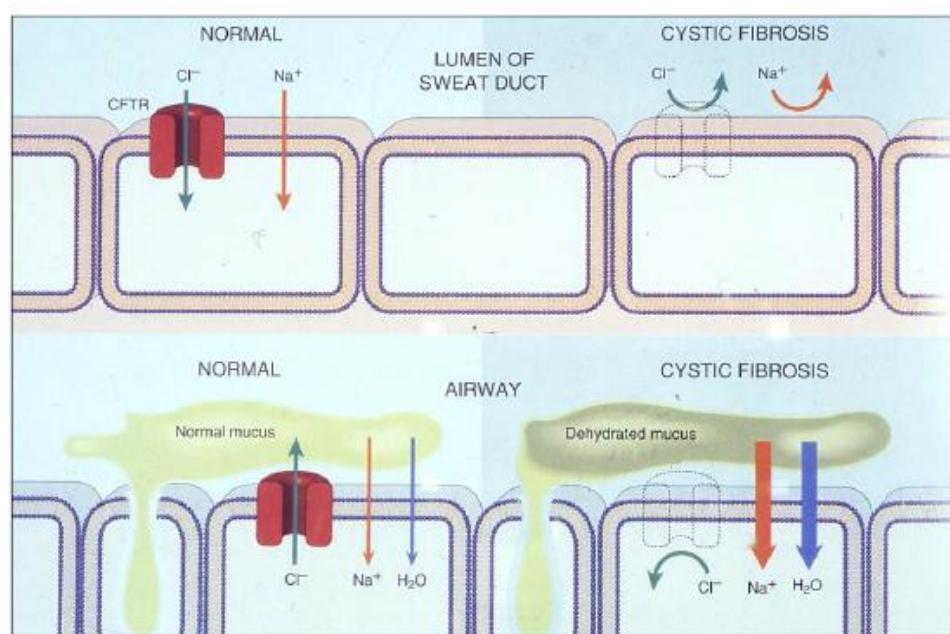
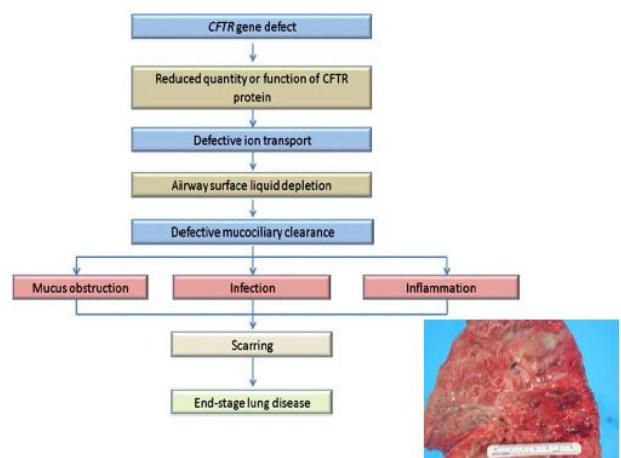
Cuando el canal no funciona, el cloro no sale, se capta más sodio por deshidratación. Se da una secreción más espesa y viscosa, un caldo de cultivo para bacterias que produce infecciones recurrentes e infección pulmonar. En el páncreas, los conductos pancreáticos se bloquean, provocando pancreatitis.



A nivel del epitelio pulmonar, no solamente la densidad del moco es el causante, sino que hay un proceso inflamatorio y fibrótico. El cloro no sale, de manera que entra más sodio. Se produce una deshidratación pues entra más agua al interior.

Al final, hay una atracción de neutrófilos, interleuquinas, etc. que produce una degeneración de todo el tejido, produciendo un pulmón afuncional.

Con respecto al sudor, cuando el canal CFTR no funciona, el cloro no puede entrar y el sodio se ve atrapado por la atracción electrostática, secretándose valores altos de cloruro sódico.

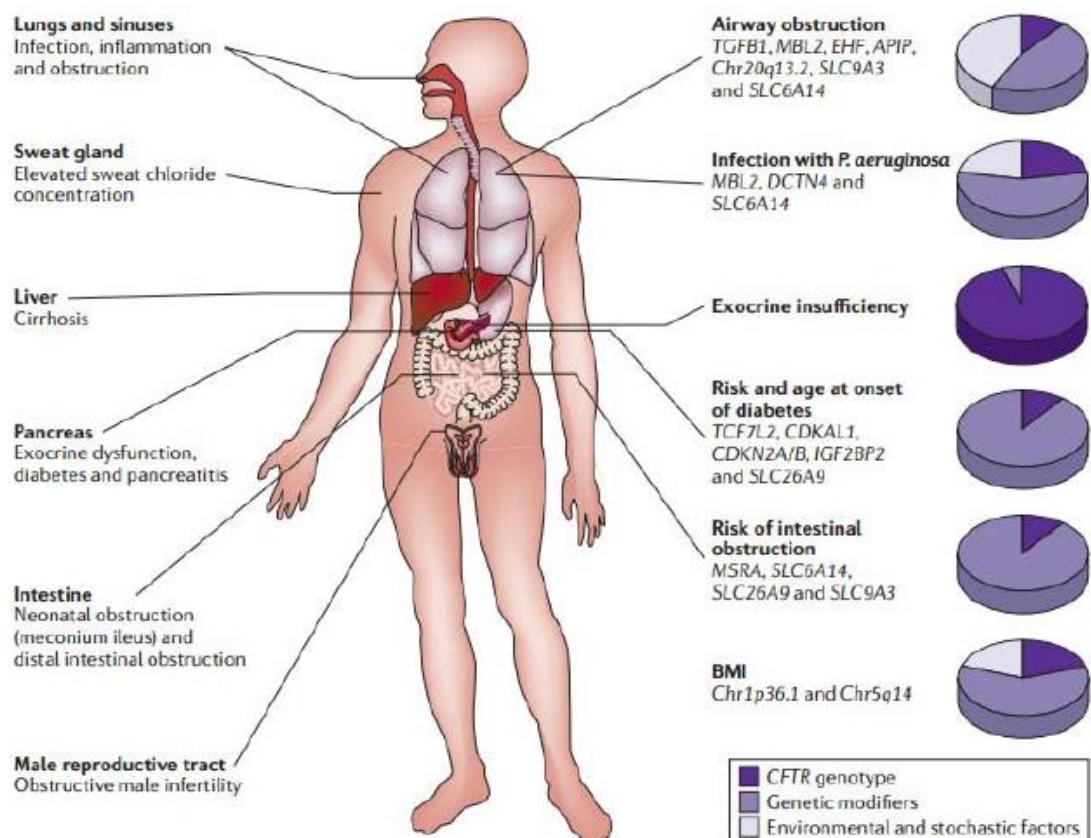


Modificadores genéticos

El fenotipo es muy complejo y no todos los pacientes desarrollan los mismos síntomas. El que haya obstrucción respiratoria y fibrosis depende de polimorfismos en TGF β , otros transportadores y factores ambientales en su mayoría.

Hay otras cuya **mayor parte del síntoma se debe a la disfunción del canal CFTR**. La infección con pseudomonas aeruginosa se modifica con factores autofágicos, por ejemplo.

Enfermedad mendeliana, fenotipo complejo → MODIFICADORES GENÉTICOS



El crecimiento también estará determinado más por los modificadores genéticos en lugar del canal.

Diagnóstico

- **Test del sudor.** Se mide la **concentración de cloro y sodio excretado en el sudor**. Es un aparato con dos electrodos en una parte de la piel, **y se estimula la producción del sudor con una sustancia química (pilocarpina)**. Esta sustancia química tiene una carga positiva, **de manera que migra hacia el polo negativo a través de la epidermis y estimulando las glándulas sudoríparas**.

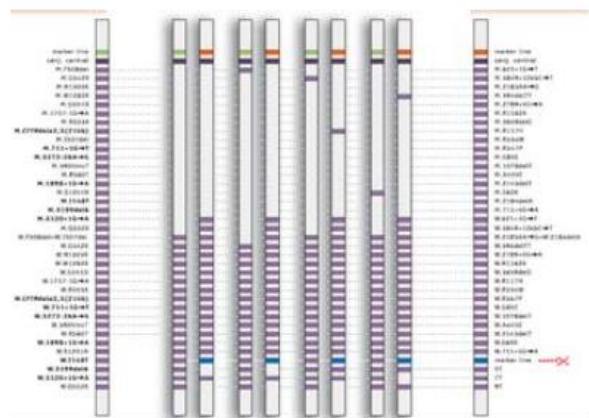
Se recoge el sudor en esa parte, **midiendo por HPLC**. Se sigue haciendo en muchos hospitales.

- **Medida de inmunotripsinógeno en sangre por screening neonatal (ELISA)**
- **Medida del potencial nasal.** En el epitelio olfativo, está alterada la diferencia de potencial que hay a ambos lados del mismo.

- Análisis genético.

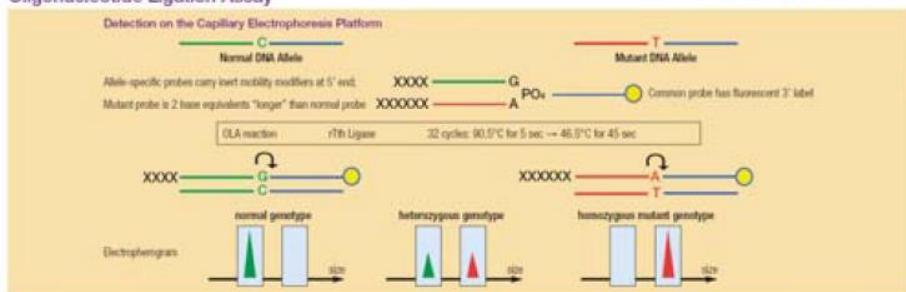
- Test comerciales que identifican las mutaciones comunes. Se han inmovilizado una serie de oligos. El DNA del paciente se amplifica y se biotinila.

No detecta todas las mutaciones, el 85% de los pacientes se pueden detectar por este método.



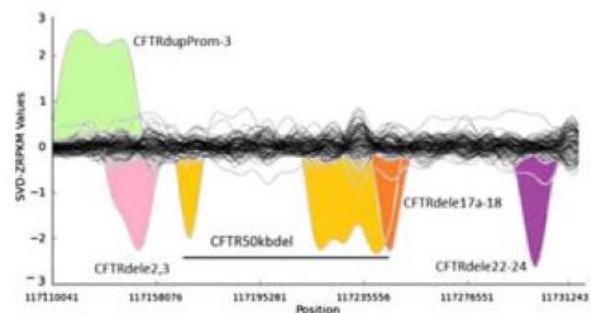
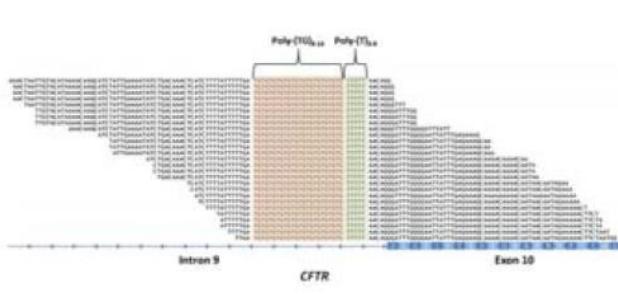
INNO-LiPA CFTR: Basado en la hibridación específica de alelo

Oligonucleotide Ligation Assay



OLA: sondas alelo específicas

- Hoy en día, mediante secuenciación masiva. Las delecciones se ven por la profundidad de lecturas.



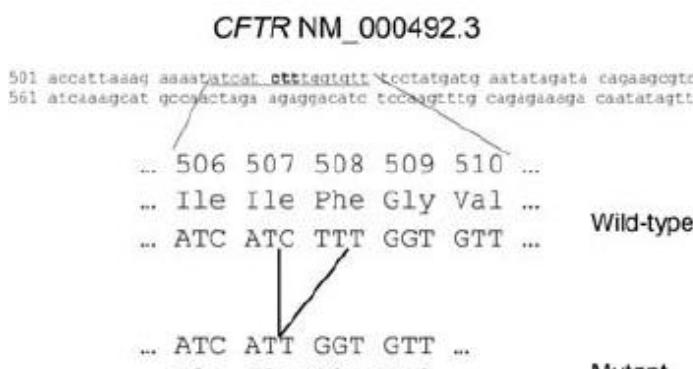
Todo el gen debería leerse a un número de lecturas igual, de manera que habrá menos lecturas en heterocigosis.

Hoy en día hay más de 2000 mutaciones descritas y la mutación más frecuente es la **ΔF508**. La mutación ocurrió probablemente en el norte de Europa hacia 50.000 años. Los individuos homocigotos para **ΔF508** son enfermos y no se reproducen.

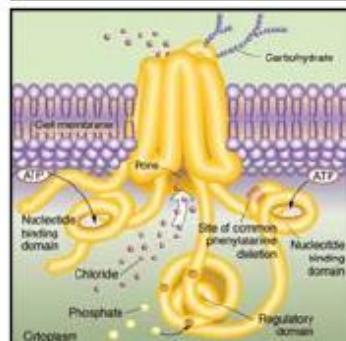
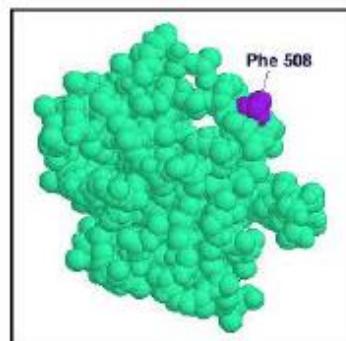
Debe haber una **ventaja de los heterocigotos**. Se piensa que el tener menos cantidad de este canal puede ser importante para prevenir la pérdida de agua durante el cólera, incrementándose las posibilidades de sobrevivir a grandes epidemias. También se teoriza sobre una mayor resistencia a fiebres tifoideas, pues *Salmonella typhii* usa el canal para entrar.

La mutación **ΔF508** produce una glicosilación y tráfico defectivo no llegando a la membrana y siendo degradado por el sistema ubiquitina proteosoma.

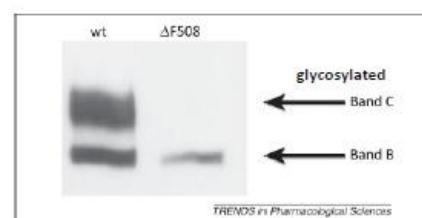
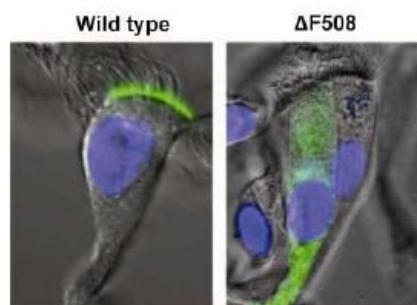
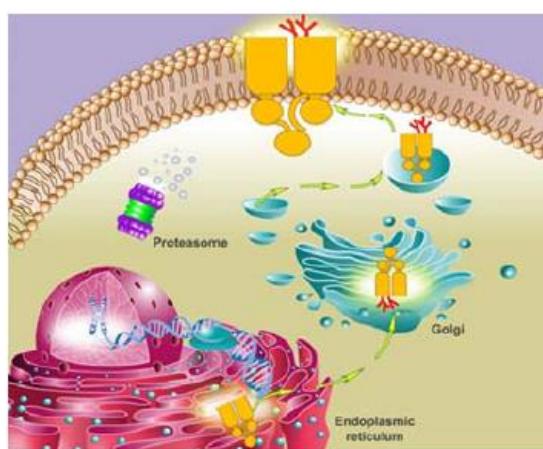
Es una delección de 3pb que causa la delección de la fenilalanina 508



CFTR NM_000492.3:c.1521_1523del (p.F508del)



BIOGÉNESIS DE CFTR

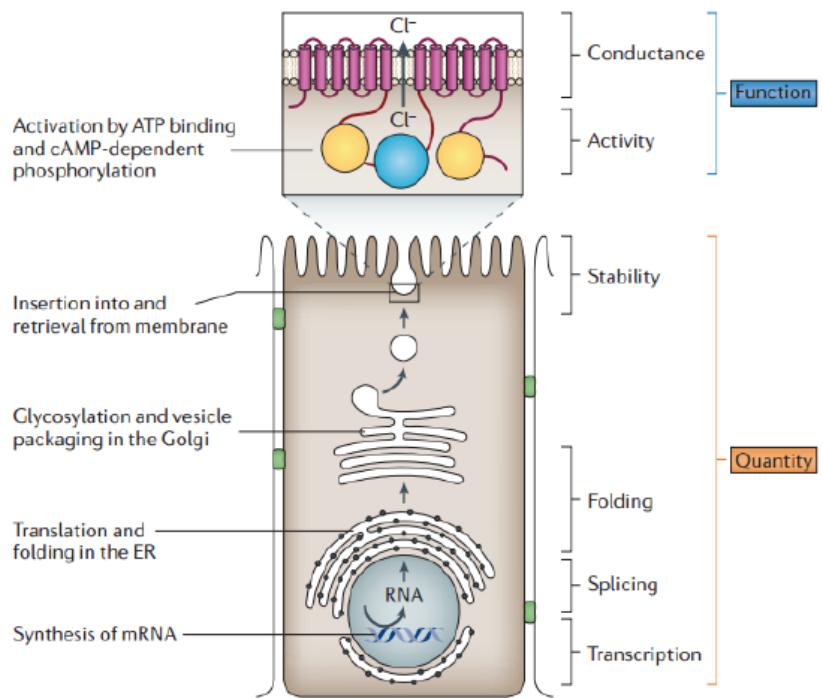


ΔF508 TIENE UNA GLICOSILACIÓN Y TRÁFICO DEFECTIVO, NO LLEGANDO A LA MEMBRANA Y SIENDO DEGRADADO POR EL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA

Algunas otras afectan al procesamiento, splicing, etc. Una vez en membrana, otras afectan a la regulación por fosforilación o la conductancia del poro.

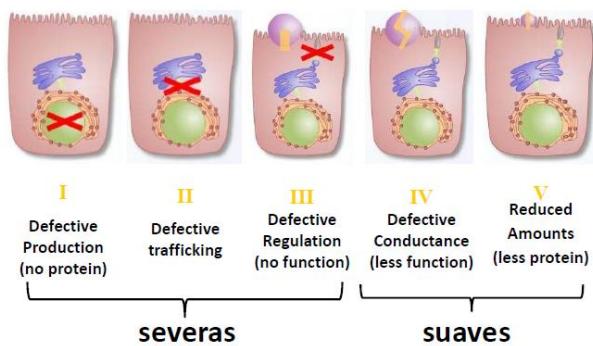
Para cada tipo de mutación se están aplicando terapias diferentes. Los fenotipos más severos son aquellos en los que no se produce proteína o no llega a membrana. Hay otras graves en las que no se puede dar la activación.

Las asociadas a fenotipos más suaves son aquellas en las que la conductancia del canal está disminuida o aquellas mutaciones de splicing sin efecto completo.



Cinco clase de mutaciones:

- No se produce proteína
- No hay un tráfico correcto
- Regulación defectiva
- Conductancia reducida
- No llega suficiente cantidad a membrana



La mortalidad asociada a diferentes tipos de mutaciones mantiene una correlación con las mutaciones. Cada tipo de mutación se va a asociar con un pronóstico, mejor o peor.

Classification of the *CFTR* gene mutations.

Class	Mutation prototypes	Consequences
<i>Severe CF phenotype</i>		
I	G542X, W1282X, R553X, 3950delT	CFTR is not synthesized because of stop codons or splicing defects
II	F508del, N1303K	CFTR is synthesized but in an immature form (only partly glycosylated, misfolded, not released from the endoplasmic reticulum) and is mostly degraded by the ubiquitin-proteasomal pathway
III	G551D	CFTR is synthesized and transported to the plasma membrane, but its activation and regulation by ATP or cAMP are disrupted
<i>Milder CF phenotype</i>		
IV	R334W, G314E, R347P, D1152H	CFTR is synthesized and expressed at the plasma membrane, but chloride conductance is reduced
V	3849 + 10 kb C>T, 3272-26 A>G	CFTR synthesis or processing is partly defective

Class	Patients (n)	Person-years	Deaths	Crude mortality rate*	Standardised mortality rate* (95% CI)	p value†
I	1670	9499	181	19.1	20.4 (17.4-23.4)	0.615
II	9820	54 060	1059	19.6	21.2 (20.0-22.5)	..
III	667	3688	65	17.6	16.0 (12.1-20.0)	0.013
IV	349	1713	26	15.2	7.8 (4.2-11.4)	<0.0001
V	296	1398	22	15.7	9.1 (4.8-13.5)	<0.0001
Unclassified	5051	26 517	548	20.6	19.1 (17.4-20.7)	0.039

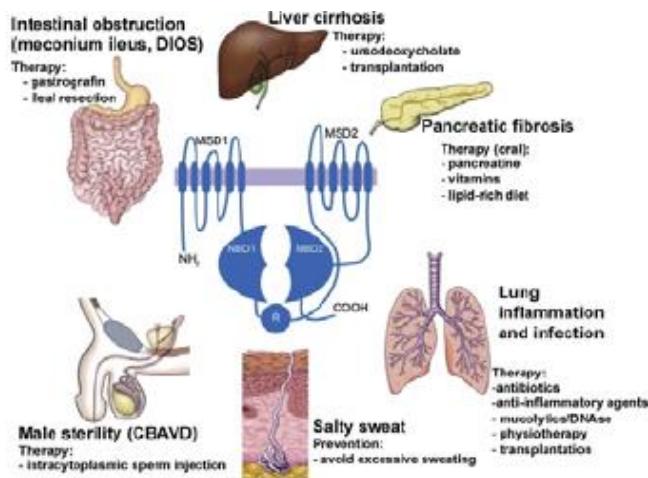
*Per 1000 person-years. †Calculated by comparison of standardised mortality rates for all functional classes with that for class II.

Table 4: Standardised mortality rates (including transplantation) as deaths by *CFTR* functional class

Tratamientos

- Tratamientos adyvantes o sintomáticos.

- Drenaje postural es una técnica para aflojar la mucosidad en la vía aérea para que se la pueda toser y expulsar del organismo.
- Antibióticos frente a Pseudomonas aeruginosa
- Vacunación frente a pseudomonas
- N-acetilcisteína como agente mucolítico.
- Agentes osmóticos inhalados
- Antiinflamatorios
- Fármacos bloqueantes del transportador de Na⁺ o estimuladores de otros transportadores
- Suplementación de enzimas pancreáticas en la comida
- Dieta calórica rica en grasas, suplementación con vitaminas



- Terapia génica. El pulmón como diana.

El principal órgano diana es el pulmón, que es fácilmente accesible mediante inhaladores. La terapia génica ha seguido varios problemas:

- Los **vectores adenovirales** producen mucha patología
- Los **liposomas catiónicos** no producen un efecto duradero
- En 1998 se comienzan a usar AAV
- **Vectores lentivirales y vectores no virales** se usan en 2016

Se está pensando una terapia con Crispr-Cas9 para vía oral o nasal.

Terapias específicas de mutación

- I. **Nonsense.** Drogas supresoras de la terminación.
- II. **Defectos del tráfico.** **Correctores** que rescatan la expresión en membrana.
- III. **Defectos en regulación.** **Potenciadores** de la función del transportador.
- IV. **Defectos de conductancia.** **Potenciadores**.
- V. **Niveles reducidos.** **Moduladores de splicing.**

MUTACIÓN (CLASE)	TRATAMIENTOS
I (mutaciones nonsense)	Drogas supresoras de la terminación
II (defectos tráfico)	Correctores (rescatan la expresión en membrana)
III (defectos regulación)	Potenciadores (de la función del transportador)
IV (defectos conductancia)	Potenciadores
V (niveles reducidos, mutaciones de splicing)	Moduladores de splicing

Bases Moleculares de la Patología

Fibrosis quística – 08-04-2019

- **Síntomas**

- Sudor salado
- Pulmón
- Páncreas e intestino
- Conductos espermáticos

Determinado por modificadores genéticos.

- **Epidemiología.** Enfermedad rara pero frecuente en el norte de Europa. 1 cada 3000. Ventajas de heterocigotos en secreción de agua y sales en procesos diarréicos.
- **Gen CFTR.** Se identificó por clonaje posicional. Se hace mediante muestras de familias con individuos afectados y ver la cosegregación con marcadores polimórficos hasta identificar una región del genoma donde esté el gen. Se confirmó en modelos animales con ciertas limitaciones.
- **Función del gen.** Transportador de cloro de tipo ABC y regula a otros transportadores de membrana mediante interacción directa, mediando muchos procesos fisiopatológicos en los que haya que establecer un flujo de iones y agua a través de epitelios.

Se localizan en **ionocitos pulmonares**, un tipo celular donde hay que dirigir las terapias. No es muy frecuente en el epitelio pulmonar. Si conseguimos aumentar la diferenciación hacia ionocitos podemos aumentar la cantidad de células que producen ese canal.

- **Patología.** No funciona el transportador de cloro, **habiéndose una deshidratación y produciéndose un moco espeso**. Produce inflamación, fibrosis y degeneración del tejido pulmonar.

La concentración final de iones en el sudor es mediante procesos de absorción-reabsorción. Al no reabsorberse el cloro, **hay una mayor concentración de cloro y sodio en el sudor**.

- **Diagnóstico.** Test del sudor hasta el diagnóstico genético. Mutación más frecuente es ΔF508, que produce un tráfico defectivo hacia la membrana. Es muy mayoritaria, **dividiéndose el resto en cinco tipos**

- I. No hay proteína.
- II. Tráfico defectivo.
- III. Regulación y activación defectiva.
- IV. Conductancia alterada.
- V. Menos proteína en la membrana.

Según el tipo de mutación, da el pronóstico de la enfermedad.

Tratamientos sintomáticos.

Van a aliviar según van apareciendo complicaciones relacionadas con la enfermedad. Algunas otras son preventivas como vacunación frente a pseudomonas.

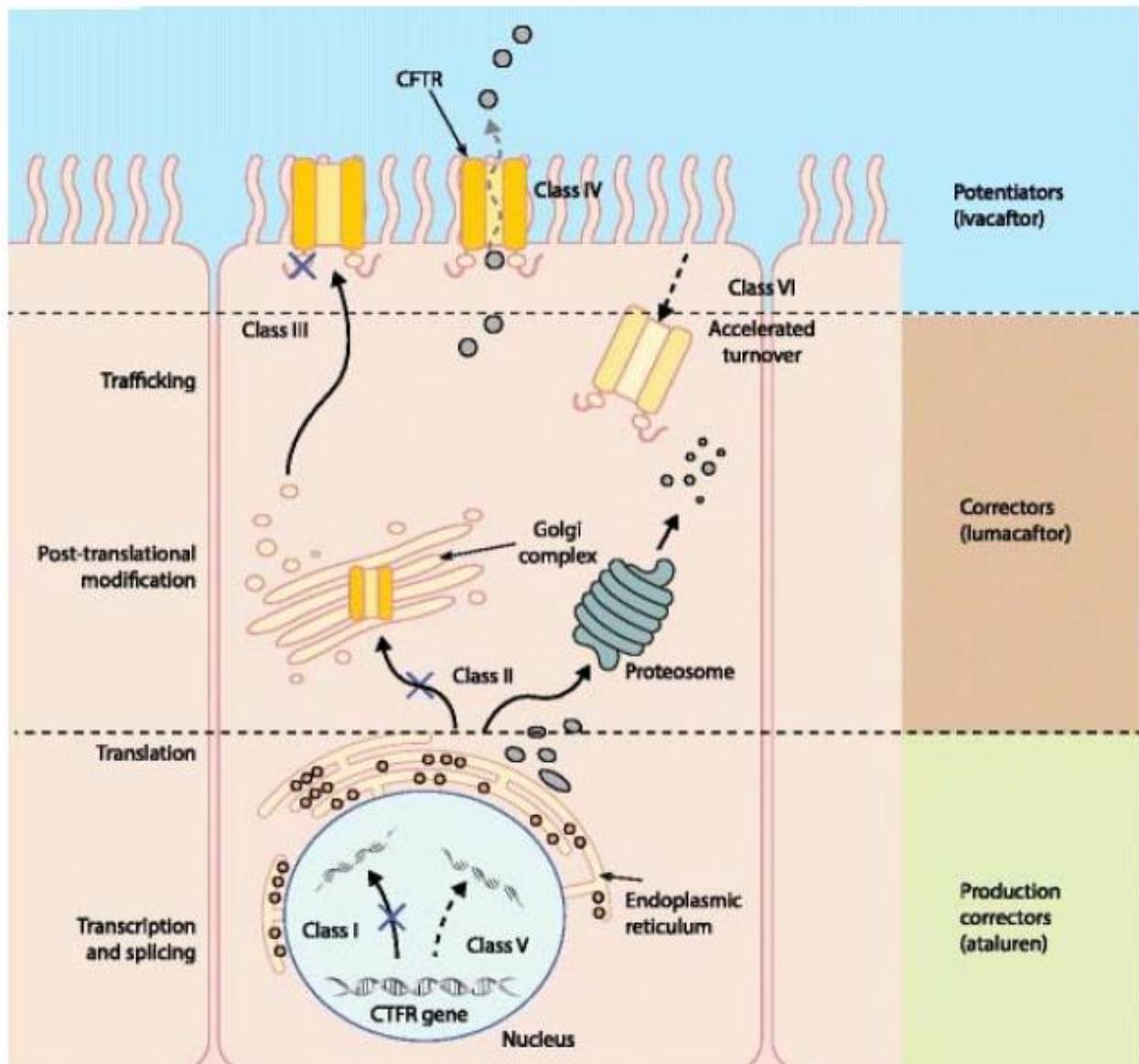
Terapia génica

En **terapia génica**, se ha tarjeteado el pulmón por su fácil accesibilidad. Diversos métodos como vectores virales o liposómicos, complicaciones con la hidratación del moco y la inflamación.

La fibrosis quística es un proceso progresivo. La terapia génica tiene una **ventana terapéutica**, un periodo de tiempo en el que el niño puede ser tratado. Las desventajas del pulmón es que el moco espeso impide la entrada de partículas virales.

Terapias específicas de mutación

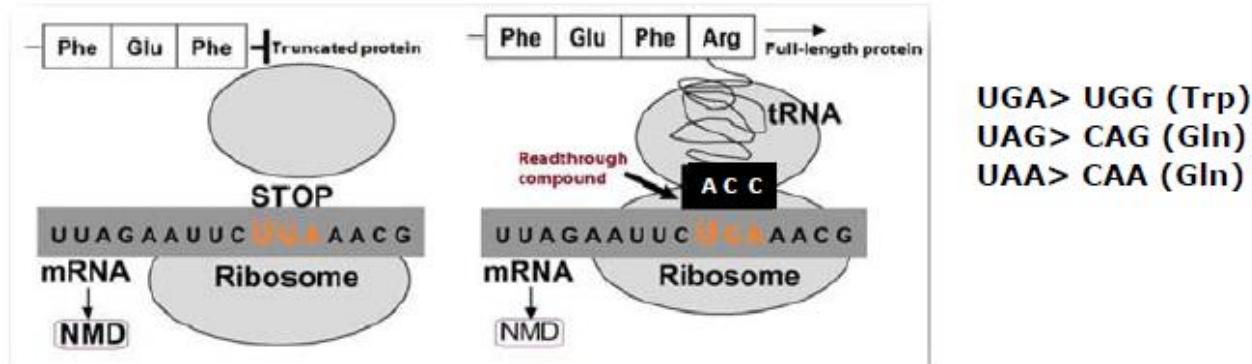
Como ejemplo de enfermedad en la que conociendo el mecanismo molecular se le aplica una terapia u otra (medicina personalizada o de precisión). Varios de ellos están asociados a su uso en pacientes.



Mutaciones de clase I

Drogas supresoras de la terminación. Permiten leer a través de un codón de parada, son denominadas readthrough drugs.

Cuando el ribosoma llega a un STOP codon, entran RFs. Determinadas drogas se unen al ribosoma promoviendo la lectura de UGA como UGG, UAG como CAG, UAA como CAA. Modifica la conformación del ribosoma, de manera que permite que se lea a través de ese codón de parada de la traducción.



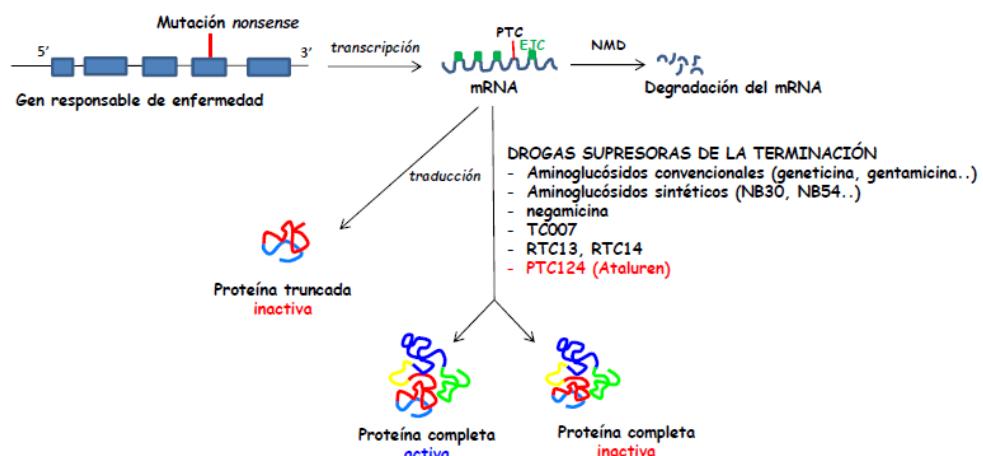
De esta manera, se introducirá un aminoácido y podremos tener una proteína truncada original o no. Esto se descubrió por casualidad. Los pacientes tienen infecciones recurrentes que se tratan con aminoglicósidos. Estos pacientes no solo curaban la infección, sino que había un porcentaje que mejoraban los síntomas de la enfermedad a nivel respiratorio.

Mediante estudios in vitro, se provocaban que se produjese algo de proteína de tamaño normal y funcional.

Cuando hay una mutación non-sense, a la célula no le interesa sintetizar proteínas truncadas prematuramente. El mecanismo NMD le ayuda a la célula a prevenir esto. Cuando el mRNA sufre el proceso de splicing, en las uniones exón-exón se depositan unas proteínas que producen el EJC (exon junction complex), unas marcas que marcan las uniones exón-exón.

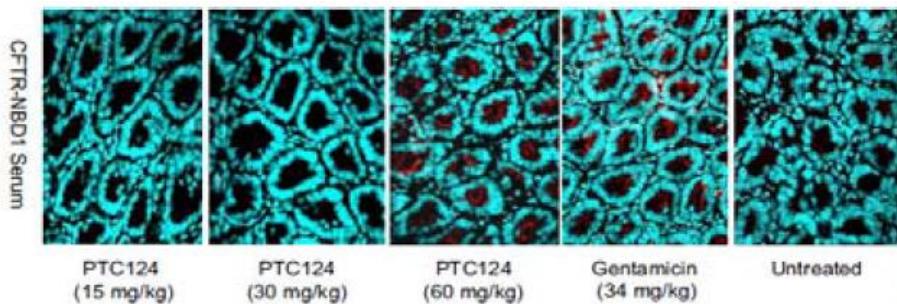
En el citoplasma, sufre una primera ronda de traducción de "escaneo". Si en esa primera ronda se detecta un codón de parada prematuro que tiene EJCs por detrás, se reconoce como un codón de parada, se da la liberación del ribosoma y no se quitan los EJCs.

Cuando se detecta un PTC (premature termination codon), el mRNA es degradado. La célula no permite que prosiga la traducción por el mecanismo NMD (non-sense mediated mRNA decay).



Algo de proteína truncada sí que se puede sintetizar, que sería inactiva (no es totalmente eficaz).

Las drogas de readthrough permiten la introducción de un aminoácido en lugar del codón de parada prematuro.



A partir de los aminoglucósidos convencionales, se pensó en usarlos como un tratamiento crónico. Pero producen ototoxicidad y nefrotoxicidad. Otros compuestos investigados son aminoglucósidos sintéticos y high-throughputs screenings. Se busca que haya actividad de la proteína. Se han encontrado varios compuestos. Su estructura no tiene nada que ver con los aminoglucósidos y el mecanismo de acción tampoco.

El que ha llegado a la clínica es el PTC124 (premature termination codon 124) o Ataluren. Se toma de forma oral.

Mutaciones de clase II y III.

Uso de correctores, que aumentan la translocación a membrana. Los potenciadores producen una potenciación de la función del canal.

Los correctores permiten mejorar el tráfico e impedir que la proteína se degrade por el proteosoma:

- Se usan inhibidores de proteosoma
- Inhibidores de HDACs, algunos promueven la expresión de chaperonas Hsp70 y Hsc70.

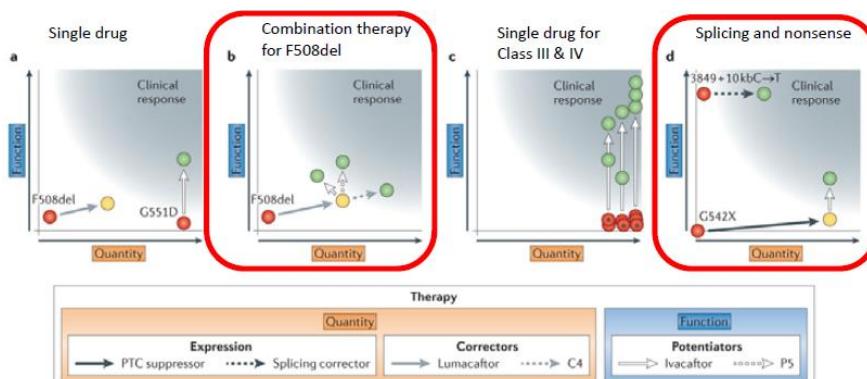
Distintos inhibidores de histonas deacetilasas, que promueven la expresión de genes, si aumentamos el nivel de transcripción habrá más proteínas.

Su modo de acción es disminuir la degradación de chaperonas que llevan al proteosoma.

Los potenciadores o bien aumentan la PKA, inhiben PDE o interaccionan directamente con el canal y promueven conformación más abierta.

Se están intentando tratamientos combinados:

- Usando un compuesto corrector y un activador promueve que siempre esté activa, dando lugar a una respuesta clínica.
- Para otras mutaciones como non-sense, se puede usar un ataluren + potenciador.



V. Defectos de splicing

Los oligonucleótidos antisentido funcionan en mutaciones que se han visto que no son blanco-negro. El splicing requiere de una serie de secuencias consenso en las uniones exon-intrón, pero también son necesarias secuencias reguladoras que unen a factores de splicing. Modulando los factores de splicing asociados, podemos modificar el ratio de manera que haya más tránsrito normal.

En mutaciones que crean un sitio de splicing erróneo, podemos tapar un sitio aberrante con un oligonucleótido antisentido.

En la enfermedades raras, no hay suficientes pacientes para hacer un trial clínico. Usando **mini-guts (drug derived organoids)**, haciendo organoides intestinales del paciente se puede ver si el medicamento es eficaz o no.



PATIENT DRIVEN ORGANOIDES (MINI-GUTS) FOR DRUG TESTING IN CF

Miniature body parts

Organoids, lab-grown miniature versions of organs, are transforming science and medicine. Researchers have grown them from many different organs; they have also created organoids from tumor cells to mimic cancers.

What to do with organoids

Scientists can use organoids in many different ways. Here are examples of current and potential applications in basic research and medicine.



Regenerative medicine

Organoids grown from healthy tissue could be placed back into a patient to help repair damaged tissue.



Drug testing

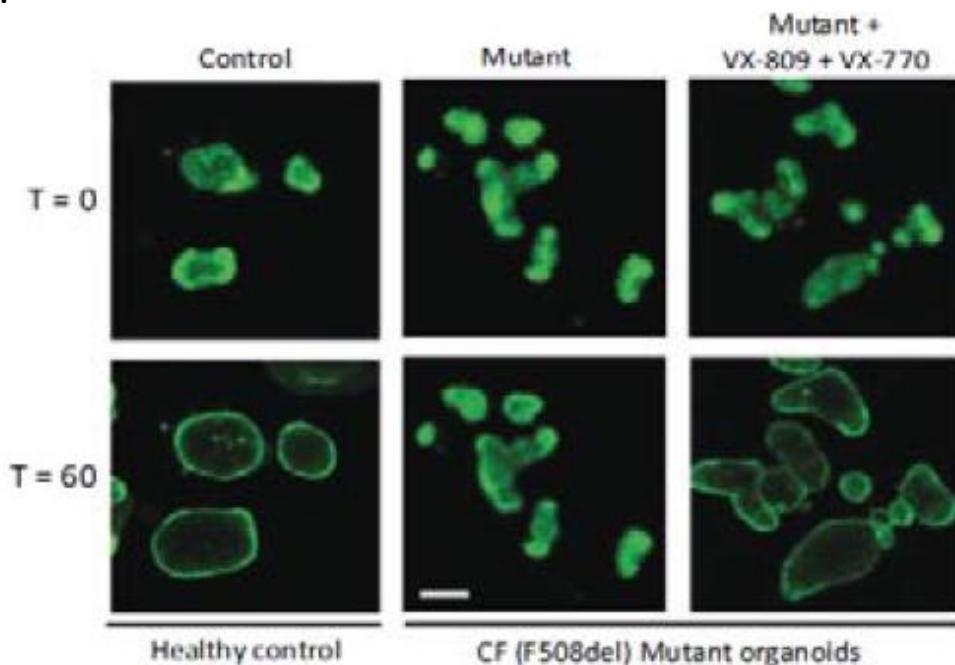
Candidate drugs can be tested on organoids to help predict their effects in patients.



Personalized medicine

Organoids grown from individual patients can help predict their response to new or existing drugs.

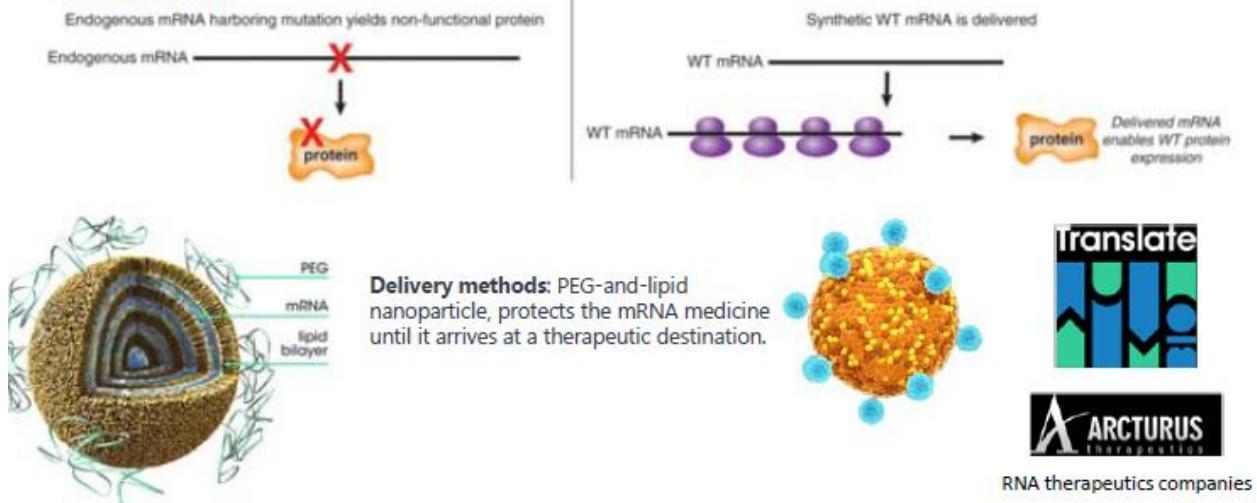
Haciendo una bipsia rectal, se prueban. Se hinchan si se estimulan con forskolina pues entran cloro por CFTR. Si no hay swelling, no hay CFTR. Si se da un corrector, guay. Si sus células responden, entran dentro del supuesto de que pueden ser tratados con estos medicamentos, muy caros.



También se está tratando con mRNA. Se hace terapia de reemplazo con el mRNA. Se utilizan distintas partículas nanolipídicas. Se está investigando mucho en esto porque el delivery es inhalado y va bien, es sencillo.

Como ventajas, **en lugar de la proteína, entra el mRNA**. Un problema es la vida media del mRNA, y una manera es hacerlo circular para evitar exonucleasas.

C mRNA Therapy



ARTICLE

DOI: 10.1038/nature17096 OPEN

Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells

R. Alexander Wiesathoff^{1,2}, Petr S. Kowalik³ & Daniel G. Anderson^{1,3,4,*}

COMMUNICATION

Gene Delivery

Inhaled Nanoformulated mRNA Polyplexes for Protein Production in Lung Epithelium

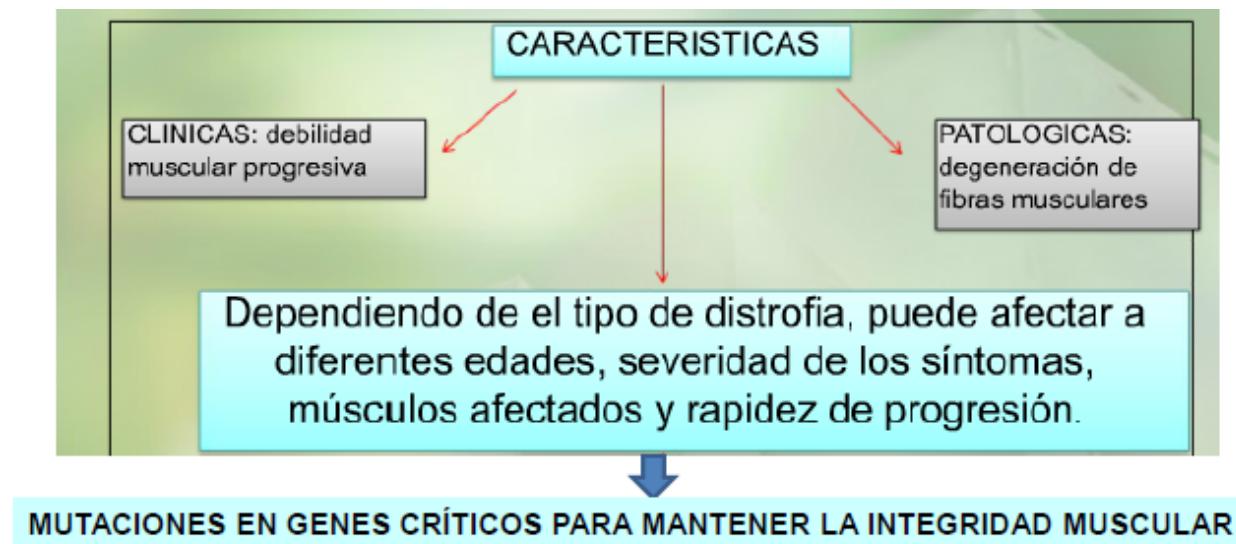
Asha Kumari Patel, James C. Kaczmarek, Suman Bose, Kevin J. Kauffman, Farayil Mit, Michael W. Heartlein, Frank DeRosa, Robert Langer, and Daniel G. Anderson*

ADVANCED MATERIALS

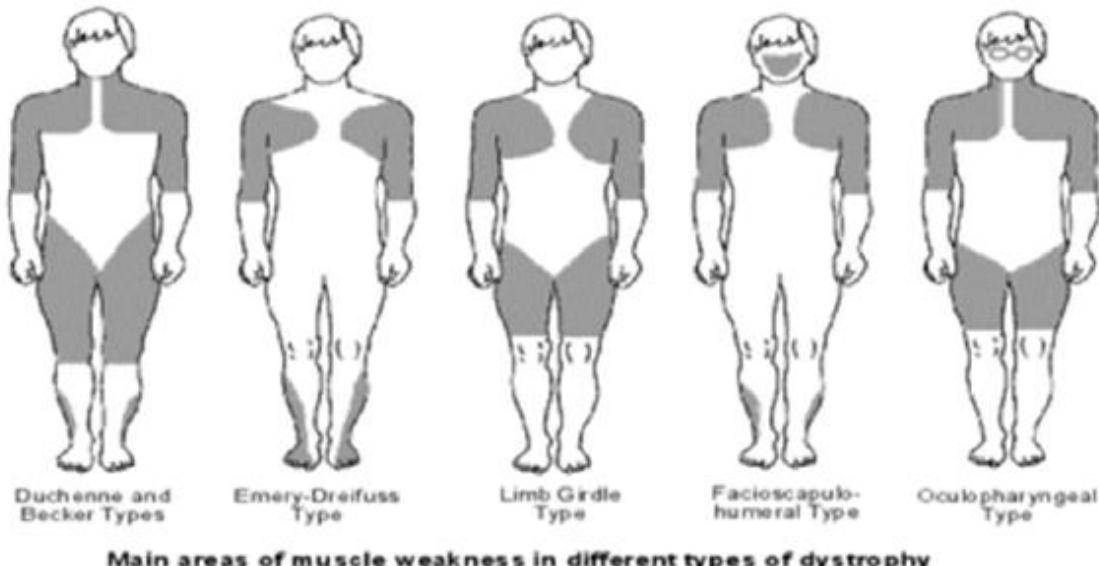
www.advmat.de

Distrofias musculares

Tienen una gran heterogeneidad. Todos convergen en una sintomatología común: debilidad y degeneración de las fibra del músculo esquelético, progresivo y congénito. El origen de la enfermedad puede estar a nivel de una proteína estructural, a nivel de un mRNA con ganancia de función, conformación de la cromatina...

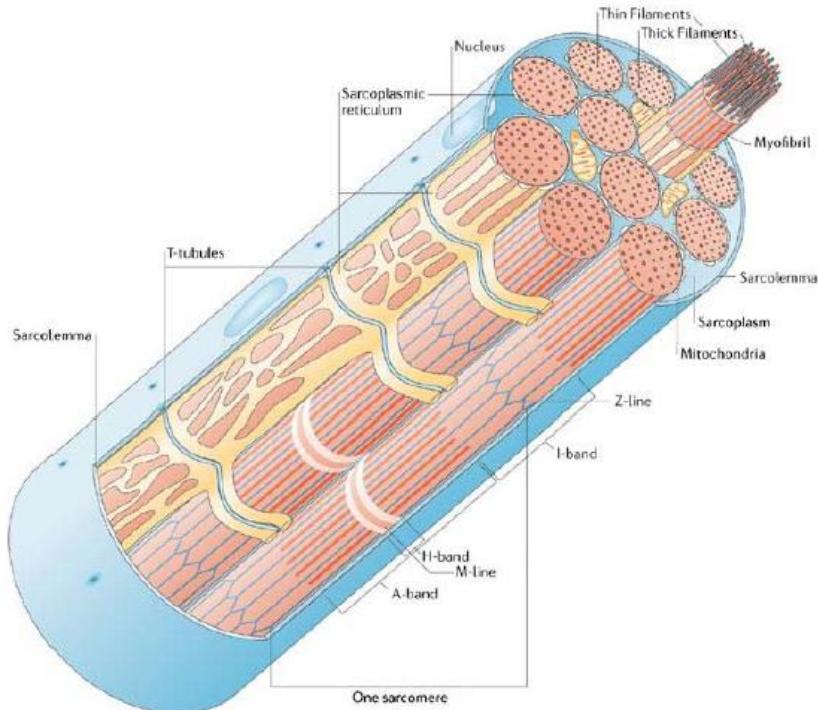


Todos estos genes van a ser críticos para mantener la integridad muscular. Son más de treinta patologías diferentes. A nivel clínico se puede distinguir inicialmente una patología de otra.

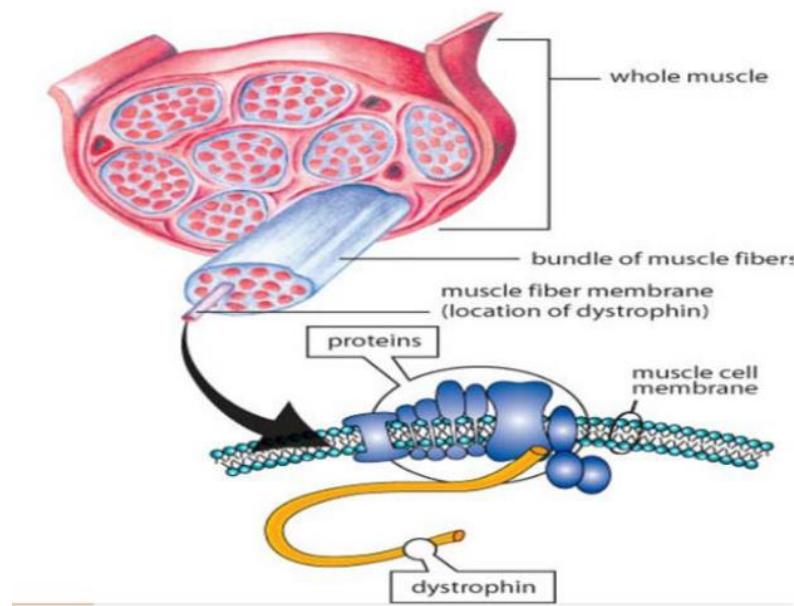


El tipo de herencia puede ser de cualquier tipo. El periodo de función normal puede aumentar. Afectan a grupos musculares característicos, el nombre a veces hace referencia a ello.

La fibra muscular es un sincitio de forma fusiforme, siendo multinucleada. El sarcoplasma es continuo y su membrana es el sarcolema. Las fibras de actina y miosina dotan de contractibilidad.

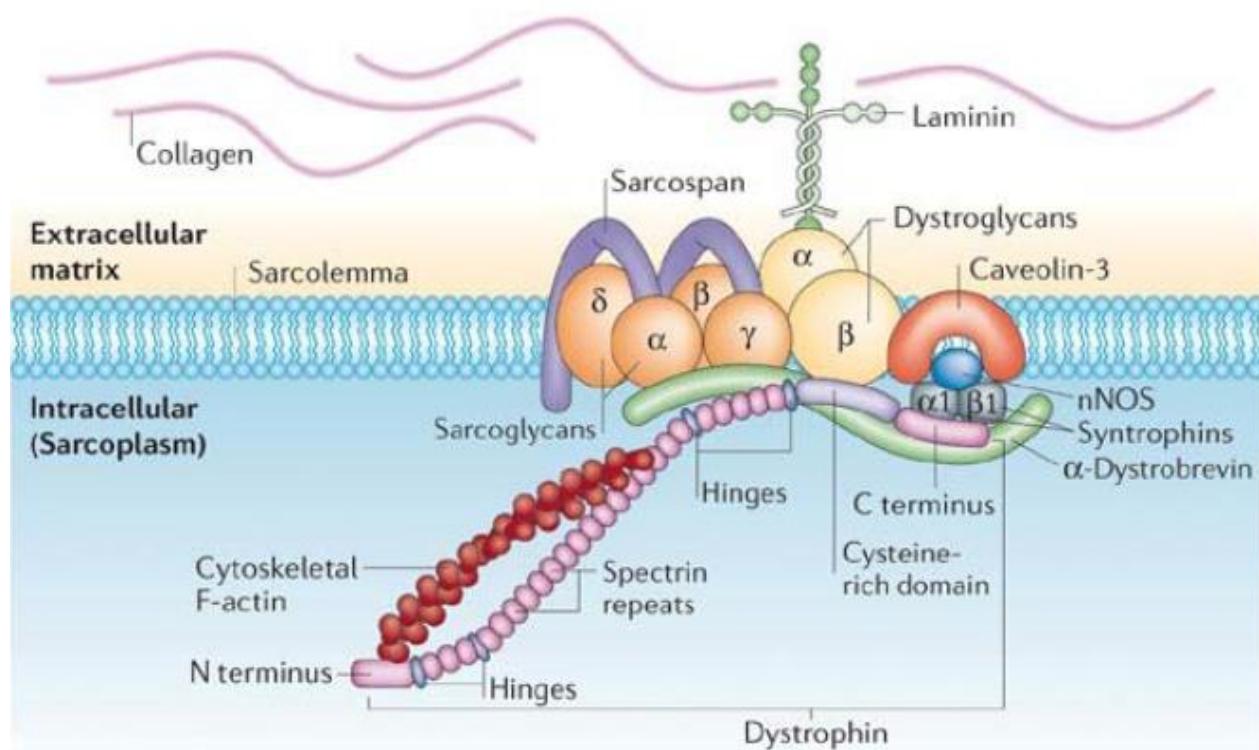


En la fibra muscular es importante el estrés mecánico y químico, produciendo una contracción y relajación. Cualquier célula que está sometido a eso tienen un estrés a nivel de membrana. Para mantener la integridad de la membrana, el complejo distrofina-glicoproteínas va a mantener la integridad de la membrana.



La distrofina está interaccionando con una serie de proteínas de anclaje en la membrana, glicoproteínas. Esto dota de la flexibilidad. Estas proteínas de membrana están interaccionando con proteínas de la matriz. Si falla alguno de estos componentes: la membrana se rompe y degenera la fibra muscular. Defectos en proteínas estructurales fue lo primero que se vio cuando se caracterizaron.

La distrofina es crítica, interaccionando con la actina y con las proteínas de membrana: sarcoglicanos (α , β , δ y γ) y dystroglicanos (α y β) que interactúan con proteínas de la matriz.



Bases Moleculares de la Patología

Distrofias musculares – 23-04-2019

La **distrofia muscular de Duchenne** está provocada por la **falta de distrofina**. La muscular de Becker tiene que ver con una disminución de las repeticiones de tipo espectrina en la proteína.

Distintos mecanismos patogénicos son capaces de producir una distrofia. **Hay distintos tipos de herencia que se explican por los distintos mecanismos patogénicos.** No sólo afectadas están proteínas estructurales, sino que hay defectos de enzimas, RNA con propiedades anormales, epigenéticos...

Las **distrofias** se pueden clasificar de muchas maneras. La clasificación por la edad usual de aparición son:

- **Aparición infantil.** Cuando los niños comienzan a andar y correr, **se degeneran las fibras por el esfuerzo. 3 o 4 años.**

Otras distrofias de aparición infantil

Distrofia de Emery-Dreifuss

Los **síntomas son muy solapantes**. La edad de **aparición es un poco más tardía que la Duchenne**. Aparte de **andar en puntillas y al escoliosis, contracturas, etc** es **muy característico las escápulas deformadas (escápulas aladas)**.

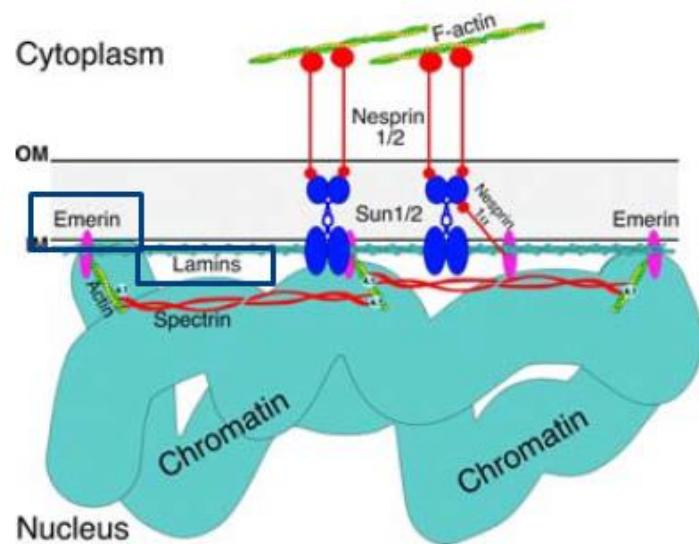
Aparición infantil (10 años)

DISTROFIA MUSCULAR DE EMERY-DREIFUSS

Se van desgastando los músculos distales de las piernas y de la cintura escapular. Tienen **problemas cardiacos y respiratorios que conllevan a la muerte**.

El defecto está en la lámina nuclear de las fibras musculares. Las fibras musculares son multinucleares. La lámina que recubre el interior de la membrana tiene un defecto. La lámina nuclear está formada por una serie de filamentos intermedios constituidos por **laminas A, B y C, que mantienen la morfología y estructura del núcleo**.

Gene Symbol	% of EDMD Attributed to Mutations in This Gene
<i>EMD</i>	~61% of X-linked EDMD ²
<i>FHL1</i>	~10% of X-linked EDMD ²
<i>LMNA</i>	~45% AD-EDMD; Unknown for AR-EDMD ¹²



Además, tienen una gran contribución a la regulación de la transcripción y la reparación del daño al DNA, pues la cromatina interacciona en ciertos puntos con la lámina nuclear. Durante la división celular hay una serie de procesos importantes que tienen la lámina nuclear como participante.

La mayoría de los casos de distrofia de Emery-Dreifuss está provocada por una disfunción en la emerina, que interacciona con la membrana y con las laminas. Hay otras causas como mutaciones en el gen LMNA (codificación de las laminas A y C).

El gen de las laminas A y C es un **prototipo de gen en el que mutaciones puntuales en distinto sitio producen fenotipos totalmente diferentes** (distrofia muscular de Emery-Dreifuss, progeria o neuropatías como Charcot-Marie-Tooth, distrofia congénita, lipodistrofia).

HGNC Approved Gene Symbol: LMNA

Cytogenetic location: 1q22 Genomic coordinates (GRCh37): 1:156,052,368 - 156,109,879 (from NCBI)

Gene Phenotype Relationships

Location	Phenotype
1q22	Cardiomyopathy, dilated, 1A Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B1 Emery-Dreifuss muscular dystrophy 2, AD Emery-Dreifuss muscular dystrophy 3, AR Heart-hand syndrome, Slovenian type Hutchinson-Gilford progeria Lipodystrophy, familial partial, 2 Malouf syndrome Mandibuloacral dysplasia Muscular dystrophy, congenital Muscular dystrophy, limb-girdle, type 1B Restrictive dermopathy, lethal

Estas mutaciones afectan a regiones o a zonas de la proteína que sirven de anclaje o de interacción con otras proteínas, **siendo el fenotipo muy diferente.**

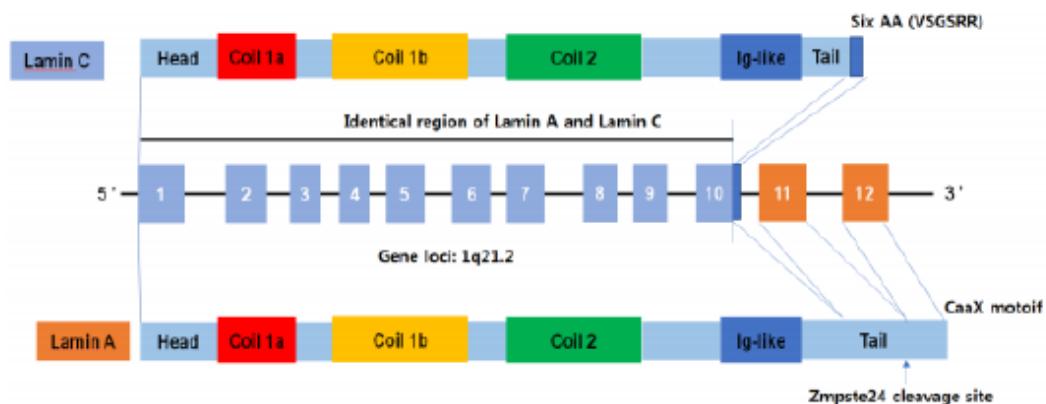
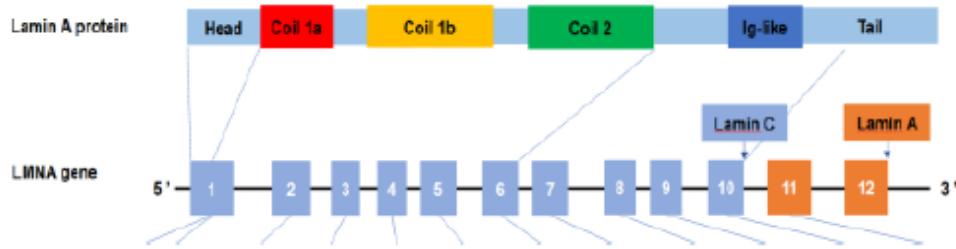
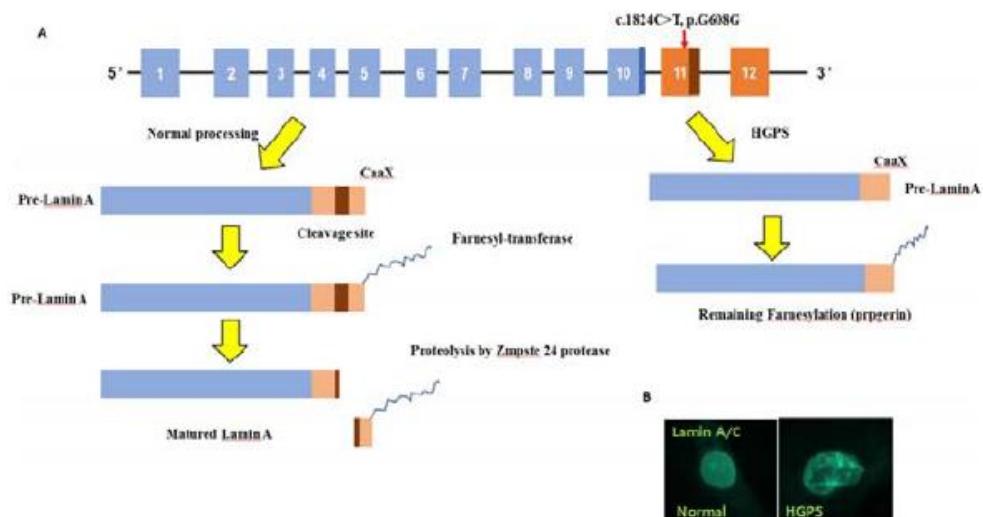


Fig. 1. Structure of LMNA gene. LMNA, encoding Lamin A/C is composed of 12 exons and the two produced proteins, Lamin A and Lamin C. Exon 1-10 are commonly used for Lamin A and C proteins. However, exon 11 and 12 are only used by Lamin A. Since the end of exon 12 encodes CaaX motif (actually CSIM), only Lamin A is a target for farnesytransferase. In addition, the Zmpste24 protease target sequence is located in exon 11. Thus, Farnesylated Lamin A (prelamin A) is processed into mature Lamin A. Lamin C is produced by Exon 1-10 differentially from Lamin A. However, the final exon is differentially used from Lamin by alternative splicing (dark blue box in middle panel). Consequently, the six C-terminal amino acids (VSGSRR; dark blue box) are uniquely derived from Lamin A/C.



Las laminas A y C se diferencian en el extremo C-terminal. En la prelamina A hay en el C-terminal una secuencia que le permite farnesilarse y procesarse en membrana hasta la membrana.

En progeria de HG se produce un splicing alternativo que deja la señal de farnesilación pero no el sitio de corte de la proteasa. Así, siempre está anclada a membrana y no se pueden formar los filamentos intermedios, teniendo núcleos de forma anormal.



Uno de los tratamientos es buscar **inhibidores de la farnesilación**: Lopez Otin

Distrofias musculares congénitas

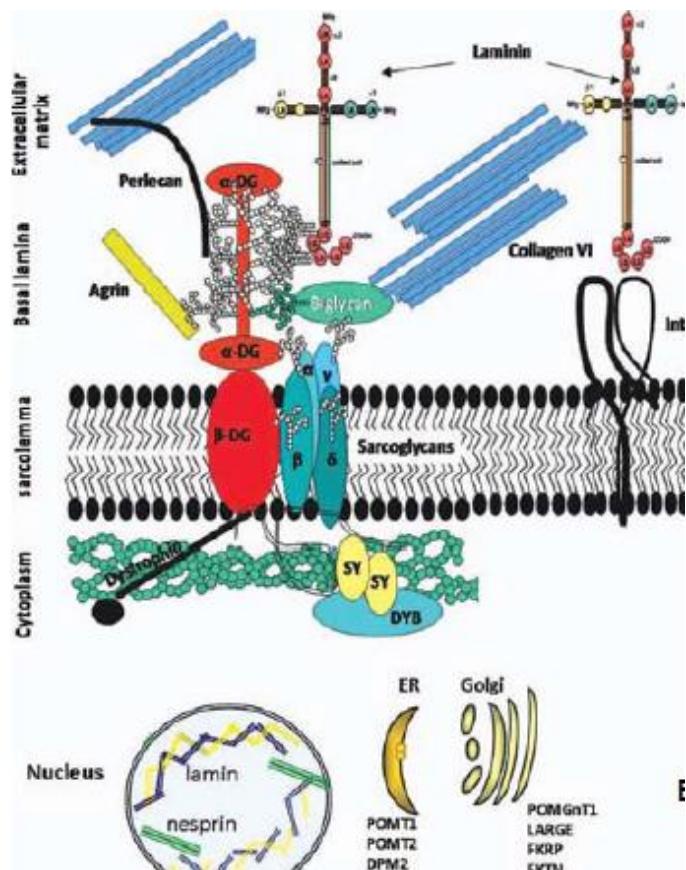
Grupo heterogéneo, las más comunes:

- Defectos implicados en la glicosilación de proteínas en el RE y el Golgi, distoglicanos α y β . Se producen distroglicanopatías secundarias, por falta de manosil transferasas o farnesil transferasas, por ejemplo.
- Defectos en genes estructurales de la matriz extracelular, como la merosina o el colágeno VI.
- También hay defectos en proteínas de la envoltura nuclear como la nesprina y lamina.

En general, la esperanza de vida es corta.

Cursan con distrofia muscular y MEB (muscle-eye-brain) disease en muchos casos.

Así, tenemos mezcla de proteínas estructurales como (colágeno o merosina) o enzimas. El espectro de síntomas así es más amplio, pudiendo llegar a afectación neurológicas.

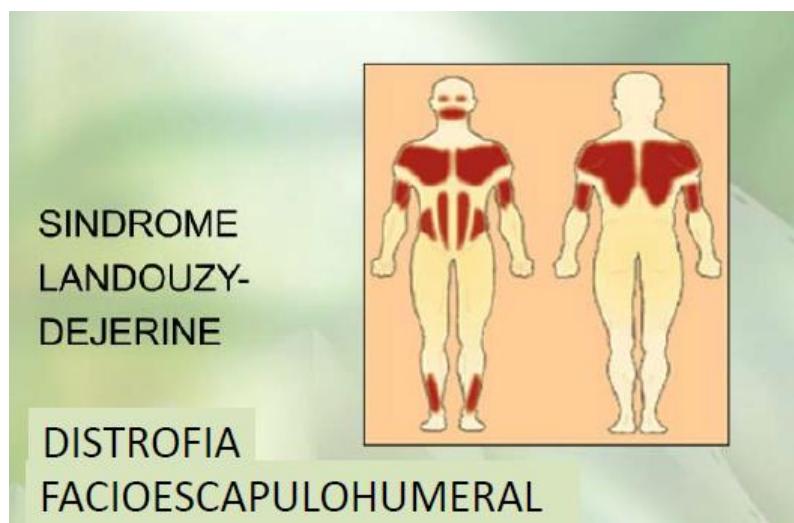


Distrofias juveniles

A partir de los 20 años aprox.

Distrofia facioescapulohumeral y de cintura pélvico-escapular

En la distrofia facioescapulohumeral, no se pueden mover los músculos de la cara (imposibilidad de silbar o inflar globos en la infancia), tenemos otra vez escápulas aladas por debilidad y deformidad de la cintura escapular.

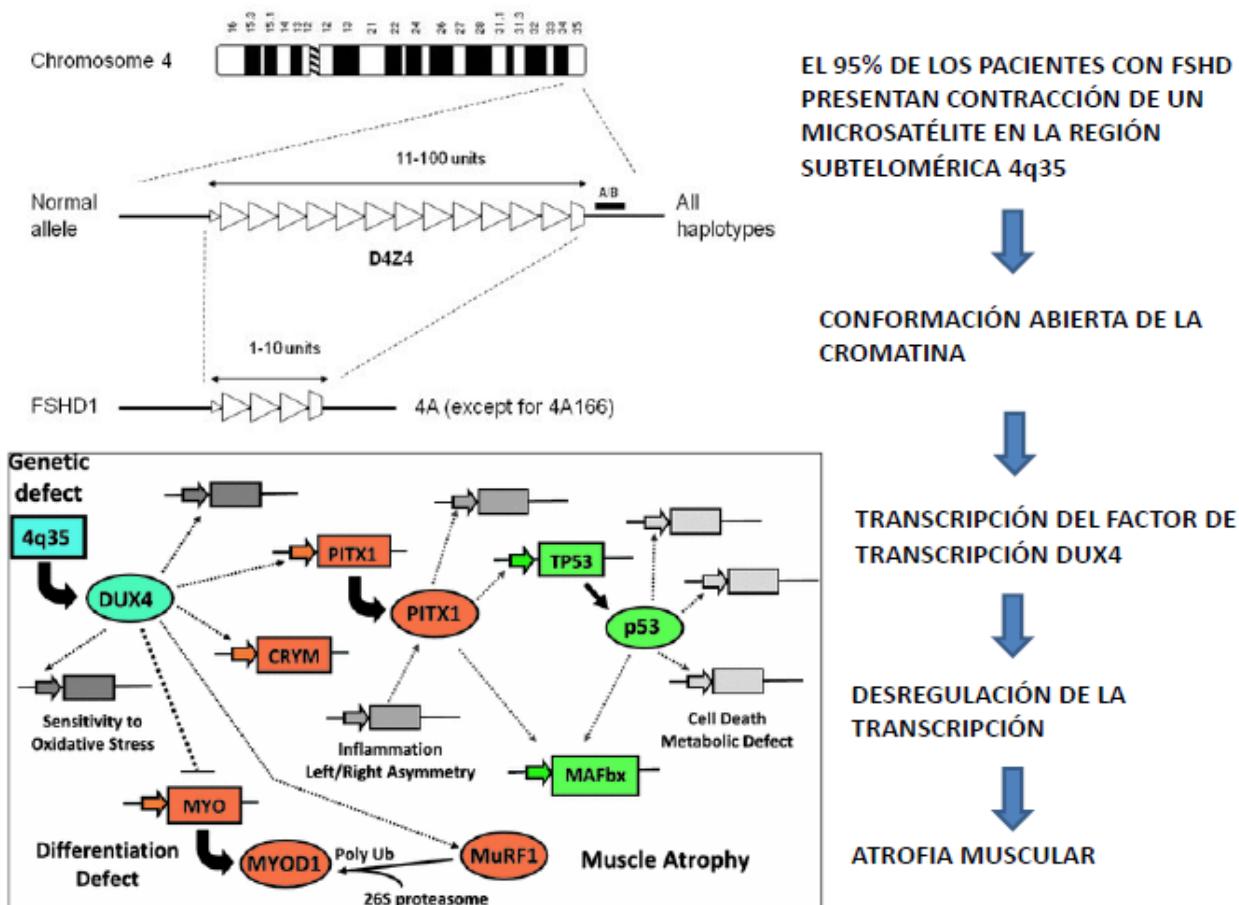


Es una enfermedad **muy incapacitante**, algunos de los pacientes acaban con grandes problemas de movilidad, **pero no es mortal**.

Es un defecto a nivel de la configuración de la cromatina. La **FSH de tipo 1, tiene una contracción de un microsatélite en el cromosoma 4q35**. En individuos normales hay hasta 100 unidades, en **pacientes unos 10**. Se altera la configuración de la cromatina en esta región, **de manera que el gen DUX4, un inhibidor de MyoD se expresa más**.

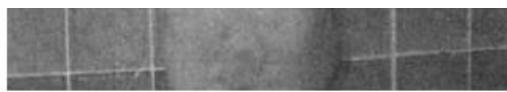
El microsatélite expandido permite que no se exprese DUX4 en las células musculares. DUX4 es una “toxina genética”, pues actúa como factor de transcripción que activa la expresión de muchos genes diferentes:

- Inhibe el gen MyoD
- Activa cascadas de señalización implicadas en apoptosis, degeneración, inflamación, p53

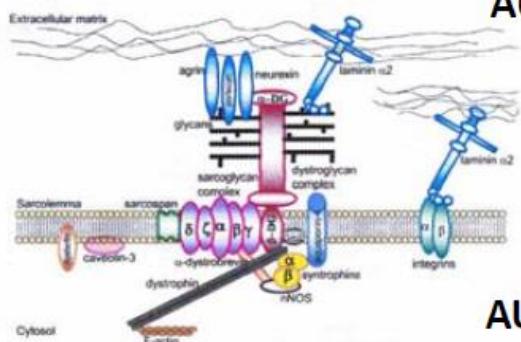


En **FSH de tipo II**, no tenemos este defecto genético, **pero se produce una transcripción de DUX4**. Hay una **hipometilación del gen DUX4**. No se conoce la causa de la hipometilación.

En la distrofia muscular de cinturas (**LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHIES**) están afectadas la **cintura escapular y la cintura pélvica, debilitamientos de los músculos de los hombros y alrededor de las caderas**. Acaban con escápulas aladas, con marcha de pato y andar de puntillas.



Afectadas la cintura escapular y la cintura pélvica, debilitamiento de los músculos de los hombros y alrededor de las caderas



AUTOSOMICAS RECESIVAS:

- **SARCOGLICANOPATÍAS**
- **CALPAINOPATÍA**
- **DISFERLINOPATÍA**

AUTOSOMICAS DOMINANTES



Estamos ante una **enfermedad de etiología múltiple**:

- **Dominantes.** Defectos en el gen **LMNA**, de las **laminas A y C**, **caveolina** (proteína de caveolas, invaginaciones de membrana).
- **Recesivas.**
 - Defectos en los **sarcoglicanos (α, β, δ y γ)**.
 - Otras proteínas como la calpaina y disferlina (que interaccionan entre ellas). La calpaina es una proteasa, la disferlina está implicada en el proceso de degeneración del daño.
 - **Teletonina (Estructurales) o glicosiltransferasas.**

Entre los de tipo I (dominantes) y tipo II (recesivas), **los síntomas solapan** (como las escápulas aladas, macroglosia, pantorrillas hipertróficas).

Edad adulta

Distrofia miotónica

Es una enfermedad de herencia **autosómica dominante**. Es la segunda más frecuente después de **Duchenne**. Cara alargada. De aparición en la edad adulta.

DISTROFIA MIOTONICA TIPO I

- Enfermedad de Curschmann - Steinert
- MULTISISTEMICA.
- HEREDABILIDAD VARIABLE.
- REDUCCION DE LA MASA MUSCULAR.
- DEFECTO EN LA CONDUCCION DE IMPULSOS CARDIACOS



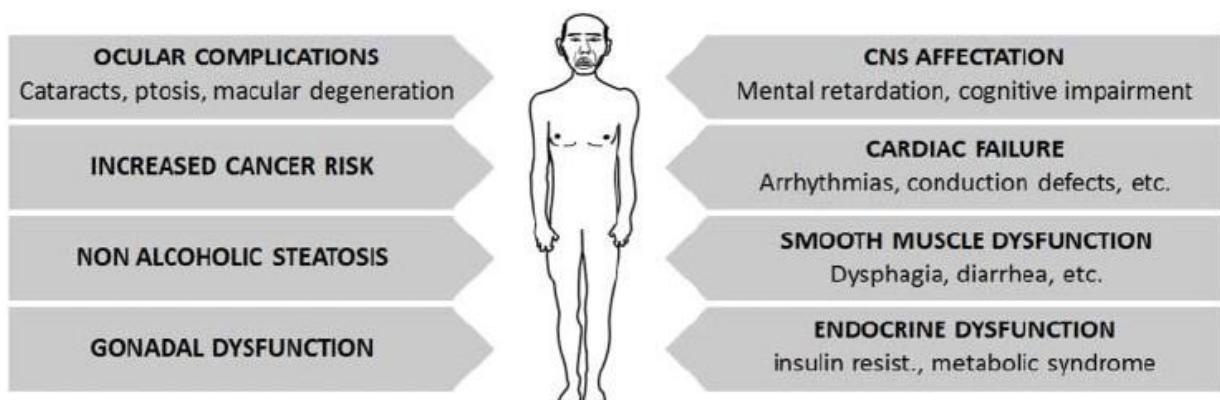
DISTROFIA MIOTONICA TIPO II

- distrofia miotónica tipo II (DMII)
- denominada comúnmente como PROMM, o miopatía proximal miotónica.
- En el tipo II, las manifestaciones son más moderadas o incluso ausentes que las de tipo I.

| Myotonic Dystrophy



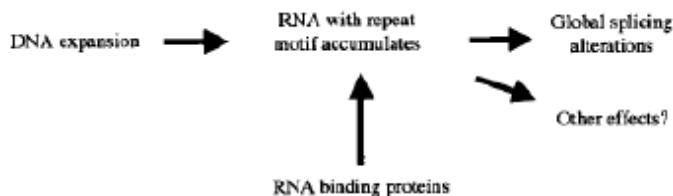
DISTROFIA MIOTONICA: enfermedad multisistémica, que se asemeja a un síndrome de envejecimiento prematuro (progeroide)



Es una **expansión de tripletes inestables**. La expansión de generación en generación va aumentando el número de tripletes, **aumentando la severidad de los síntomas y el onset**. Así, podemos tener **fenotipos congénitos**.

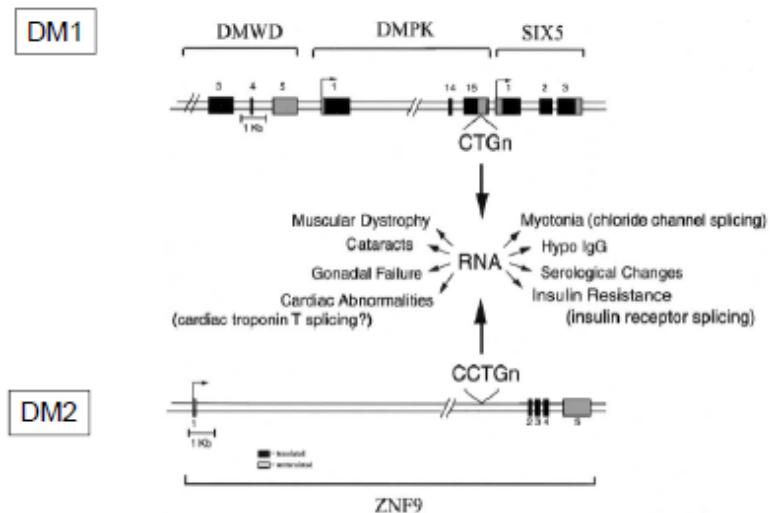
Afecta a distintos órganos y procesos. Se caracteriza por debilidad muscular aparente y defectos a nivel cardíaco.

Es un “tipo de envejecimiento prematuro”, **por implicaciones oculares, mayor riesgo de cáncer, esteatosis hepáticas, disfunción gonadal, cierto retraso cognitivo, defectos a nivel cardíaco, defectos a nivel de señalización de insulina, etc.**



Es causada por una **ganancia de función de un RNA**. A diferencia de en la ataxia de Friedrich, que la estructura se forma en el DNA, se produce una estructura a nivel de RNA.

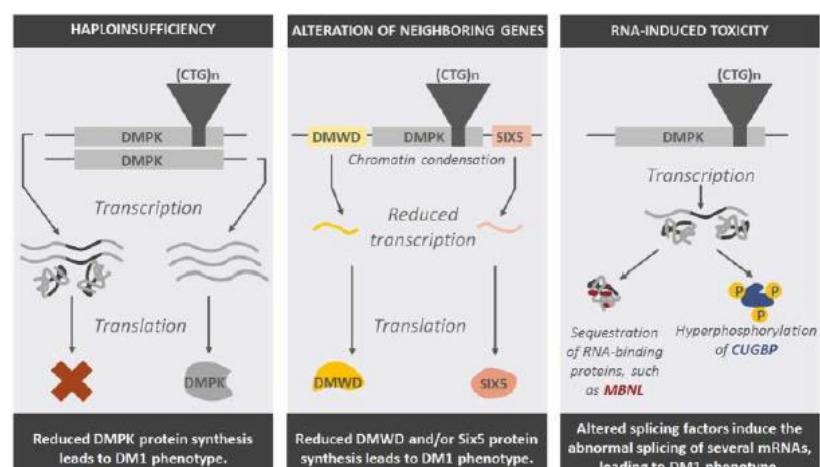
El triplete CTG está en una región intrónica no codificante. Tenemos un RNA con una expansión masiva de estos tripletes. Este RNA adquiere una estructura que es capaz de secuestrar **proteínas de unión a RNA**, **produciendo una ganancia de función** (entre ellas, factores de splicing, produciendo anomalías a nivel de splicing en la troponina T, insulina, alteraciones en el splicing de una serie de canales de cloro implicados en la transmisión del impulso nervioso...). Una también factores reguladores de la traducción etc.

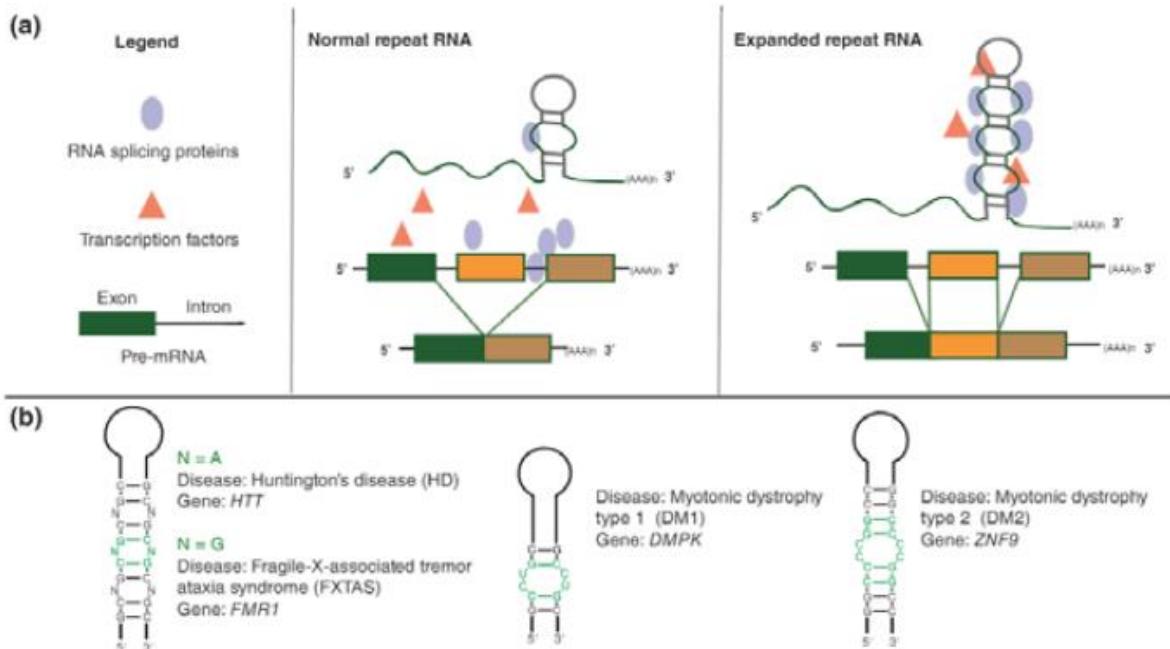


El mecanismo principal es una toxicidad del RNA con la expansión masiva, secuestrándose proteínas de unión a RNA, pero podría haber contribución de otros mecanismos. Los genes adyacentes disminuyen su transcripción, probablemente por cambio en la cromatina.

El propio gen tiende a agregar, teniendo menos proteína, produciéndose una haploinsuficiencia.

Tiene un mecanismo de anticipación.





Distrofia oculofaringea

Expansión de polialanina, en la PABPN1. No pueden tragar, tienen **distrofia oculo(faríngea)**. Los músculos oculares se pueden operar, pero el problema ocurre a nivel deglutivo.

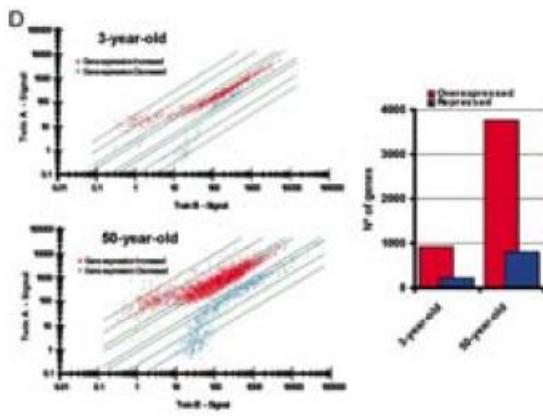


La proteína se une a las colas de poliA, habiendo una expansión de poli alanina en uno de los exones, formándose agregados filamentosos en el núcleo.

Bases Moleculares de Patología II

Enfermedades epigenéticas – 29-03-2019

La epigenética marca cambios heredables que se heredan transgeneracionalmente. Estos cambios no son a nivel de la secuencia del DNA, sino a nivel de determinadas marcas. Estas variaciones epigenéticas explican las diferencias entre gemelos monocigóticos, que marcan diferencias sutiles de fenotipo y comportamiento.



EPIGENETICA

Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins

Mario F. Fraga*, Esteban Ballestar*, María F. Paz*, Santiago Ropero*, Fernando Setien*, María L. Ballestar*, Doloria Helme-Soler*, Juan C. Cigudosa*, Miguel Urioste*, Javier Benítez*, Manuel Bolaño-Chornet*, Abel Sánchez-Aguilar*, Charlotte Ling*, Emma Carlsson*, Pennille Poulsen**, Allan Vaag**, Zarko Stevanović**, Tim D. Spector*, Yue-Zhanna Wu*, Christophe Plazzi*, and Manel Esteller**

Epigenome-wide DNA methylation analysis in siblings and monozygotic twins discordant for sporadic Parkinson's disease revealed different epigenetic patterns in peripheral blood mononuclear cells

Oliver Kast* · Isa Schmitz* · Jürg Tost* · Florence Basato* · Vi Liu* · Pfei Hofmann* ·
Stephanie H. Witt* · Macrelle Rietschel* · Holger Freibich* · Ulrich Wöhrner* ·

Se han hecho estudios a nivel del patrón de metilación en los gemelos, viéndose cómo estos cambios en la metilación se van acumulando a lo largo de la vida de los gemelos monocigóticos.

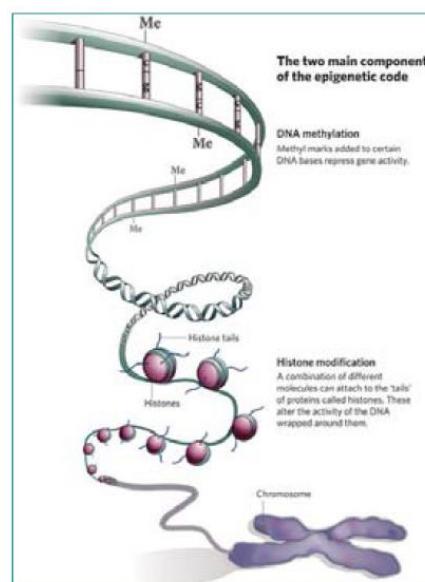
Hay discordancia en enfermedades, etc. Explica también las diferencias sutiles entre animales clonados.

Hay estudios en **gemelos que han sido separados al nacer**, siendo muy valiosos para saber si un **rasgo tiene o no un componente genético o no**. En distintas generaciones, el ambiente será diferente, viendo si el **componente es genético, epigenético y social**.

En general, los efectos **reversibles suelen ser sociales y no genéticos**, aunque la epigenética es un poco reversible. El medioambiente de padres, madres y abuelos pueden modificar el epigenoma de los mismos y parte de esas marcas epigenéticas se pueden heredar.

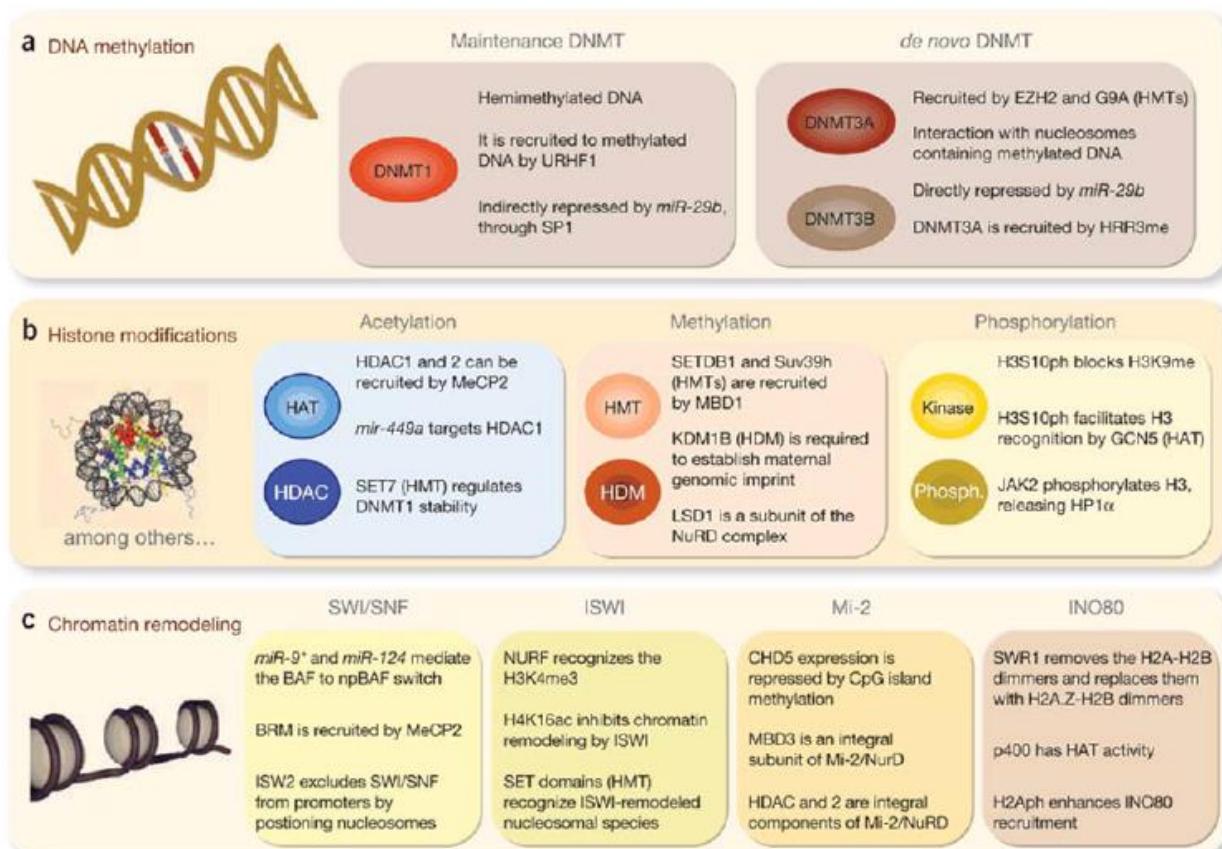
Los principales mecanismos son:

- Metilación del DNA, mayoritariamente a nivel de los dinucleótidos CpG
- Modificaciones de histonas, entre ellas:
 - Acetilación y metilación de histonas
 - Otras como fosforilación y ubiquitinización
- Remodelación de la cromatina. Regula el posicionamiento de los nucleosomas.
- Non-coding RNA, entre ellos miRNA, lncRNA



Factores epigenéticos.

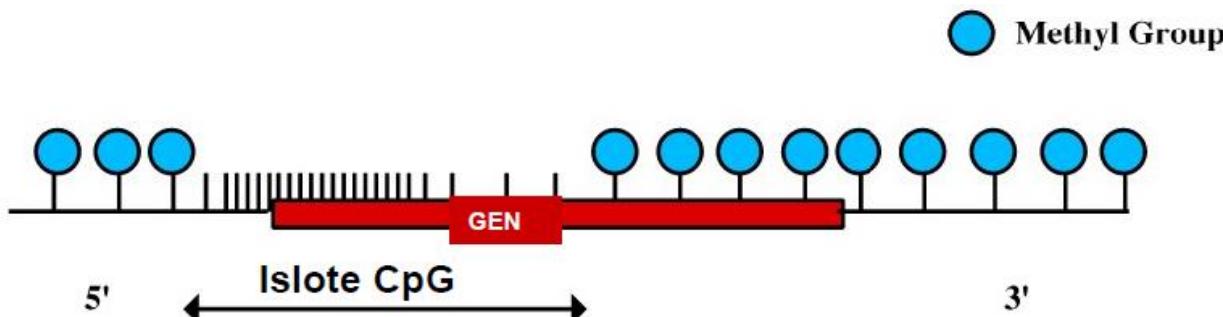
- **Metilación de novo.**
 - DNA metilasas 3A y 3B.
- **Metilación de mantenimiento.**
 - DNA metilasa de mantenimiento, DNMT1, reconoce una **cadena hemimetilada**.
- **Modificaciones de histonas**
 - HAT, HDAC, HMET Y HDMET, **fosforilasas y quinasas específicas**
- **Remodelación de cromatina.**
 - SWI/SNG, ISWI, Mi-2, INO80. Están **interrelacionados con miRNAs, también, por ejemplo.**



Están interrelacionadas entre sí, dando lugar a complejos epigenéticos.

Metilación del DNA

Una parte de las citosinas del genoma está metilada, estando comúnmente aquellas que están en los dinucleótidos CpG. Esos dinucleótidos CpG están al azar repartidos en la secuencia del genoma, pero son muy frecuentes en las regiones promotores de los genes, dando lugar a islotes CpG con una composición C/G de más del 50%, controlando la expresión del gen downstream.

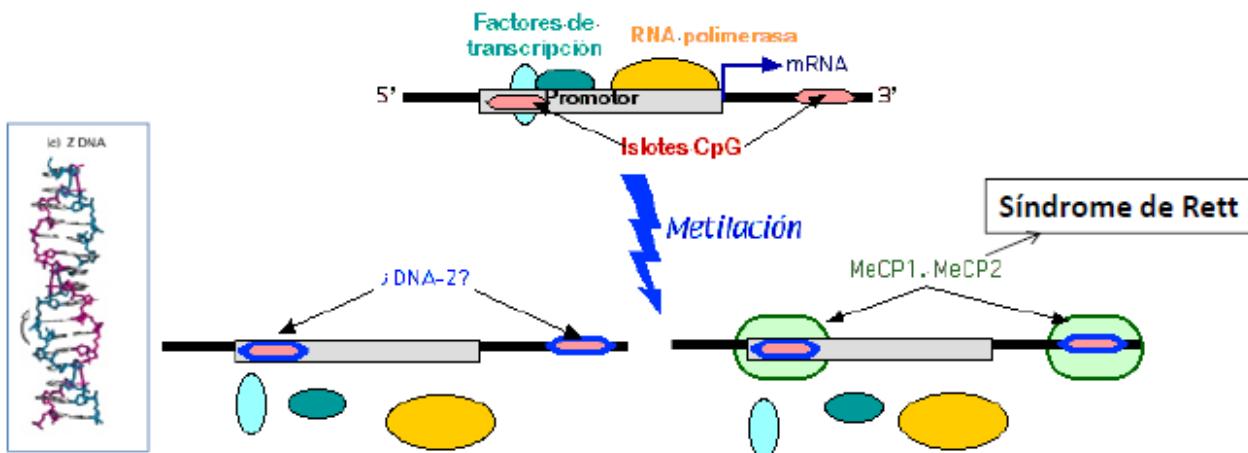


Los genes housekeeping tienen promotores con islotes CpG sin metilar. Cuando los promotores están metilados, no se expresa el gen:

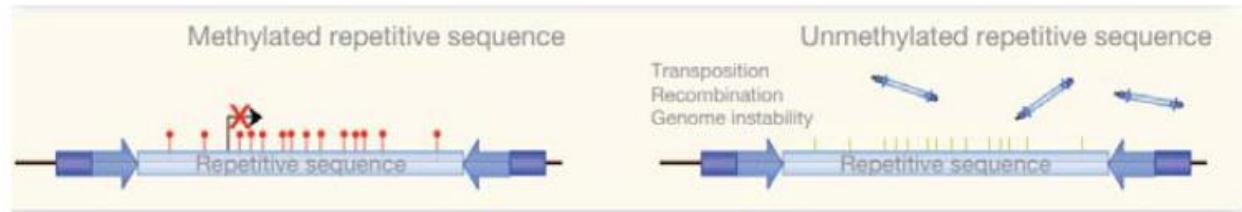
- En el promotor se unen los factores de transcripción y la RNAPol. Si los islotes están metilados, hay determinadas proteínas que reconocen esos CpG metilados y se unen a ellos como MeCP1 y MeCP2, impidiendo la unión de factores de transcripción y RNA polimerasas.
- En la estructura de los ácidos nucleicos, hay alguna otras formas como el DNA-Z, que se observa cuando CG es muy alta. In vivo se ha detectado esa conformación del DNA-Z, asociado a estos islotes CpG.

Esta estructura, una hélice levógira y con otro paso de rosca, puede impedir también el acceso a la RNA polimerasa y a los factores de transcripción.

Ambos mecanismos pueden estar implicados en la regulación de la expresión génica por medio de CpG en los promotores.



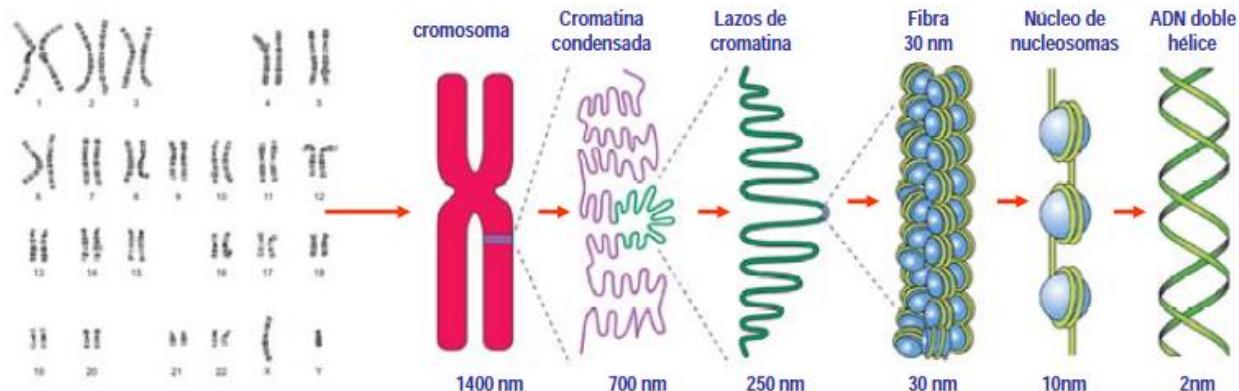
También tiene importancia en **regiones pericentroméricas**, en **regiones transposones**, etc. Estos **elementos transponibles están también metilados y se impide su expresión**. Se puede así, tener un silenciamiento con una configuración de la cromatina cerrada.



Se impide así que los elementos transponibles puedan moverse por el genoma. Cuando ocurre una **desmetilación**, como ocurre en cáncer, los **elementos transponibles saltan** y esto da lugar a una **inestabilidad cromosómica**, muy característica de determinados tipos de cáncer.

Modificaciones de histonas

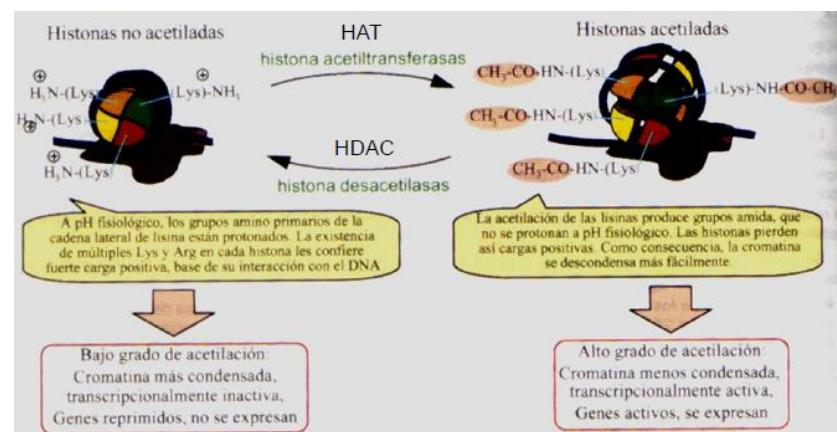
Hay una serie de pasos de **compactación de la cromatina desde la doble hélice, pasando por la de cuentas en rosario o nucleosomas, la fibra de 30 nm, los lazos de cromatina y la cromatina condensada que podría dar lugar a los cromosomas.**



La expresión génica, es decir, que accedan los factores de transcripción sólo se puede dar lugar a nivel de nucleosomas y con un desensamblaje parcial. Esto se consigue disminuyendo la interacción histonas-DNA.

Esta interacción es de tipo **electrostática**, pues las **histonas están cargadas positivamente** y el **DNA negativamente**. Así, habrá una atracción electrostática fuerte. Si se introduce un grupo acetilo en las **lisinas**, la interacción se hace más débil y se puede desensamblar el nucleosoma.

Esto es catalizado por **histonas acetiltransferasas e histonas deacetilasas** que producen una **conformación cerrada**. Así, los genes activos aumentan la conformación abierta.



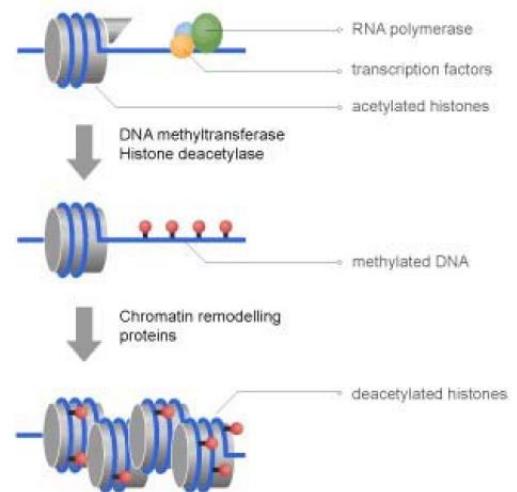
Muchos fármacos son inhibidores de HDAC inhibiendo la desactivación de genes.

Las metilasas de DNA **producen islotas CpG metilados que reclutan a proteínas de unión a CpG que reclutan a su vez a HDACs**. Esto produce que la cromatina esté más o menos accesibles.

La acetilación se suele producir sobre la histona 4.

La segunda **modificación de histonas más importante** es la **metilación**, que dependiendo de dónde se dé tiene efectos contrarios:

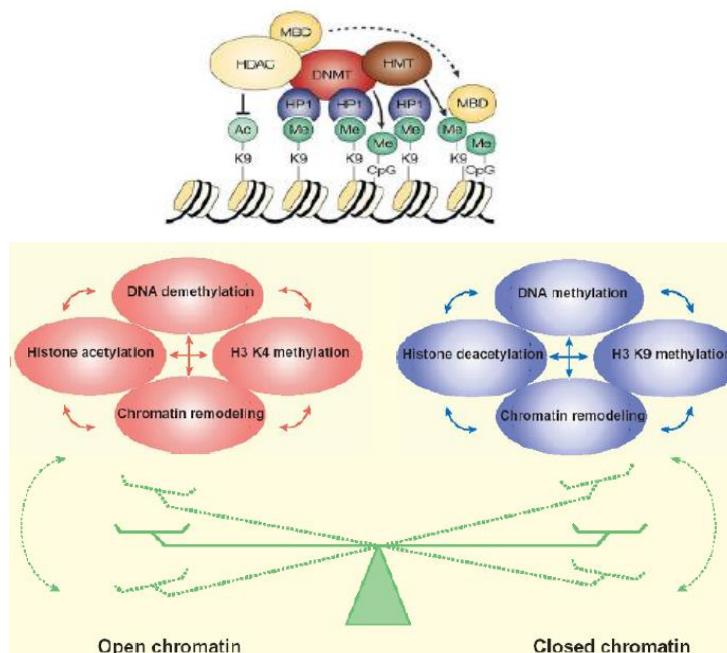
- H3K4me3 es una marca favorecedora de la transcripción
- H3K9me3 y H3K27me3 es una marca desfavorecedora de la transcripción



Histone code

Gene Activation: CpG non-methylated, H4 acetylated, K4H3 di-methylated

Gene inactivation: CpG hypermethylation, H3 and H4 deacetylation, loss of K4H3 methylation, H3K9 methylation and H3K27 trimethylation

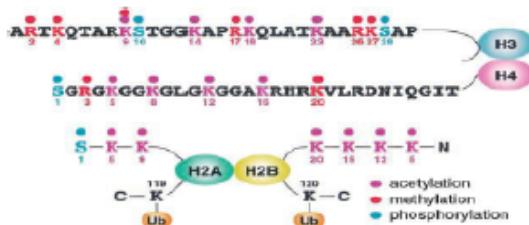


Otras modificaciones de histonas son:

- **Fosforilación.** Están implicados en la **condensación durante la mitosis y la regulación transcripcional**.
- **Ubiquitinación, ribosilación e isomerización tienen también relevancia.**

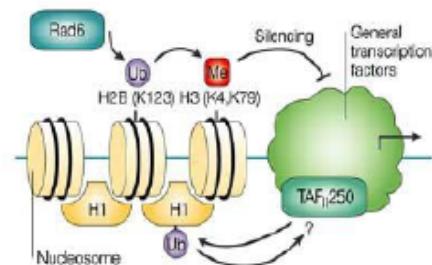
Phosphorylation

Serine and threonine. Involved in chromatin condensation during mitosis and transcriptional regulation of several genes (as c-Myc, c-Jun, c-Fos etc.)



Ubiquitylation

Of lysine H2AK119 by BMI1 (polycomb ring finger oncogene) is involved in transcriptional repression, but does not induces any changes in the structure of nucleosomes.



Sumoylation

Recruitment of SUMO peptide by each of the core histones. Antagonizes acetylation and ubiquitylation. Involved in transcriptional repression.

Ribosylation

Mono or poly-ribosylations of lysines by MART or PARP. Involved in DNA double-strand-breaks reparation and, probably in gene transcription.

Isomerization

Cis-trans of prolines. Co-operates with lysine methylations (Kouzarides, 2007).

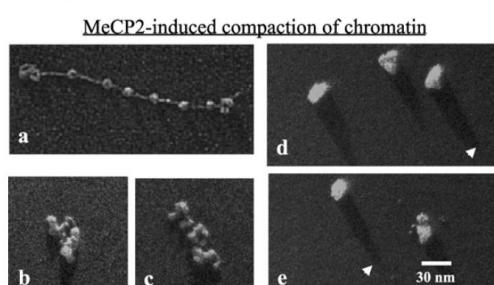
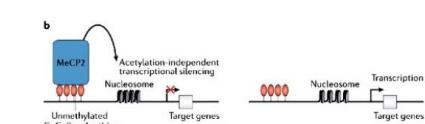
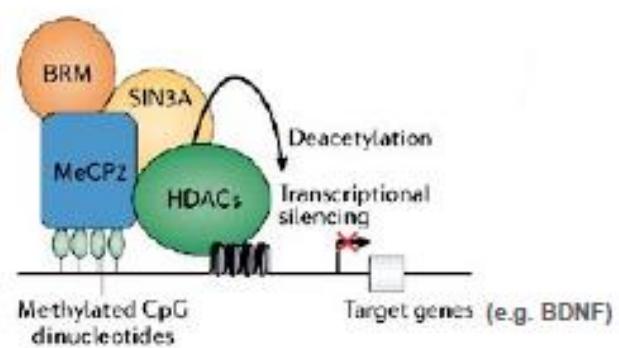
Epigenética y patología

Síndrome de Rett

Es una de las causas más frecuentes de retraso mental y de desarrollo en niñas. Se considera ligada al X dominante. Son mutaciones en el gen que codifica para la proteína MeCP2, que reconoce CpG en promotores.

Hay varones en los que se produce una duplicación del locus.

En niñas, tienen un nacimiento y desarrollo normal, adquiriendo las habilidades motoras normales. Se pierde el habla que se tenía, las habilidades motoras, se produce una microcefalia. Se dan movimientos estereotípicos, llantos, gritos, ataxia, temblores. Algunas sobreviven a edad adulta y otros mueren incontrolados.



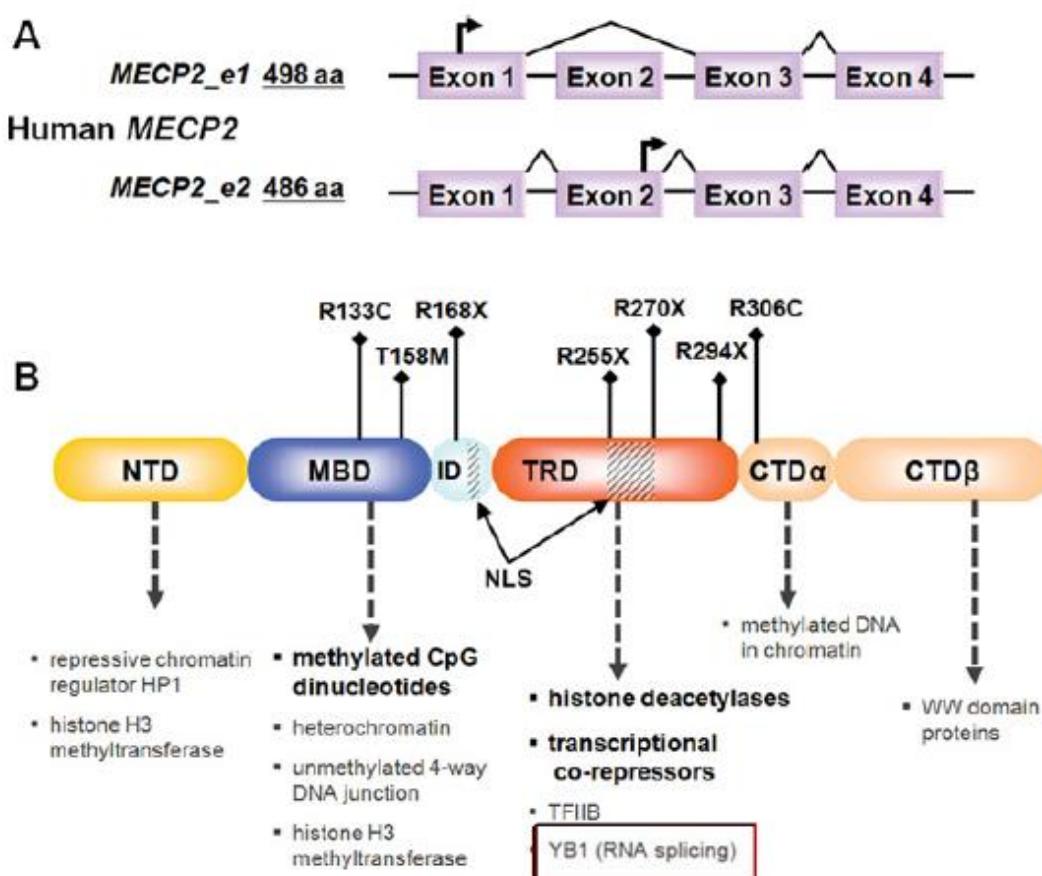
Las mutaciones causantes son **mutaciones de novo** que se dan sobre todo en los espermatozoides.
Las mutaciones suelen ser:

- **Stop.**
 - Las **citosinas metiladas** cuando sufren una desaminación espontánea pasan a timina. Esto es una mutación espontánea, que ocurre en el DNA. Se piensa que en el **síndrome de Rett** ocurren estos cambios a nivel de espermatogénesis masculina porque son citosinas que están metiladas, pasando a timina.

Se fija la mutación y se da un cambio de arginina por un codón de parada.

En hembras, habría una **metilación diferencial** entre varones y mujeres en el gen. En mujeres, pasaría a uracilo y es reparado por los BER, pero en hombres se pasa a timina y la mutación no es detectada.

Es por ello que se piensa que hay muchos menos niños que niñas.



> 600 mutaciones patogénicas, 8 comunes, frecuentes las grandes delecciones y también hay duplicaciones del locus

MeCP2 se une a promotores donde hay metil CpG y recluta a **HDACs** que desacetilan el DNA pasando a una conformación más cerrada y compacta dando lugar a silenciamiento génico. **Comportamiento neurológico. Fenotipo neurológico.**

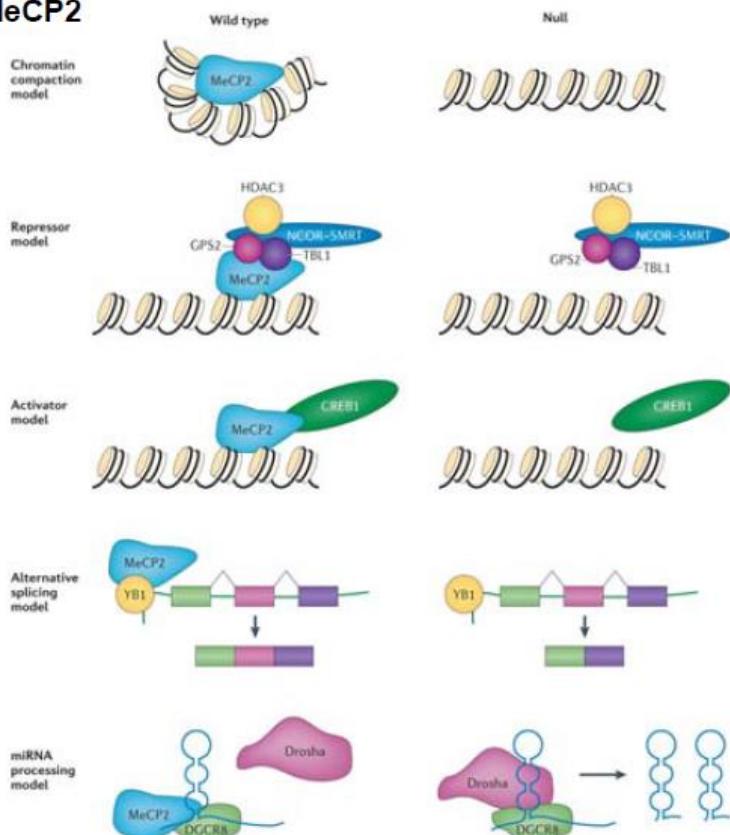
In vitro, se ha visto que se puede unir incluso a dinucleótidos no metilados y dando lugar a silenciamiento por reclutamiento de remodeladores de la cromatina. Incubando in vitro por microscopía electrónica se ve como se compacta la cromatina incubando con MeCP2.

También tiene muchas otras funciones. Silencia determinados genes.

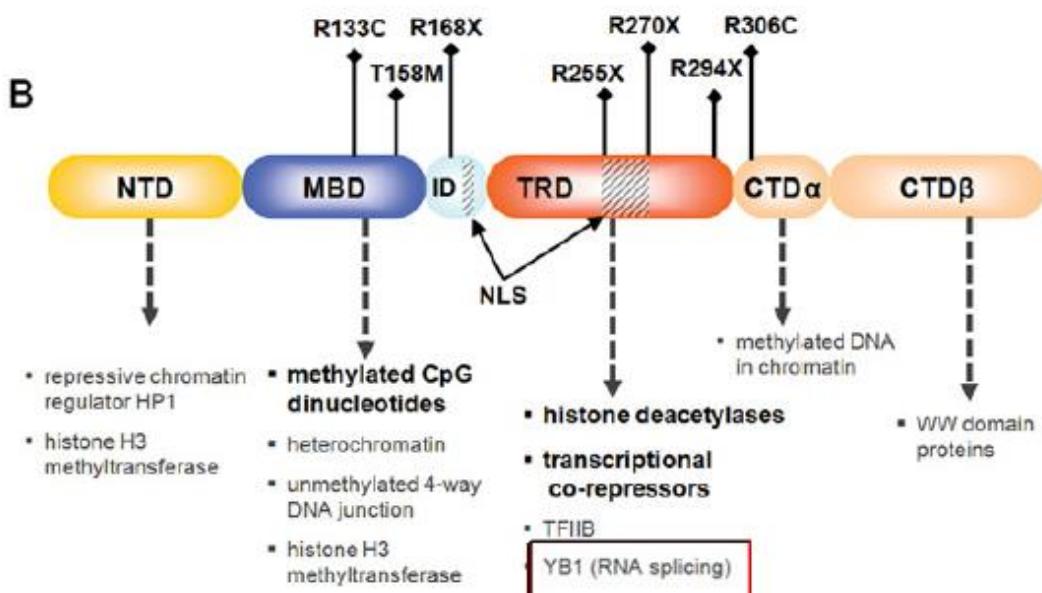
Haciendo un RNAseq, los niveles globales de expresión génica no varían pues reclutan algunos activadores cotranscripcionales como CREB1.

Se ha visto cómo por su unión a determinados factores de splicing como YB1 regula el procesamiento de splicing alternativo, regulando también producción de miRNAs.

Se le considera también un oncogen, estando sobreexpresado en determinados tipos de cáncer.

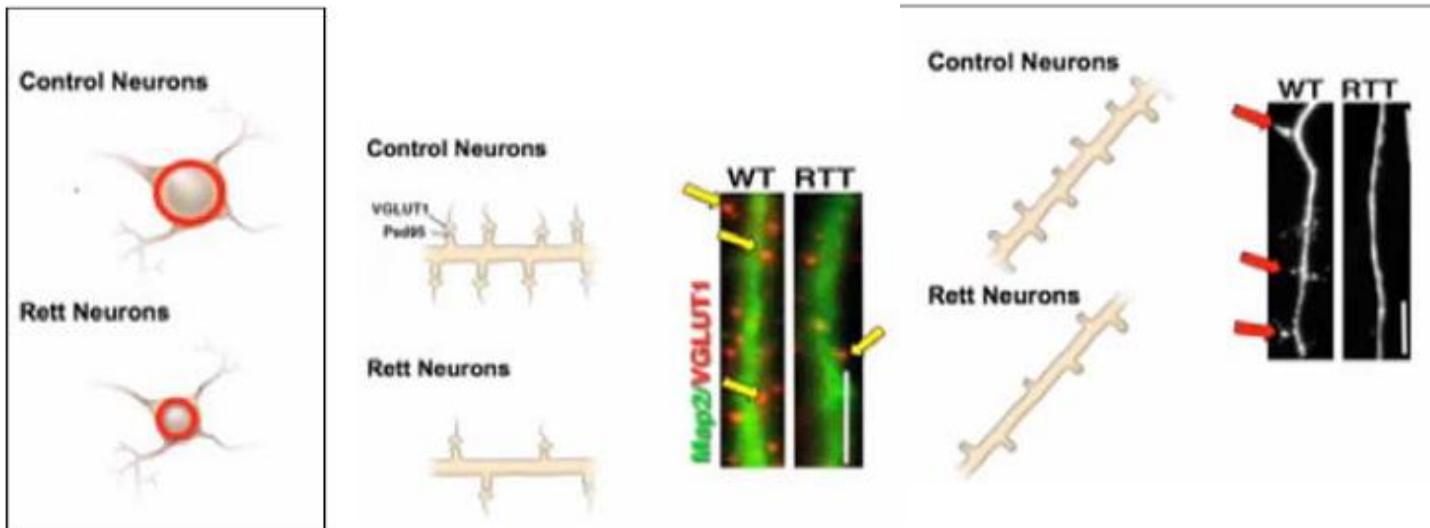


MeCP2 tiene dos isoformas, la mayoría de las mutaciones que se producen son mutaciones de stop. Tiene un dominio de unión a MeCpG, dominios de unión a histonas deacetilasas y otros.



Hay duplicaciones de locus que causan también enfermedad.

A nivel de cerebro se observa que el cuerpo neuronal de las neuronas tiene un numero menor de espinas dendríticas y tienen alteraciones a nivel de sinapsis excitatorias.



Modelos murinos de síndrome de Rett

- KO para MeCP2
 - Hembras heterocigotas son normales hasta los 6 meses, en que muestran síntomas neurológicos.
 - Hembras homocigotas o machos hemicigotos son viables y normales al nacer, pero mueren a las 10 semanas tras mostrar alteraciones.

El mismo fenotipo se ve con un defecto en MeCP2 sólo en precursores neuronales. Su función radica en las neuronas.

- Duplicaciones del locus producen muerte prematura a las 10 semanas.
- El fenotipo de los ratones es reversible
 - Al reinstaurar la expresión de MeCP2 se revierte el fenotipo, siendo una enfermedad no degenerativa.



Tratamientos

Targeting neurotransmitter systems disrupted in Rett syndrome	Growth factors, cell metabolism and homeostasis	Targeting MECP2 at the level of the gene, RNA or protein
Glutamate <ul style="list-style-type: none"> Dextromethorphan* Ketamine* Memantine 	Neurotrophic factors <ul style="list-style-type: none"> Glatiramer acetate CPT157633 CX546 7,8-dihydroxyflavone Fingolimod* LM22A-4 Mecasermin (recombinant human IGF-1)* Trofinetide (terminal tripeptide of IGF-1)* UA0713 	Genetic therapy <ul style="list-style-type: none"> Gene therapy Genome editing Read-through compounds for nonsense mutations Activation of MECP2 on inactive X chromosome
GABA <ul style="list-style-type: none"> L-838,417 Midazolam NO-711 	Metabolic factors: lipid metabolism <ul style="list-style-type: none"> Fluvastatin Lovastatin* 	Protein replacement <ul style="list-style-type: none"> Recombinant human MeCP2
Monoamines <ul style="list-style-type: none"> Benserazide Clenbuterol Citalopram Desipramine* LP-211 NXL101 Sarizotan* 	Mitochondrial function/oxidative stress <ul style="list-style-type: none"> CNF1 EPI-743* Triheptanoin* 	
Acetylcholine <ul style="list-style-type: none"> Acetyl-L-carnitine Choline 		

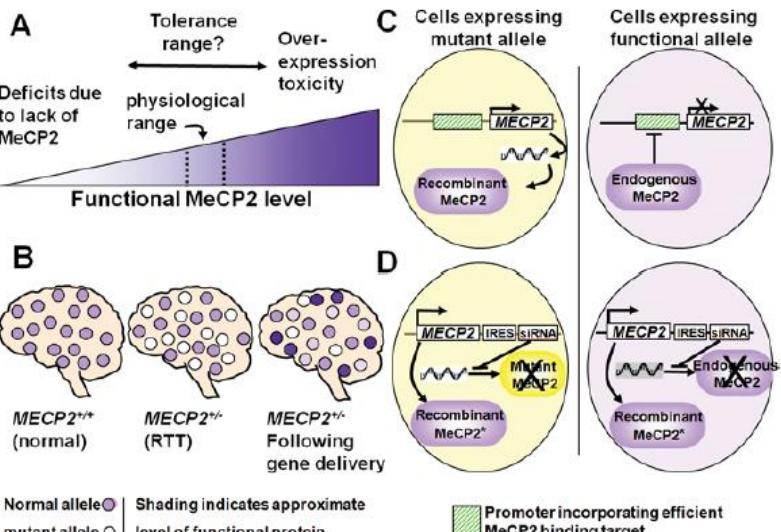
TRATAMIENTOS

- Terapia génica

- Terapia génica normal da neuronas que expresan mucho, otras endógenas...

Produce que no sea una situación normal. Aquellas neuronas que expresen más de lo normal tienen fenotipo patológico.

Se intenta que en las células que están expresando el alelo funcional se silencie para tener solo el transgen o que se compense poniendo CpG delante el transgen.



- Reactivación del otro alelo.
- Read-through

- Genome editing

Bases Moleculares de la Patología

Enfermedades epigenéticas – 30-04-2019

Modelos murinos

Aspectos importantes:

- Aunque la proteína es ubicua, **el fenotipo del ratón es el mismo si el defecto es neuronal en precursores.**
- **Al introducir en ratones adultos se reproduce el fenotipo**, siendo necesario para la función neurológica y el mantenimiento.
- El fenotipo en ratones es totalmente reversible.

Tratamientos

- Neurotransmisión
- Otros efectores downstream
- **Dificultad de terapia génica por el mosaico X.** Introduciendo un **transgén tenemos células que sobreexpresen. La duplicación del locus es patológica.**

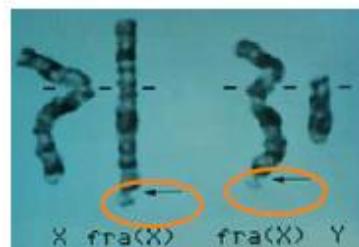
Como terapia prometedora podría ser la reactivación del cromosoma X silenciado específicamente. El cromosoma X se inactiva por medio del RNA Xist y metilación.

Con agentes desmetilantes e inhibiendo Xist con **oligos antisentido.**

Otras patologías epigenéticas

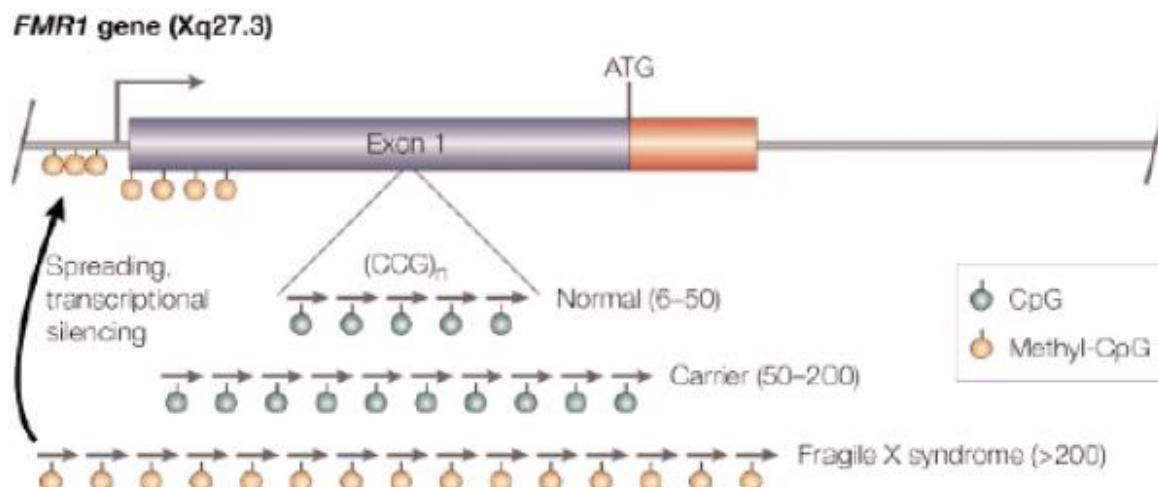
Síndrome del X-frágil

El defecto está en la proteína codificada por el factor **FMR1**. Hay un patrón de metilación anormal en el propio gen que se produce debido a una expansión de tripletes inestables. Se llama así porque citogenéticamente, el extremo del cromosoma X se rompe con facilidad.

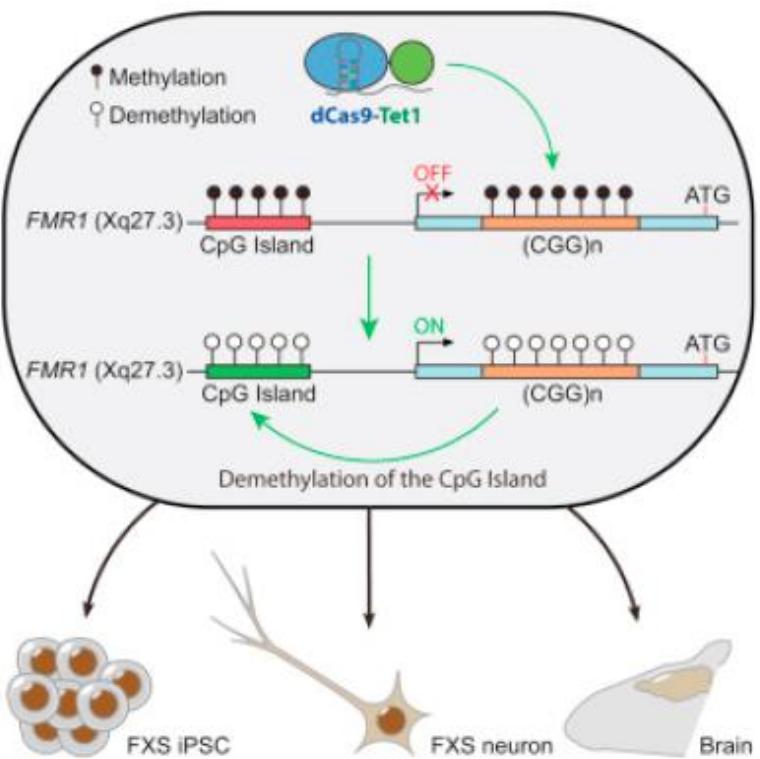
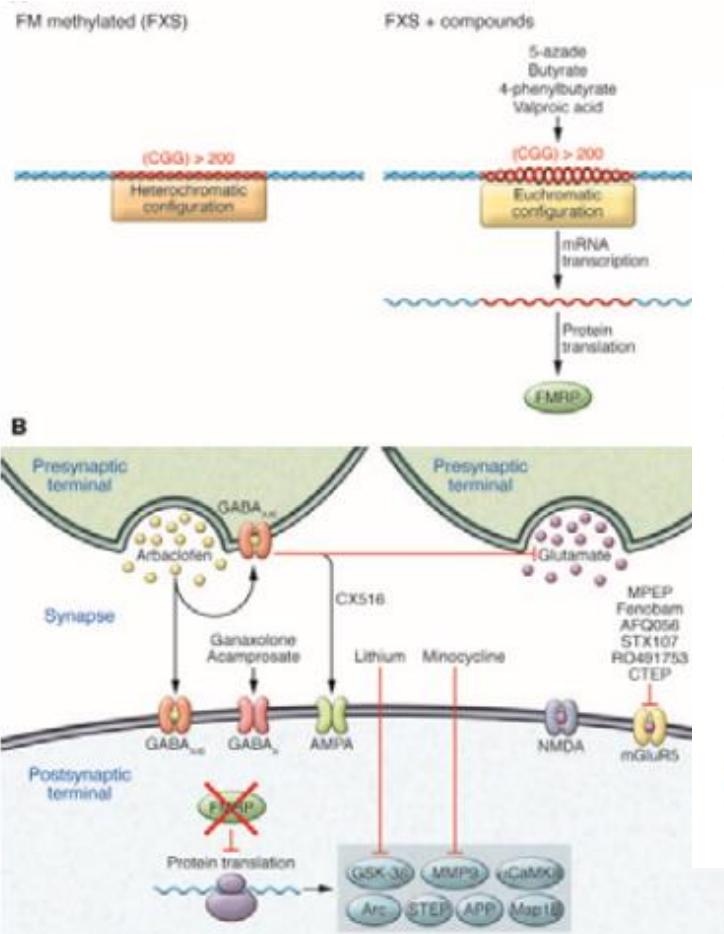


Está ligado al cromosoma X, dominante con penetrancia incompleta. Los pacientes afectados tienen síntomas autistas y de retraso mental. Los individuos normales tienen 5-50 y los afectados más de 200 repeticiones del triplete CGG.

Cuando hay muchas copias de CCG, se metilan y hay un silenciamiento en esta proteína. Es una proteína de unión a RNA que regula expresión génica, traducción, etc. A esto se le denomina **epimutaciones**, que produce un cambio en el patrón de metilación que conlleva un cambio en la expresión del gen.



Se está utilizando con “drogas epigenéticas” fundamentalmente dirigidas a agentes desmetilantes para abrir la configuración de la cromatina justo en la región promotora del gen.



PREGUNTA: ¿Efectos secundarios? Necesarias muchas reprogramaciones.

También hay **compuestos que actúan downstream de las proteínas desreguladas**. Utilizando Cas9 con un RNA guía que dirige específicamente han hecho una fusión entre Cas9 y una proteína que desmetila. Así, consiguen editar desmetilando, la Cas9 no tiene función catalítica, sólo dirige a la secuencia diana.

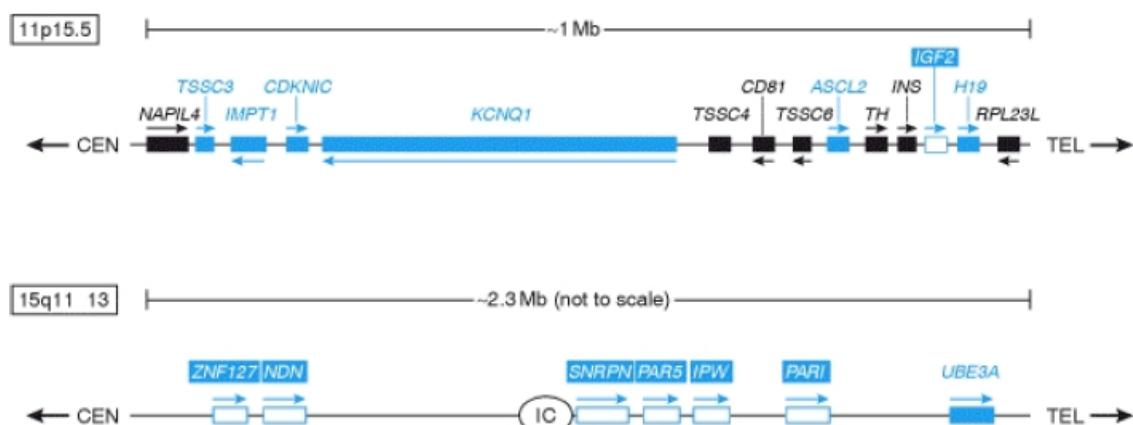
Enfermedades de impronta genética

Afectan a genes en **cromosoma 11 y 15 que están agrupados en cluster** y que solo se van a expresar en una copia determinada del genoma. La impronta viene por **reguladores de impronta del cromosoma**.

-en humanos hay ~60 genes con impronta genética, la mayoría implicados en desarrollo y crecimiento. Generalmente se agrupan en clusters

-Existen dos *clusters* de genes con impronta: en el crom. 11 (síndrome de Beckwith-Wiedemann) y en el crom. 15 (S. de Prader-Willi y de Angelman)

-en estos *clusters* hay genes de expresión paterna y otros de expresión materna, algunos son genes RNA no traducidos (ncRNA) reguladores de la expresión del resto de genes

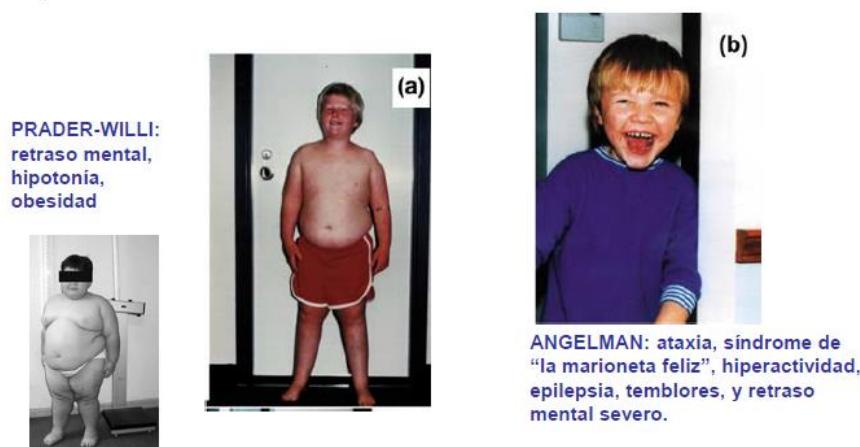


Prader Willi y Angelman

El síndrome de Prader Willi se genera por **falta de expresión del alelo paterno**, el síndrome de Angelman por **falta de expresión del alelo materno**.

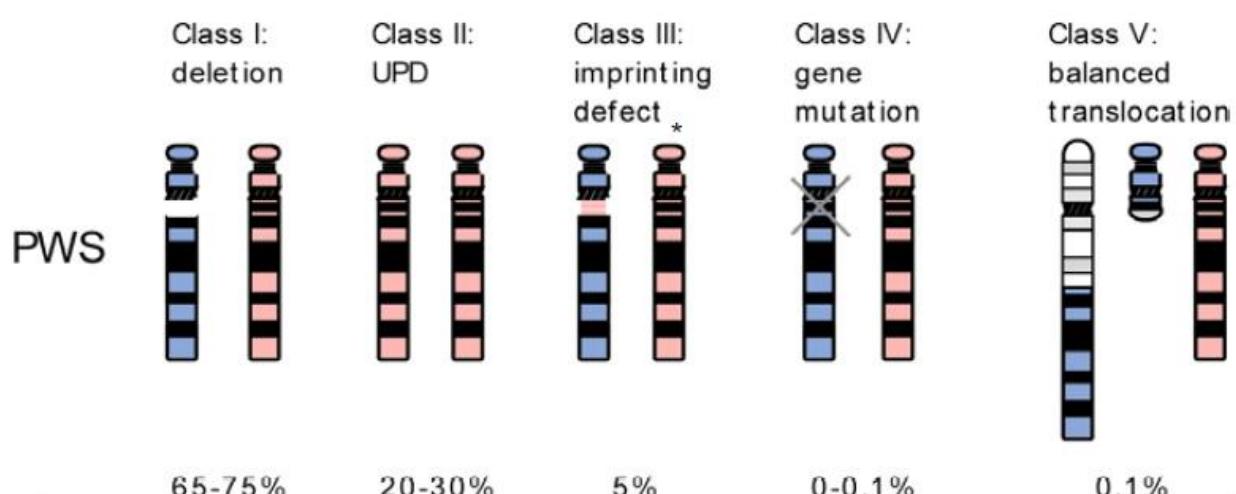
- PW con obesidad e hipotonía
- Angelman ataxia y risas incontroladas

- Pérdida de función de genes en el cromosoma 15 que sólo se expresan del cromosoma paterno (PW) o materno (Angelman)
- La pérdida de función puede deberse a delecciones, disomias uniparentales, mutaciones o errores en la impronta.

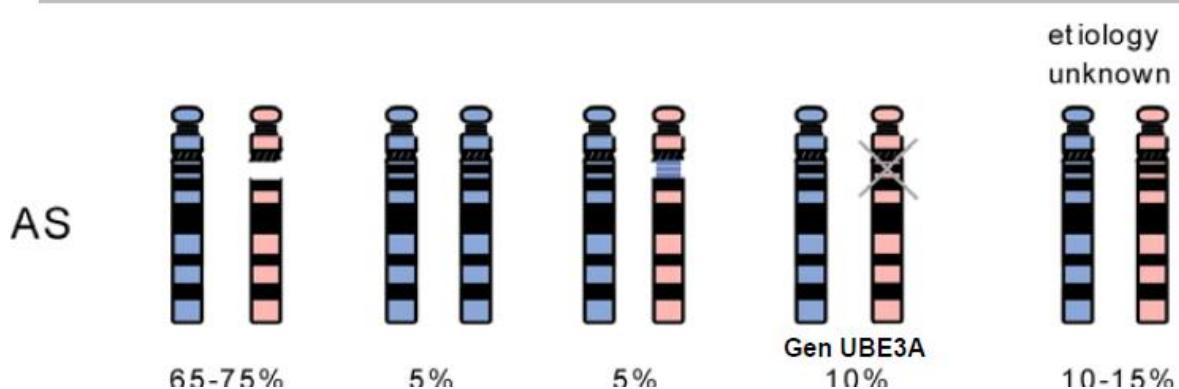


Las causas son:

- PW. Falta paterna.
 - Por **deleción en el padre**
 - **Disomía uniparental materna**
 - **Defectos de impronta.**
 - **Mutación en la copia paterna**
 - **Translocación balanceada con otro cromosoma.**
- Angelman – Lo mismo pero con la copia materna.



*Imprinting defect: abnormal DNA methylation without genomic alteration: epimutación primaria



Gen UBE3A

Enfermedades de metilación del DNA

Todas son **defectos complejos del desarrollo**. Relacionadas con las metilasas. Casi todas con **retraso mental y con dismorfias parciales**.

DNMT1

- *Autosomal Dominant Hereditary Sensory Neuropathy Type IE*
- *Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia, Deafness, and Narcolepsy*



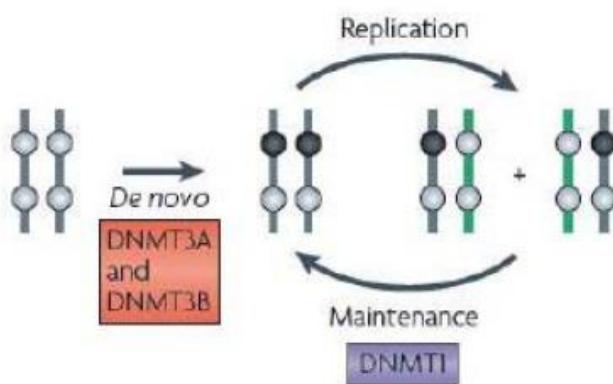
Figure 2: Characteristic facial appearance in DNMT3A overgrowth syndrome. Mutations, growth parameters and other clinical features are

DNMT3B

- *Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome 1*

DNMT3A

- *Overgrowth syndrome with intellectual disability*



Enfermedades con modificación de histonas

Enfermedades del neurodesarrollo. Síndrome de Coffin-Lowry o síndrome de Rubinstein-Taybi.

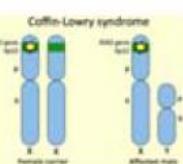
Síndrome de Coffin-Lowry (CLS):

Los síntomas principales consisten en retraso del crecimiento y del desarrollo psicomotor, anomalías faciales diversas y trastornos esqueléticos, como escoliosis, cifosis y deformidades de los dedos.

Causada por mutaciones en el gen **RPS6KA3 (RSK2)** en Xp22.2 (implicado en **fosforilación de histonas**).

Se hereda como un rasgo ligado al cromosoma X con patrón dominante. Los varones por tanto suelen estar más afectados que las mujeres.

Prevalencia: 1 de cada 50-100.000 individuos



Síndrome de Rubinstein-Taybi 1 (RSTS1):

Presenta baja estatura, moderada o grave discapacidad intelectual, microcefalia, tabique nasal ancho, y pulgares de pies y manos también engrosados.

Causada por mutaciones en el gen **CREBBP** en 16p13.3 (coactivador transcripcional de la proteína de unión a CREB, que actúa en la **acetilación de histonas**).

Se hereda como un rasgo dominante.

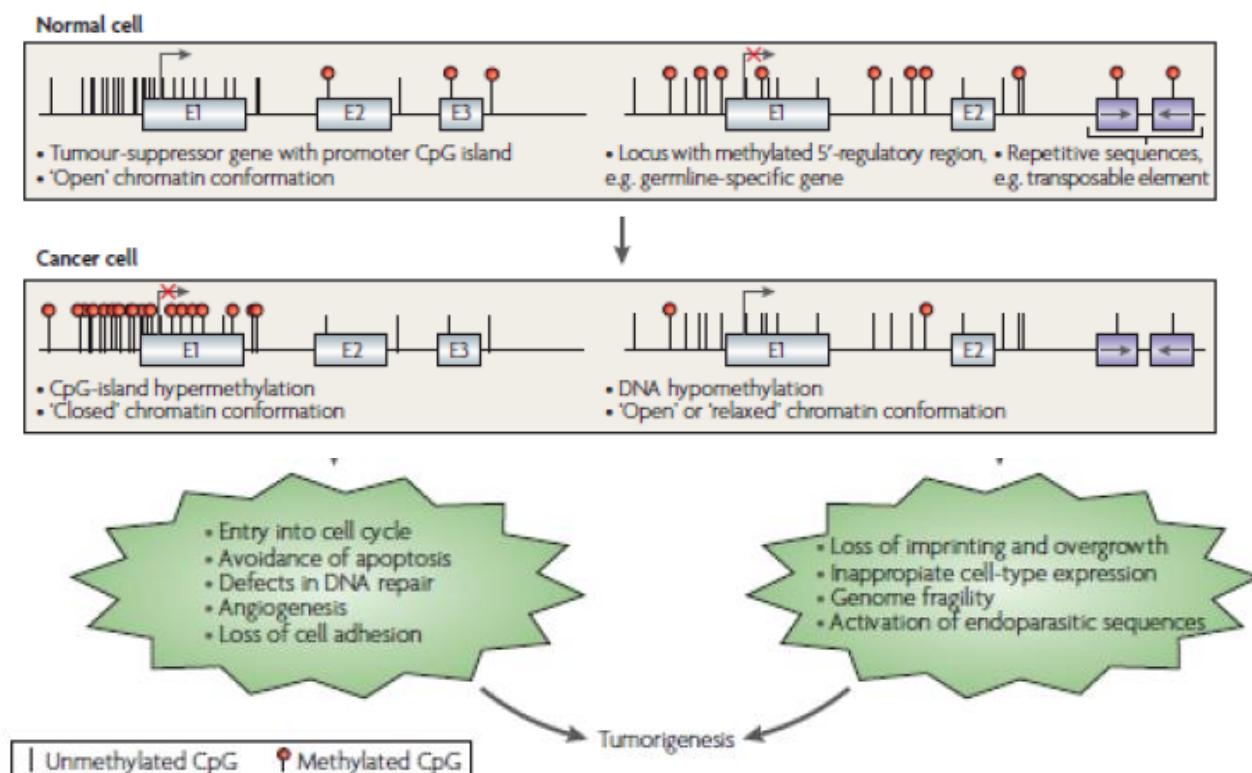
Prevalencia: 1 de cada 250.000 individuos.



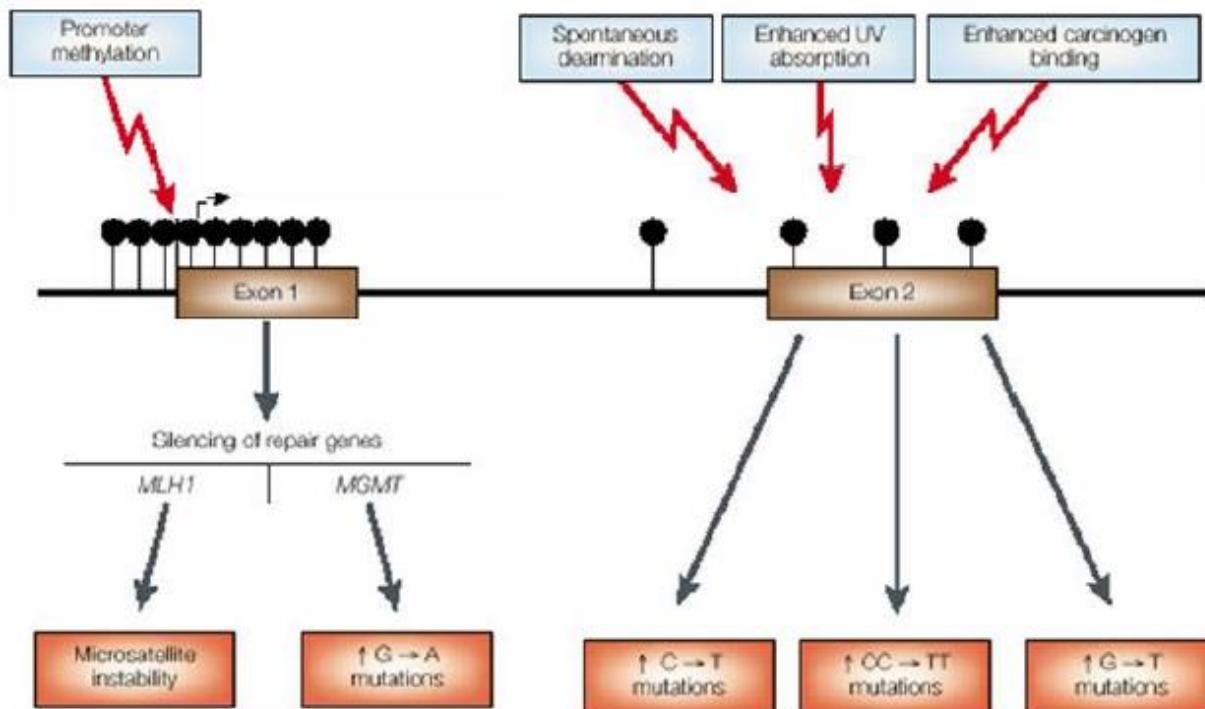
Epigenética y cáncer

- **Hipometilación global.** Produce una activación de la expresión génica. Se activan **oncogenes**. Se producen en **intrones**, **secuencias codificantes**, **secuencias repetidas** y **promotores**. Produce así una **inestabilidad cromosómica** (las secuencias repetidas son responsables de la **inestabilidad cromosómica**) y una **pérdida del imprinting**
- **Hipermetilación** en genes específicos como los supresores de tumores.
- **Modificaciones de histonas.** Modificaciones en acetilaciones y metilaciones de histonas.

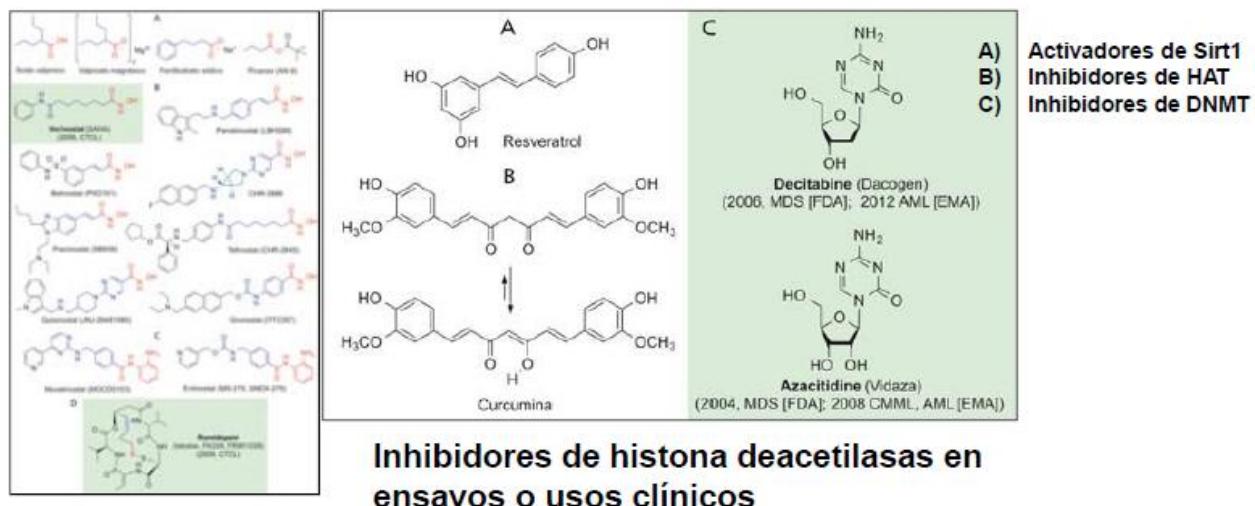
Los genes supresores de tumores pasan de una estructura con promotores destmetilados a cromatina cerrada. Los oncogenes o los genes que se expresan en el desarrollo embrionario y que generan proliferación pasan a desmetilados, igual que las regiones con secuencias repetidas y elementos transponibles.



Hypermethylation may result in increasing rate of mutation



En cáncer, se han desarrollado inhibidores de histonas deacetilasas y metiltransferasas, pues se pueden administrar directamente al tumor.



Epigenética en enfermedades complejas, psiquiátricas...

Se empezaron a buscar marcas epigenéticas asociadas a enfermedades complejas debido a que los GWAS se asociaban con SNPs que tenían cerca sitios CpG metilados. Hay multitud de estudios de EWAS (epigenome wide association studies) que abalan que hay mayor riesgo de ciertas enfermedades con distintos patrones de metilación epigenética.

También se ven en enfermedades monogénicas. Se ven epimutaciones. Si hay una hipermethylación del promotor, se da un silenciamiento génico que sería parecido a una pérdida de función.

Se ve una **disminución y alteración de la metilación en muchos de estos pacientes**.

En los **niños nacidos por IVF hay una mayor proporción de enfermedades** relacionadas con la impronta genética. Esto es algo que cada vez se está pensando más en ello, **pues en fertilización in vitro se testan que no tengan las enfermedades genéticas más comunes**. Se está queriendo regular también que también se controle la epigenética.

La epigenética se hereda

Comparando **hermanos de la misma madre tras la época de hambruna** hay un patrón diferente de **metilación**. Durante la hambruna se adquieren una serie de marcas epigenéticas, **pues durante la hambruna se gestiona de una manera los nutrientes y tras ella se inducen otros**.

Famine's shadow

Proc. Natl. Acad. Sci. USA doi:10.1073/pnas.0806560105 (2008)
If a starving woman becomes pregnant, her child's DNA can still bear traces of her hunger more than six decades later.

Lambert Lumey of Columbia University in New York, Bastiaan Heijmans of Leiden University Medical Center in the Netherlands and their colleagues studied the methyl groups attached to a gene called *IGF2*. They measured methylation at five points along *IGF2* in people prenatally exposed to the 1944–45 Dutch famine — when a Nazi embargo led to food rationing in the west of Holland of fewer than 700 calories a day.

Compared with same-sex siblings conceived when the same mothers had more flesh on their bones, those affected early in fetal development have less methylation on *IGF2* today, implying that their cells express it more readily.



Children wait to be fed during the Dutch Hunger winter of 1944-1945.

EPIDEMIOLOGY

Tales of adversity

Genetic studies of people conceived during famine reveals that prenatal malnutrition lingers long after the event.

Sin embargo, no es solamente la madre la que transmite esta herencia epigenética, sino varias generaciones.

Los cambios **no solo producen daños directos al DNA**, sino que también modifican el patrón **epigenético del feto**. Los padres obesos también tienen un patrón de metilación diferente.

Soubry et al. BMC Medicine 2013, 11:29
<http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/29>

BMC Medicine

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Paternal obesity is associated with *IGF2* hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort

Adelheid Soubry¹*, Joellen M Schildkraut^{1,2}, Amy Murtha³, Frances Wang¹, Zhiqing Huang⁴, Autumn Bernal⁵, Joanne Kutzberg⁶, Randy L Jirtle³, Susan K Murphy³ and Catherine Hoyo⁷

See related commentary article here <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/30>



Abstract

Background: Data from epidemiological and animal model studies suggest that nutrition during pregnancy may affect the health status of subsequent generations. These transgenerational effects are now being explained by disruptions at the level of the epigenetic machinery. Besides *in vitro* environmental exposures, the possible impact on the reprogramming of methylation profiles at imprinted genes at a much earlier time point, such as during spermatogenesis or oogenesis, has not previously been considered. In this study, our aim was to determine associations between preconceptional obesity and DNA methylation profiles in the offspring, particularly at the differentially methylated regions (DMRs) of the imprinted insulin-like Growth Factor 2 (*IGF2*) gene.

El maltrato materno durante el embarazo produce cambios epigenéticos que inducen que en la descendencia haya una mayor predisposición a comportamientos depresivo/ansiosos, adcribiéndose a determinados cambios de metilación.

Embarazo y nutrición

- Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales
- Malnutrición madre → Malnutrición feto → alteraciones epigenéticas (metilaciones), retraso de crecimiento intrauterino.
- A más largo plazo, menor progreso intelectual, de adultos diversas enfermedades, incluso crónicas

Embarazo, tabaco y epigenética

Epidemiology 6(11), 1284–1296 November 2011; © 2011 London Broadscale

Maternal tobacco use modestly alters correlated epigenome-wide placental DNA methylation and gene expression

Melissa Sutte, Jun Ma, Alan Harris, Lauren Patterson, Kathleen A. Brown, Cynthia Shope, Lori Showalter, Adi Abramovici and Kjersti M. Aagaard-Tillery*



Embarazo, alcohol y epigenética

January 2010 | Volume 6 | Issue 1 | e1008411

Maternal Ethanol Consumption Alters the Epigenotype and the Phenotype of Offspring in a Mouse Model

Nina Kariminen-Ahola¹, Aritta Ahola^{1,2}, Murat Moga³, Kylie-Ann Mallitt⁴, Paul Falsetti⁵, Timothy C. Cox⁶, Emma Whittle^{1,2}, Suyuen Cheng^{1,2,*}

¹Division of Genetics and Population Health, Queensland Institute of Medical Research, Herston, Australia, ²Department of Biological and Environmental Sciences, University of Western Australia, Crawley, Western Australia, ³Division of Experimental Medicine, Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, Washington, United States of America, ⁴Queensland Medical Research Institute, QMRI University and the Queensland Institute of Medical Research, Herston, Australia

Abstract
Recent studies have shown that exposure to some nutritional supplements and chemicals *in utero* can affect the epigenome of the developing mouse embryo, resulting in adult disease. Our hypothesis is that epigenetics is also involved in the epigenetic programming of adult diseases in alcohol. We have developed a model of nutritional alcohol exposure in

Epidemiology 41, 607–617 (2009)
Published online 18 Oct 2009 at 20 May 2009.
DOI 10.1093/aje/kwz010

Minireview

Fetal Alcohol Spectrum Disorders: The Epigenetic Perspective¹

Philip C. Haycock²

²Division of Human Genetics, University of the Witwatersrand and National Health Laboratory Service, Johannesburg, South Africa

ABSTRACT

FASD is a classic teratogen capable of inducing a wide range of developmental abnormalities. Studies in animal models suggest that differences in timing and dosage underlie this broad diversity, present under postnatal growth restriction, moderate fetal exposure (about paternal blood alcohol plasma; this, vermilion border of the upper lip); and brain damage. Fetal alcohol spectrum disorder has also been

Estrés y maltrato materno

El maltrato de la madre durante el embarazo, a corto plazo afecta a un retraso de crecimiento intrauterino.

A largo plazo los niños presentan anomalías por fallo en la regulación del eje hipotálamo –hipófisis –adrenal.

La base molecular epigenética parece consistir en la metilación del gen NR3C1 (receptor de glucocorticoides), proceso que depende del estado anímico de la madre.

El estrés temprano o en el embarazo lleva a consecuencias de largo plazo de comportamiento y neurobiológicas de la descendencia: ansiedad, depresión, exceso de fármacos, desajustes de memoria.

Los niveles altos asociados de corticosterona materna pueden ser la causa de las modificaciones epigenéticas.

available at www.sciencedirect.com
 www.sciencedirect.com/science/journal/brainresrev

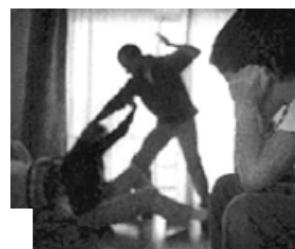
Review

Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress

Muriel Darnaudéry¹, Stefania Maccari^{1,2,3,4,5,6,7}

¹Prenatal Stress Team, University of Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

²Department Human Physiology and Pharmacology, Sapienza University of Rome, Italy



EPIDEMIOLOGY
2017, VOL. 12, NO. 4, 264–276
http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2017.1285986

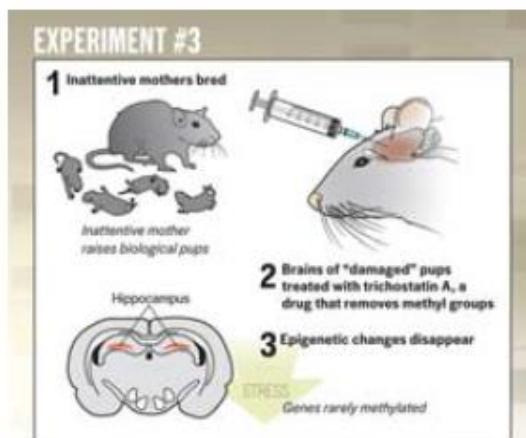
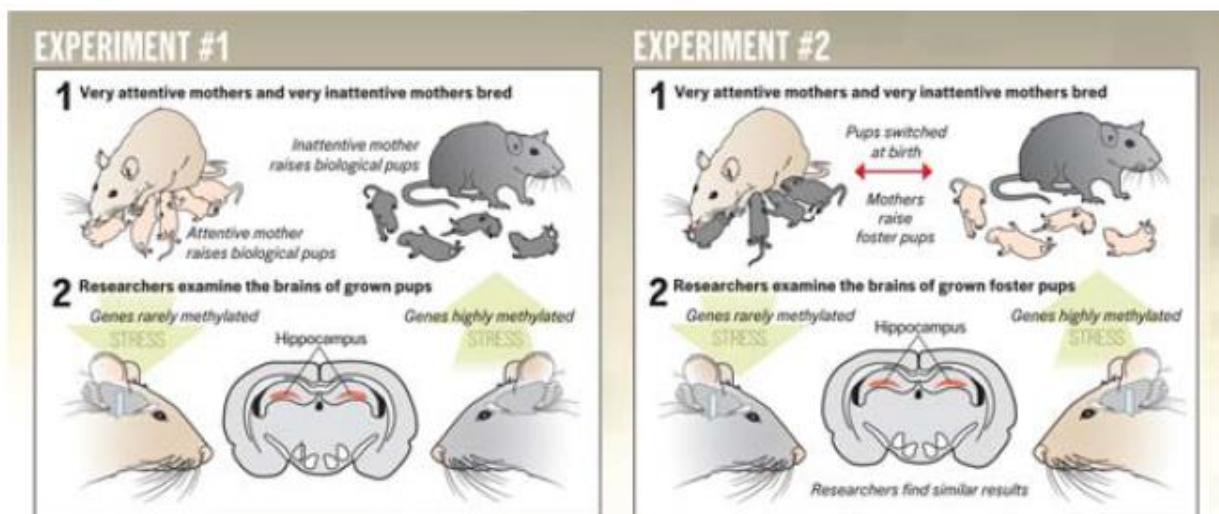
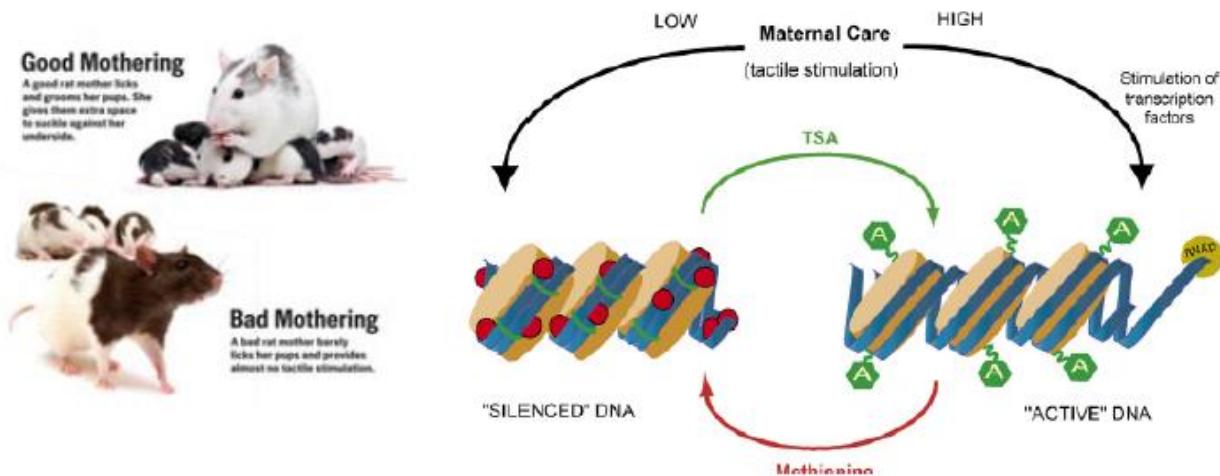
RESEARCH PAPER

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

OPEN ACCESS

Early-life stress links 5-hydroxymethylcytosine to anxiety-related behaviors

Los cuidados maternos son muy positivos, influyendo en el desarrollo de los episodios depresivos o de ansiedad. Una madre que cuida a sus ratones produce que estos tienen un patrón de metilación de genes implicados en respuesta a estrés diferente de aquellos que no tienen un buen mothering.



Intercambiando a los ratones, se ve que lo que interviene es el comportamiento de la madre. Si se les inyecta una droga demestilante, se recupera el patrón normal.

Bases Moleculares de la Patología

Diabetes y obesidad – 06-05-2019

La diabetes es conocida clásicamente como una **sintomatología caracterizada por una hiperglucemia en la situación de ayuno**. Bajo esa sintomatología, **existen muchos tipos de mecanismos diferentes**.

Clásicamente, se han dividido en:

- **Diabetes juvenil.** Era irreversible.

La deficiencia absoluta de insulina se da en formas autoinmunes de diabetes, es el caso de la diabetes tipo 1 o T1DM (afecta al 5-10% de diabéticos), en las que una progresiva destrucción de las células β del páncreas que secretan insulina conduce a una deficiencia absoluta de insulina.

- **Diabetes senil.** Aparece a edad avanzada.

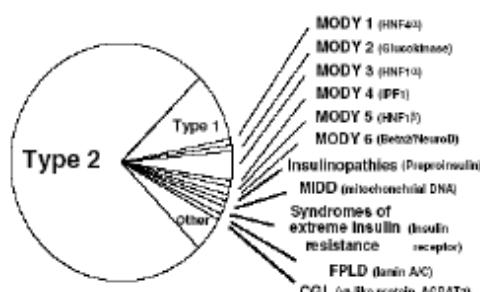
La deficiencia relativa de insulina es mucho más frecuente y en su forma más común, diabetes tipo 2 o T2DM (afecta al 90-95% de diabéticos), está causada por una resistencia a insulina (en su mayoría debido a obesidad) acoplada con un fallo progresivo de la célula β en la secreción de suficiente insulina para compensar la creciente resistencia a insulina. Además de T2DM conocemos varios síndromes monogénicos de diabetes que conducen a una deficiencia relativa de insulina.

Respectivamente, se denominan actualmente como tipo I (o insulino-dependiente) y tipo II (insulino independiente, con evolución hacia la dependencia). También juega un **factor importante el concepto de sensibilidad a la insulina**. No solamente nos interesa cuánta insulina, sino también en qué medida los tejidos que consumen glucosa de modo insulino-dependiente son más o menos sensible a la insulina. Dependiendo del grado de sensibilidad, hablaremos de tejidos sensibles o resistentes a insulina.

La diabetes es un **problema a nivel mundial**. En el año 2004 se calculaba que había 171 millones de personas afectadas y se preveía que para 2030 habría 366 millones. Sin embargo, en 2015 ya había 415 millones de personas afectadas, con una previsión de 642 millones de personas para 2040. En España, **su prevalencia es del 13,8%**.

- La diabetes de tipo I **afecta al 5-10% de diabéticos**.
- La diabetes de tipo II, **afecta al 95% de los diabéticos**. Está causada por una **resistencia a insulina (en su mayoría, debido a la obesidad)** acoplada a un **fallo progresiva de la célula β en la secreción de suficiente insulina para compensar la creciente resistencia a insulina**.

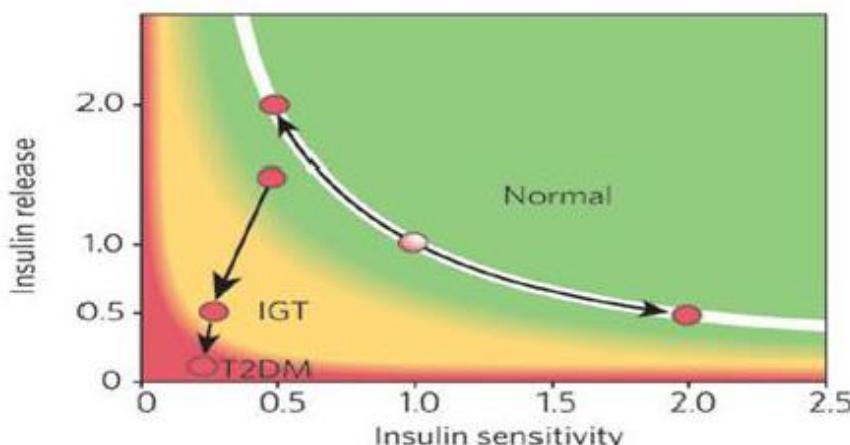
Además, **conocemos varios síndromes monogénicos de diabetes** que conducen a una deficiencia relativa de insulina, denominados MODY (Maturity-onset diabetes of the young). Algunos otros también son monogénicos y no forman parte de los MODY, como distintas insulinopatías. Los síndromes de diabetes, **tienen un componente poligénico en la mayor parte de los casos**.



- **MODY1.** Mutación en el **HNF4 α .**
- **MODY2.** Incluye **mutaciones en el gen de la glucoquinasa**, presentan sensibilidad reducida a la glucosa. La glucoquinasa no se satura a glucosa basal, **siendo un sensor de glucosa**.
 - **MODY 1:** mutación en el HNF4 α , que es un factor de transcripción
 - **MODY 2:** incluye mutaciones en el gen de la Glucokinasa. Presentan sensibilidad reducida a la glucosa.
 - **MODY 3:** mutación en HNF1 α , factor de transcripción controlado por HNF4 α . Suele responder bien al tratamiento con sulfonilureas, compuestos que incrementan la secreción de insulina actuando sobre los canales de potasio.
 - **MODY 4:** deriva de mutaciones en el gen IPF1 (o Pdx en roedores) que es un factor de transcripción implicado en la maduración de células α
 - **MODY 5:** una de las menos frecuentes, asociada a mutaciones en el gen HNF1 β
 - **MODY 6:** sólo hay unas 5-6 familias en el mundo. Está asociada a mutaciones en el gen "neurogenic differentiation 1", factor que regula la expresión de la insulina.
 - **MODY 7-11:** síndromes variados muy raros cuyas mutaciones han sido identificadas
 - **Diabetes neonatal permanente y transitoria:** en el primer caso suele deberse a mutaciones en alguna subunidad de los canales de potasio.
 - **MIDD (maternal inherited Diabetes and Deafnes):** es debida a una mutación en el DNA mitocondrial que suele ir asociada a sordera. Presentan disminución de la fosforilación oxidativa, y menor secreción de insulina en el páncreas.
 - El resto de síndromes monogénicos tienen más que ver con la presencia de resistencia a insulina como son los casos de lipodistrofias, mutaciones en el receptor de insulina, etc

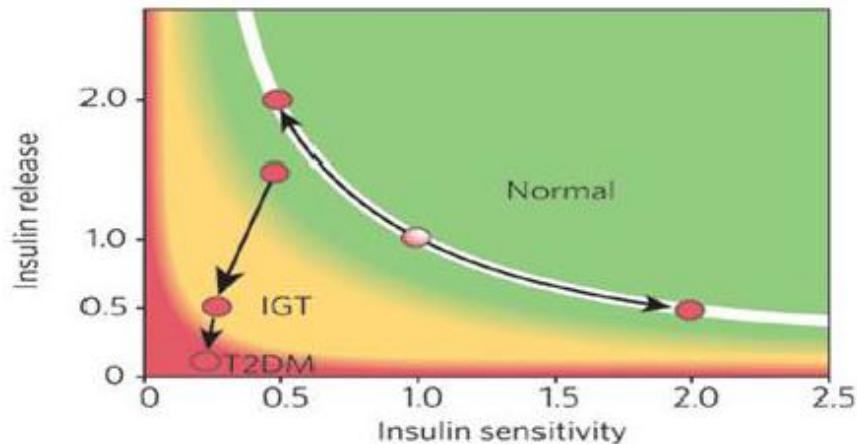
La homeostasis de glucosa, **en general, es controlada por dos factores:** capacidad de secreción de insulina y sensibilidad periférica de la insulina.

Estos dos factores tienen una **relación inversa**: cuando aumenta la sensibilidad a insulina nos basta **poca insulina para estar en la zona normal**. Sin embargo, si disminuye la sensibilidad a insulina, necesitaremos **aumentar la secreción para que la glucemia esté en valores normales**.



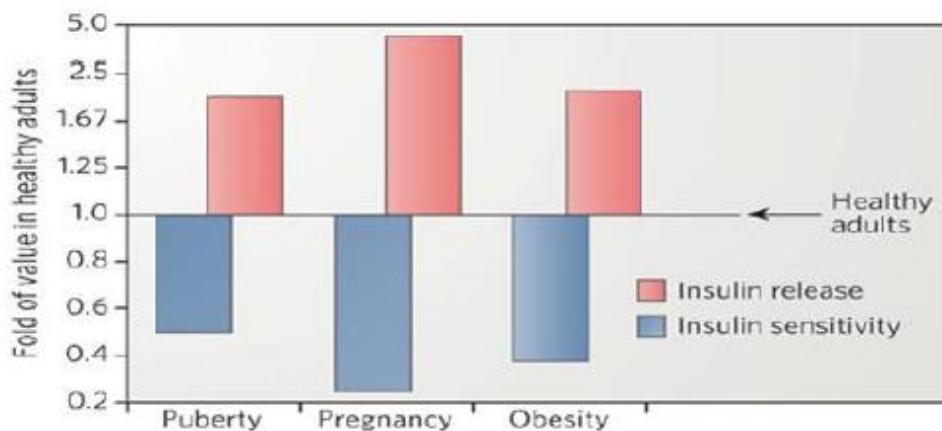
La glucosa es la que estimula la secreción de insulina. Si tenemos poca glucosa, **poca insulina; mucha glucosa, mucha insulina**. Sin embargo, si aumenta la aumenta la sensibilidad de insulina, disminuye la glucosa. Si disminuye la sensibilidad de insulina, baja el uptake de la glucosa pero esta misma induce una mayor secreción de insulina que compensa.

A lo largo de la vida, **hay situaciones concretas en las que la sensibilidad a insulina puede fallar**, ocurriendo también que **no seamos capaces de secretar suficiente insulina**. Si esto se agrava, **se puede llegar a una IGT (intolerancia a la glucosa)**.



Este **estado de intolerancia a glucosa** es medido por el **test de tolerancia a glucosa**, mediado por una tolerancia de glucosa. Si la situación empeora, se acaba en la “zona roja”, una **diabetes de tipo II en la que la sensibilidad a insulina está muy disminuida y la secreción también**.

A lo largo de la vida, se pueden producir muchas situaciones en las que la secreción y la sensibilidad **no están compensadas para que los niveles de glucosa sean los óptimos**:



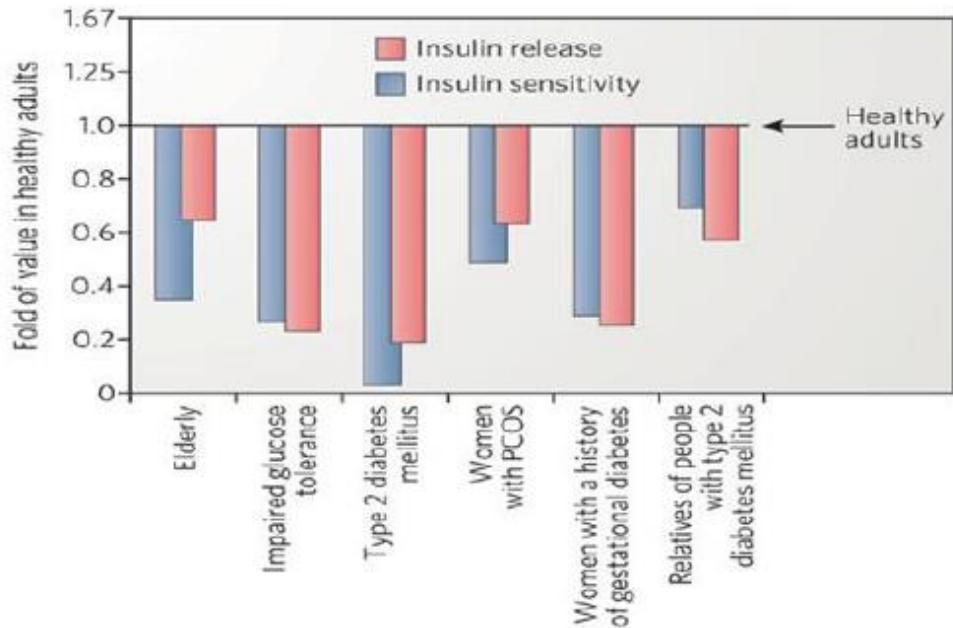
- Tras la **pubertad**, disminuye mucho la sensibilidad a insulina. Cuando uno pasa la pubertad, los tejidos **dejan de ser sensibles**. Si se analizan células adiposas de ratas o ratones juveniles, **de 1 mes o 2 meses**, y las estimula con insulina, **la captura de glucosa puede aumentar hasta 12 meses**.

Sin embargo, con ratas de 4-5 meses, la insulina aumenta la sensibilidad 2 o 3 veces.

Esto se suele compensar con **una mayor secreción de insulina**.

- Durante la **gestación**, se produce una disminución de la sensibilidad a insulina **para que vaya la glucosa al feto**. Suele aumentar la insulina, **pero si no aumenta, se produce diabetes gestacional**.
- En **obesidad**, disminuye la sensibilidad y aumenta la liberación.

- **Envejecimiento.** Cursa con un aumento de secreción de insulina, pero luego baja junto con la sensibilidad.
- **Intolerancia a la glucosa.** La disminución de la sensibilidad **va acompañada de una disminución de la secreción de insulina.**



A lo largo de nuestra historia vital **podemos encontrarnos con diversas situaciones en las que dependiendo de la compensación, se podrá dar una intolerancia a glucosa o una diabetes**

Mecanismos de secreción de insulina

Está regulada por el metabolismo de la glucosa, la señalización de los ácidos grasos y la sensibilidad a las incretinas.

En una célula β , ante un aumento de la concentración de glucosa produce un aumento de la secreción de insulina almacenada en gránulos.

Hay todo un camino metabólico que funciona como sensor a las variaciones de glucosa. No sólo la glucoquinasa funciona como un sensor, sino que la GLUT2 funciona también como un sensor al no estar saturado a concentraciones basales de glucosa.

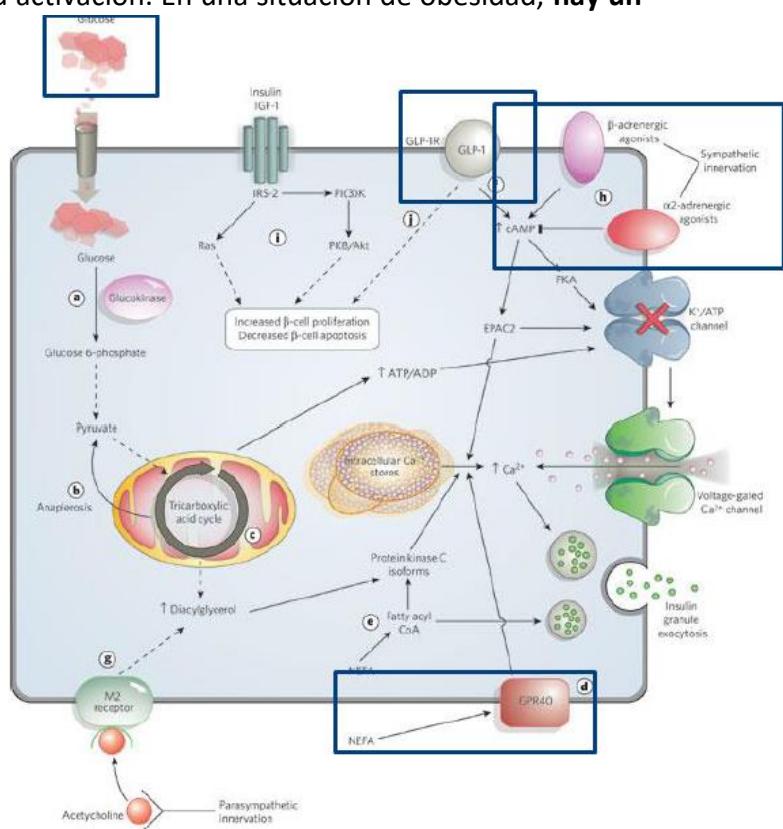
Tras la glucolisis de la glucosa, aumenta la razón ATP/ADP, bloqueando canales de potasio y generando depolarización que estimula canales dependientes de voltaje de calcio, facilitando la exocitosis de la insulina.

También los ácidos grasos circulantes (que actúan a nivel del GPR40 o directamente) actúan. Directamente, actúan sobre la PKC por medio de su conversión a fatty acyl-CoA. El receptor GPR40, produce un aumento del calcio intracelular en su activación. En una situación de obesidad, hay un aumento de FFA en sangre que aumenta la secreción de insulina, salvo en situaciones de lipotoxicidad.

Las incretinas, como el GLP1 (glucagon-like peptide) estimula la secreción de insulina por medio de un receptor GPCR acoplado a G α s, el GLP1-R, contribuyendo a inhibir los canales de potasio por la PKA, aumentando la depolarización y activando los canales de calcio dependientes de volataje que producen una corriente de calcio entrante desencadenando la exocitosis.

El aumento del malonil-CoA está implicado también, pues el aumento de acetil-CoA genera malonil-CoA, que es el inhibidor de la CPT1 (carnitina palmitoil transferasa), inhibiéndose la β -oxidación mitocondrial.

El sistema nervioso periférico puede actuar por medio de la adrenalina y la noradrenalina (terminaciones adrenérgicas y noradrenérgicas).



¿Cuáles son las causas de un aumento del metabolismo glucídico?

- 1) Aumento de la actividad glucokinasa
- 2) Desviación de parte del piruvato hacia la piruvato carboxilasa, con el consiguiente aumento de intermediarios del ciclo de Krebs y una mayor capacidad oxidativa del mismo (anaplerosis).
- 3) Aumento del malonil-CoA, de los Acil-CoA's y el DAG, lo que conlleva la exocitosis de los gránulos de insulina

¿Cuáles son las causas de un aumento del metabolismo glucídico?

- 1) Aumento de los NEFA circulantes: activan el receptor GPR40 que conlleva un incremento de Ca^{2+} intracelular y la consiguiente exocitosis de insulina; también se transforman en Acil-CoA's que favorecen la exocitosis. Los NEFA aumentan en obesidad
- 2) Incretinas como el GLP-1. La célula β es más sensible a GLP-1 en obesos
- 3) Innervación por el CNS

Cambios en el tamaño y el número de células β

En roedores:

- **12 meses de dieta grasa provoca obesidad y resistencia a insulina.** Se observa una **hiperplasia pero no una hipertrofia de las células β , fundamentalmente.**

Si cada célula β mantiene la misma funcionalidad, **compensan la situación de resistencia a insulina**. Es por ello, **que en obesidad hay una hiperinsulinemia**.

Algo parecido ocurre en la gestación.

En humanos

- Se produce una **hipertrofia**, pero la **capacidad secretora se ve incrementada**.

Algunas de las **causas podrían ser**:

- **SNC.** Lesiones en el **hipotálamo ventromedial**, produce una **hiperplasia en el páncreas**. Se genera también obesidad.
- **Insulina y GLP-1.** La propia **insulina tiene sus receptores en el páncreas**. Por medio del **IRS-2** es capaz de provocar el crecimiento y la **hiperplasia pancreática**.

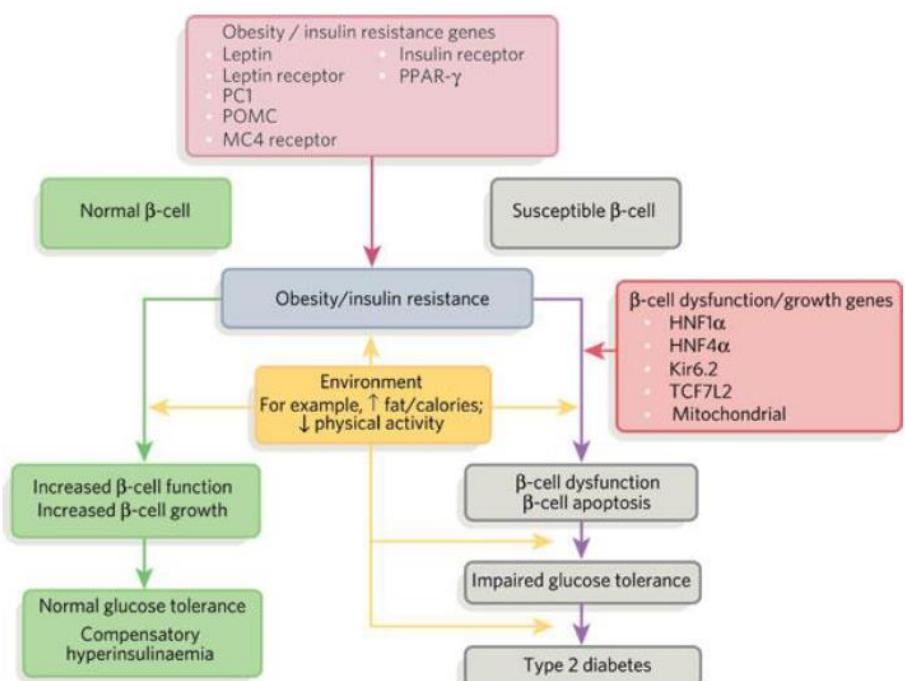
Poco a poco, **parecería que es siempre la falta de secreción de insulina la causa de la diabetes**.

Parecería que **la susceptibilidad de la célula β sería el factor determinante de la diabetes**. **Geneticamente**, la obesidad y la resistencia a insulina pueden venir determinados **genéticamente** llevándonos a estas situaciones.

Factores medioambientales como la disminución de la actividad física y el aumento en grasas y el aumento de la toma de calorías, implican también esto.

Sin embargo, dependiendo del genotipo de nuestras células β , esto derivará o no en diabetes:

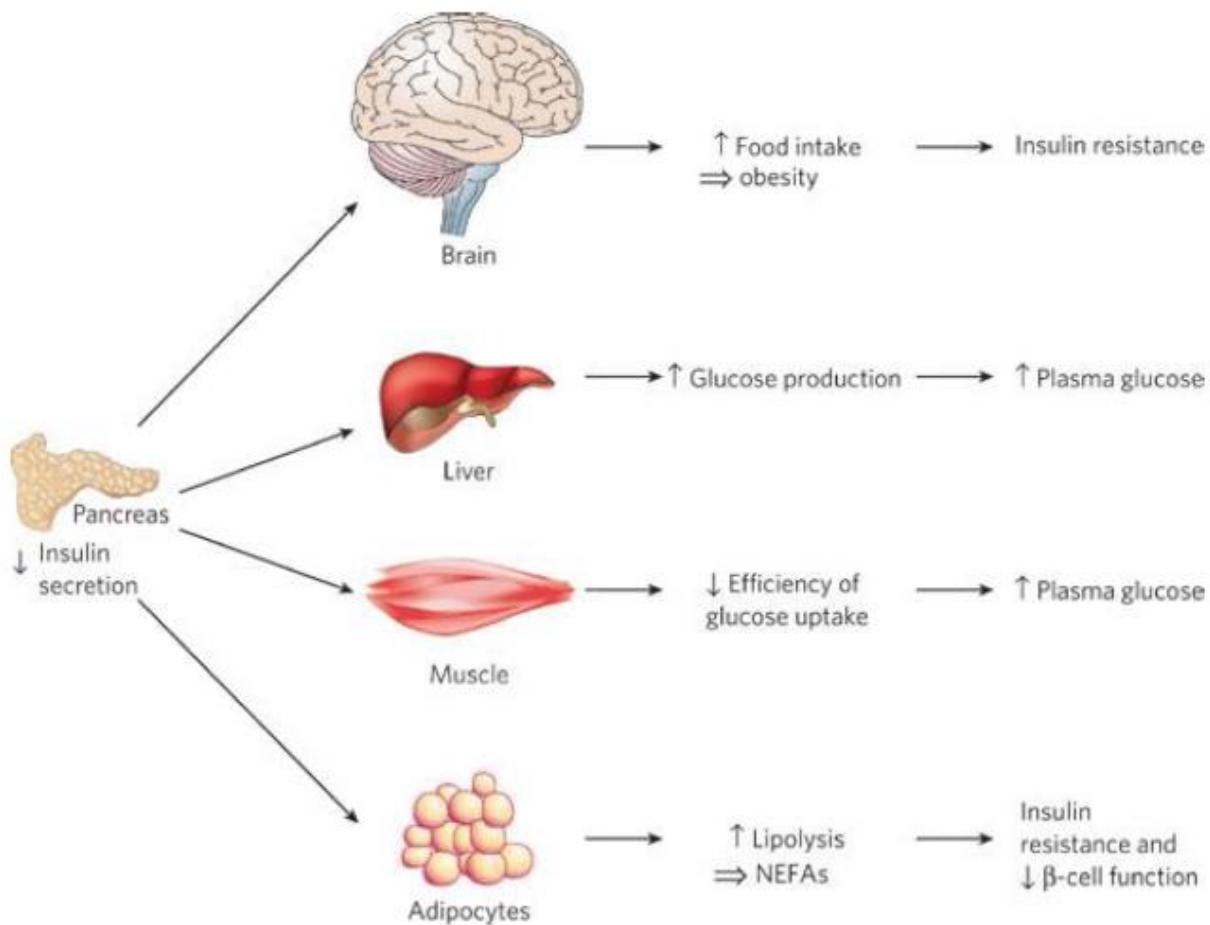
- **Si la célula β es funcional,** se generará una **hiperplasia** y se conseguirá mantener una tolerancia a la glucosa.
- **Si la célula β no es funcional**, o hay algún tipo de disfunción, la célula β no es capaz de responder a estos incrementos de glucosa. Esto provocará que las células β entren en apoptosis y acabemos en una situación de intolerancia a la glucosa, **que se agravará y llevará a una diabetes de tipo II**.



La resistencia a insulina **puede ser un catalizador de la situación de diabetes**. La resistencia a insulina, **va a generar en su caso una hiperinsulinemia**, pero no la disfunción final. **La glucotoxicidad y lipotoxicidad pueden actuar sobre esta disfuncionalidad en la célula β , a pesar de no tener determinantes genéticos.**

Cuando se produce el fallo pancreático, todos los tejidos se ven comprometidos:

- **Cerebro.** La insulina es un agente **anorexigénico**, que controla el apetito. Si no tenemos suficiente secreción de insulina, **a nivel central tendremos más apetito y se exacerba la obesidad**, llegando a una situación de resistencia a insulina.
- **Hígado.** La insulina inhibe la producción hepática de glucosa. Si no hay insulina, **se aumenta la producción de glucosa y contribuye a aumentar el estadio diabético**.
- **Músculo y tejido adiposo.** Disminuye la captura de glucosa en ausencia de insulina. La insulina, **también inhibe la lipólisis en el tejido adiposo**, aumentando en situación de diabetes la misma, **aumentando los FFAs y produciéndose una disfunción de la célula β** .



Así, el fallo pancreático va a contribuir enormemente a la situación de falta de equilibrio en la homeostasis de glucosa.

Determinación de la sensibilidad a insulina

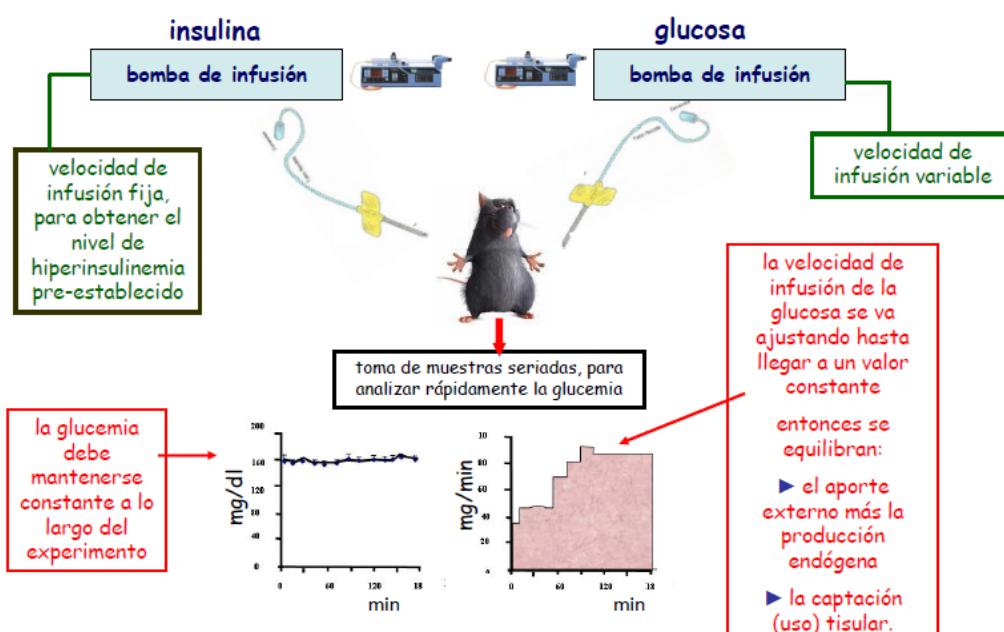
Hay muchas clasificaciones, pero se dividen en **métodos directos e indirectos**

- **Métodos directos.**

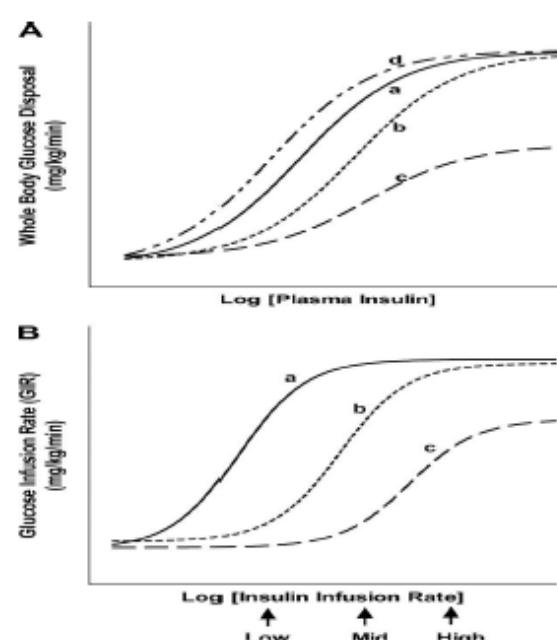
- **Clamp euglicémico-hiperinsulínico.**

Tenemos un animal al cual se le infunde **simultáneamente insulina y glucosa**. Cuanto mayor sea el flujo de insulina, **se conseguirá que la concentración circulante de insulina vaya aumentando**, pues el nivel de insulina en sangre dependerá de la insulina degradada frente a la producida o infundida.

Para evitar la hipoglucemia es necesario aumentar una infusión con glucosa al animal. Variando la cantidad de glucosa que inyecta, **se puede llevar a una normoglucemias**. La glucemia hay que mantenerla a un nivel más o menos constante, **a lo largo del experimento**.



Si el nivel de insulina es suficientemente alto, **se habrá suprimido la producción hepática de glucosa**, por lo que la glucosa que se está introduciendo será la glucosa consumida. Dependiendo de si el animal es más o menos sensible, **eso se conseguirá con más o menos cantidad de insulina**.



La concentración de insulina en plasma, será proporcional a la cantidad de glucosa que estoy inyectando. Si el individuo es resistente a insulina, **para una misma concentración de insulina**, la glucemia será mayor.

En el **caso c**, se ve cuándo la respuesta máxima a la insulina está disminuida.

El índice de sensibilidad a insulina se define como $M / (\text{glucosa} \times \Delta\text{Insulina})$

En situaciones de **resistencia a insulina**, es necesario tener en cuenta la producción **hepática de glucosa**.

M = Glucose disposal rate

GIR = Glucose infusion rate

Cuando la producción hepática de glucosa está completamente suprimida en condiciones de hiperinsulinemia, $M \approx GIR$

$SI_{\text{clamp}} = M / ([\text{Glucose}] \times \Delta[\text{Insulin}])$

Este cálculo asume una supresión completa del HGO. Esto puede no ser cierto en individuos resistentes a insulina o cuando se utilizan dosis bajas de la hormona. La HGO se puede determinar utilizando glucosa tritada. Y de ese modo se corrige el valor de M que será ahora:

$M = GIR + HGO$

El nivel estacionario de insulina alcanzado tiene que ser tal que cambios en el mismo impliquen cambios en M (no saturante)

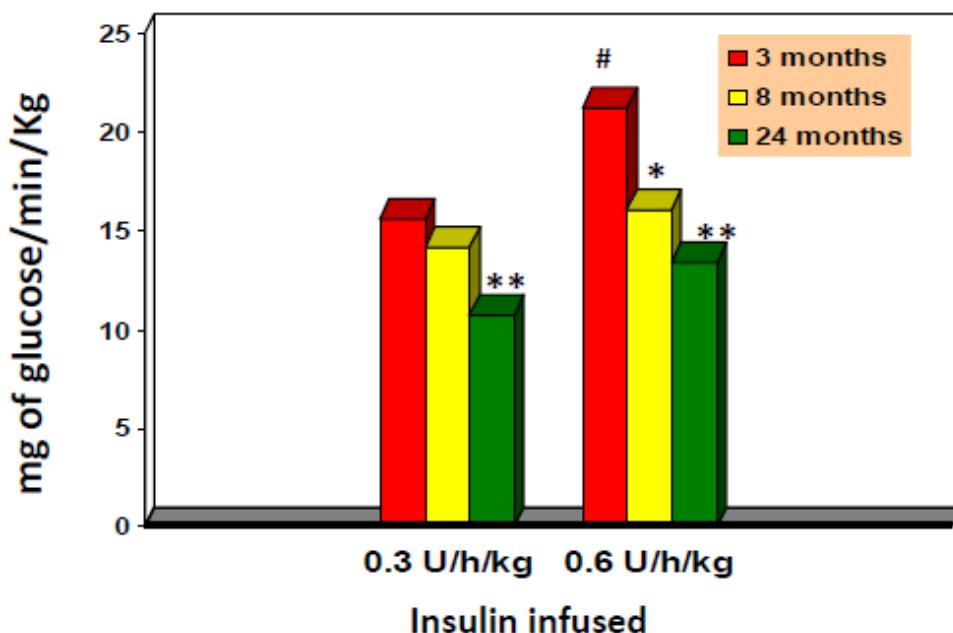
Bases Moleculares de la Patología

Diabetes y obesidad – 07-05-2019

Clamp euglicémico hiperinsulinémico

Se trata de conseguir una concentración de insulina que mantenga euglicemia, pudiendo medir así el nivel de resistencia a insulina.

Usando **dos dosis diferentes de insulina**, se mantienen dos niveles de insulinenia elevada. A las ratas de 3 meses, consumen una cantidad de glucosa mayor que las de 8 meses o 24 meses. A un determinado nivel de insulina, se produce menor consumo de glucosa (la rata es menos sensible a insulina cuando crece). Utilizando una dosis de insulina mayor, el consumo de glucosa es mayor también pero sigue esta tendencia general.

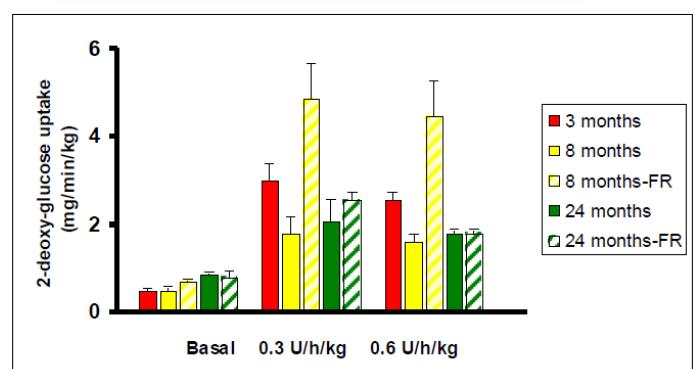


Una vez que hemos estabilizado los niveles de glucosa e insulina, podemos injectar un bolus de 2-deoxiglucosa radioactiva, pudiendo marcar el pool de glucosa con una determinada cantidad radiactiva. Tras un tiempo (1h), extraemos los tejidos del animal y analizamos cuanta glucosa se ha consumido en base a la cantidad de radioactividad que se ha incorporado al tejido.

En una muestra de tejido adiposo blanco, usando ratas de 3 meses, 8 meses y 24 meses.

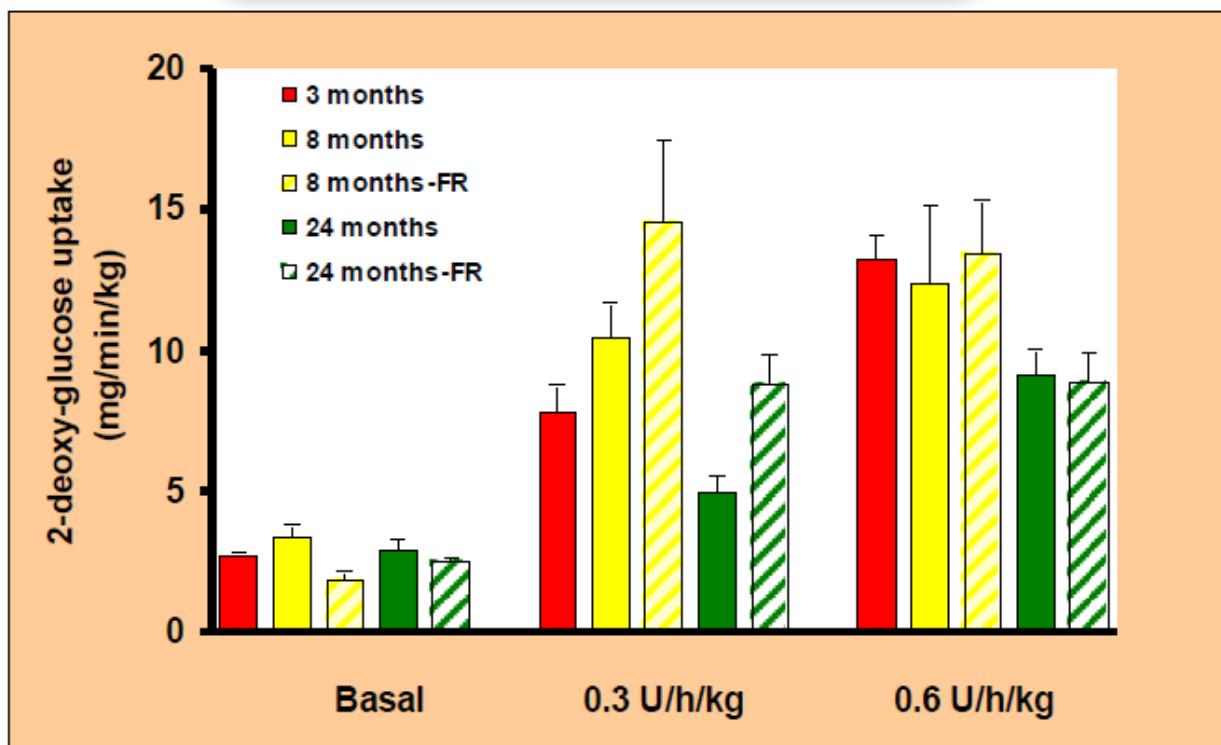
Las de 3 meses, a mayor nivel de insulina, aumenta el consumo de glucosa. Las ratas viejas de 8 y 24 meses consumen menos glucosa en el tejido adiposo. Así, el tejido adiposo no responde bien a la insulina. En restricción calórica, las ratas de 8 meses tienen una respuesta a insulina grande, que no ocurre en 24 meses. El resultado de esta restricción calórica solamente se da cuando se comienza pronto a la restricción calórica.

Tissue-specific insulin resistance
• White adipose tissue-Retroperitoneal



Esto mismo se puede hacer en el músculo sóleo, de manera **que se incrementa en la misma línea (8 meses y 24 meses)**. A los 8 meses en el sóleo, sin embargo, **no se tiene una resistencia a insulina**, pero a los 24 meses sí que ocurre.

Tissue-specific insulin resistance • Soleus

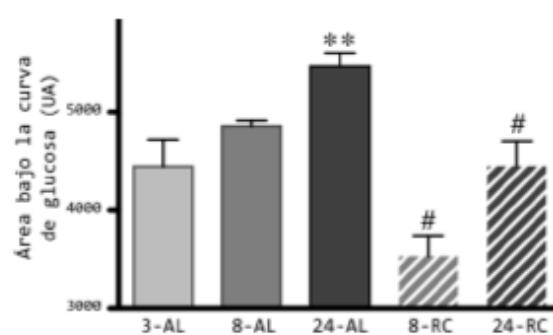


Esta técnica, nos permite detectar la resistencia a insulina y **analizar tejido a tejido su sensibilidad a insulina**, siendo el Golden Standard.

Test de tolerancia a insulina

Consiste en **inyectar una determinada dosis de insulina**. A los 10-15 minutos, se analiza cuales son los niveles de glucosa.

Teniendo en cuenta que un animal tiene un nivel de glucosa X, **inyectamos insulina y la X será menor**. Si un animal es muy sensible a insulina, el **área debajo de la curva a los 10 minutos será menor que si es poco sensible a insulina (donde se dará una bajada más pausada)**.



La rata Wistar desarrolla resistencia a insulina global a edad avanzada.

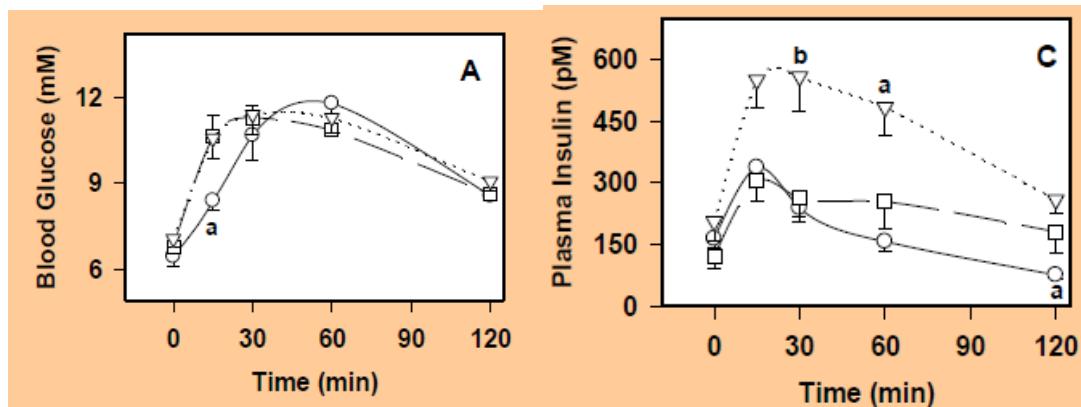
La RC mejora la sensibilidad a insulina a ambas edades.

Métodos indirectos

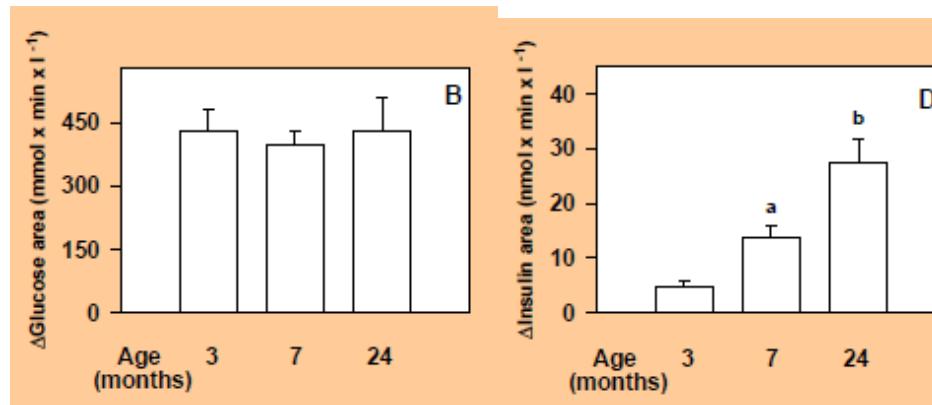
- **Test de tolerancia oral a la glucosa.** Normalmente, le dan una botella con glucosa y se mide cada X tiempo los niveles de glucemia y de insulinaemía.

Se puede **hacer también intravenosa**. El **oral** es más conveniente, pues tienen todos los factores como las **incretinas intestinales** que se liberan cuando llegan los nutrientes.

En la modificación de la glucosa, **entre ratas de 3, 7 y 24 meses, sus áreas debajo de la curva son parecidas**. No nos habla de la sensibilidad de la insulina.



La gráfica de la insulina, permite ver cómo la menor sensibilidad a insulina se compensa con una mayor secreción de la misma.

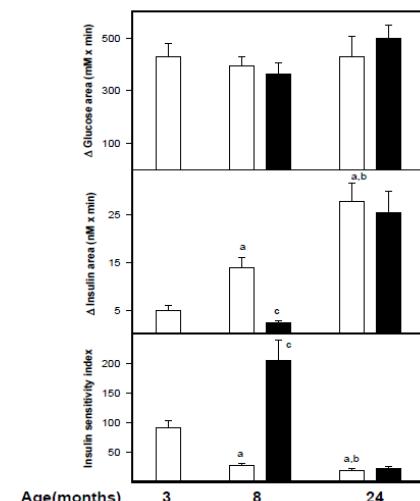


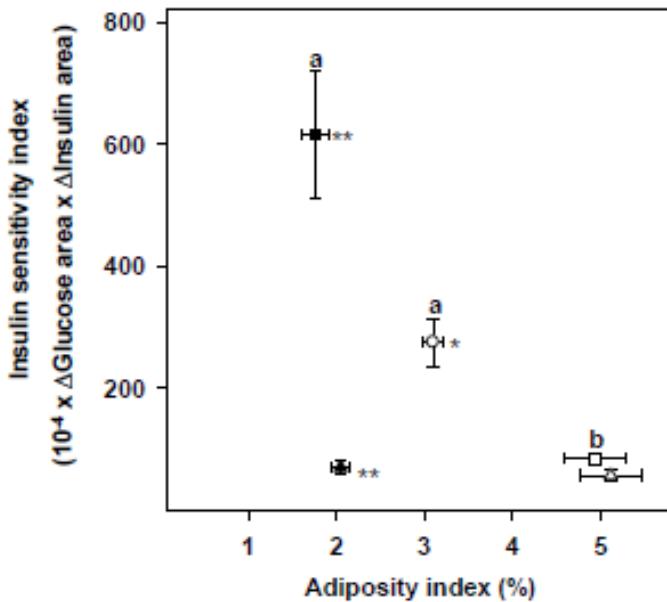
Si se hace la ratio entre el área debajo de la curva de glucosa / área debajo de la curva de insulina, esto se considera el **índice de sensibilidad a insulina, que disminuye con la edad y con el aumento de la resistencia a insulina**.

En ratas tratadas con restricción calórica a los 8 meses, se recupera el ISG, pero no a los 24 meses.

La **ISG** es un parámetro que se puede utilizar siempre y cuando el animal es glucose-tolerant.

El **índice de tolerancia insulina** está relacionado con la **adiposidad**. La adiposidad es el % del tejido adiposo blanco (retroperitoneal + epididimal) frente al peso total del animal. Cuanto mayor porcentaje de grasa, **mayor adiposidad**.





La sensibilidad a insulina **va disminuyendo con la adiposidad**. Sin embargo, **cuando se produce restricción calórica, ambas pierden adiposidad en ratas de 24 meses**, pero **en ratas de 8 meses** además **aumenta la sensibilidad a insulina**.

Homeostasis model assesment

Se utiliza **bastante en diabetología por su sencillez**. Da unos valores bastante aproximados a la realidad y comparables con **cualquiera de las otras dos técnicos**.

Podemos **calcular el nivel de resistencia a insulina o la capacidad de secreción de insulina del páncreas**, utilizando la glucosa en unidades morales como en unidades de masa.

El HOMA-IR mide el nivel de resistencia a insulina y **HOMA-β mide el nivel de capacidad de secreción de insulina del páncreas**.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glucose} \times \text{Insulin}}{22.5}$$

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glucose} \times \text{Insulin}}{405}$$

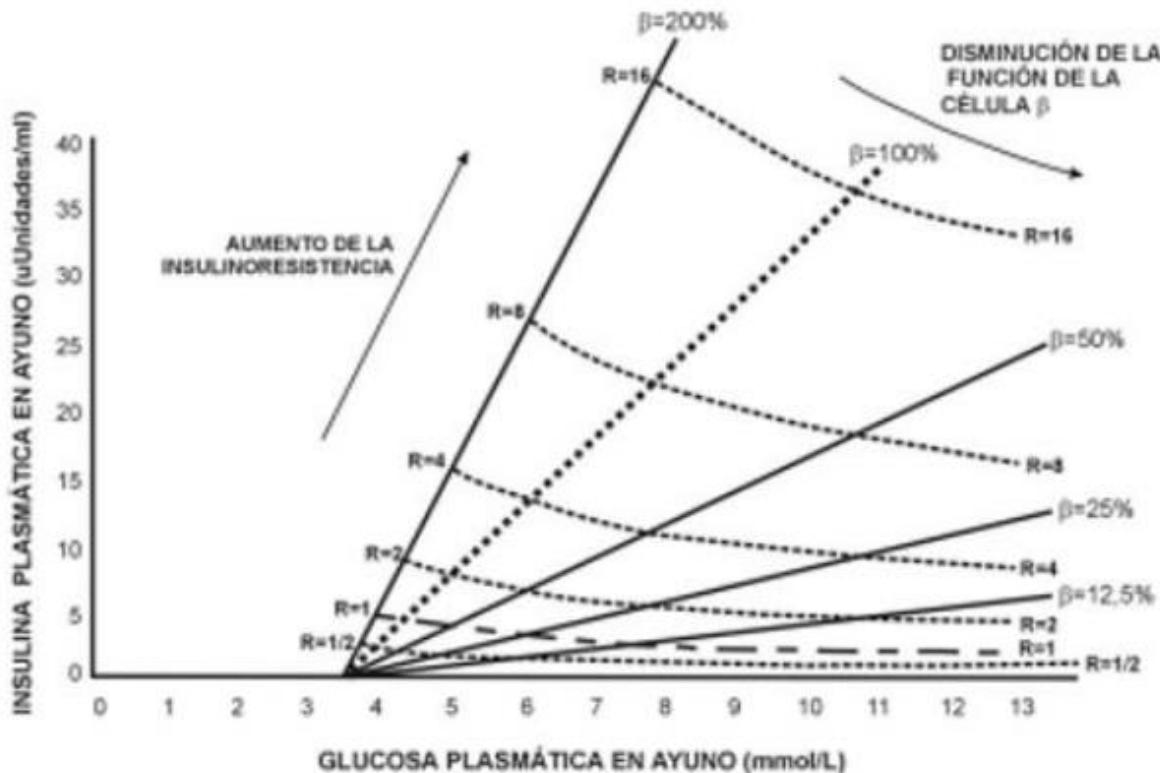
$$\text{HOMA-}\beta = \frac{20 \times \text{Insulin}}{\text{Glucose} - 3.5} \%$$

$$\text{HOMA-}\beta = \frac{360 \times \text{Insulin}}{\text{Glucose} - 63} \%$$

Glucose in Molar Units
mmol/L

Glucose in mass units
mg/dL

IR is insulin resistance and % β is the β -cell function.
Insulin is given in mU/L.
Glucose and Insulin are both during fasting.



Terapia celular

Una de las posibilidades terapéuticas es la adquisición **de células ingenierizadas y transformadas para producir insulina**.

Hay **diversas estrategias**:

- A través de **islotes pancreáticos procedentes de donantes fallecidos**. Sin embargo, la demanda supera la disponibilidad.
- Obtener **células madre que se transformen en islotes pancreáticos o hacerlas a través de iPSCs**. Así, **tendríamos disponibilidad casi infinitas**, y podrían incluso ser propias de individuos.
- **Células somáticas programadas sintéticamente, que permitan disponer de insulina**.

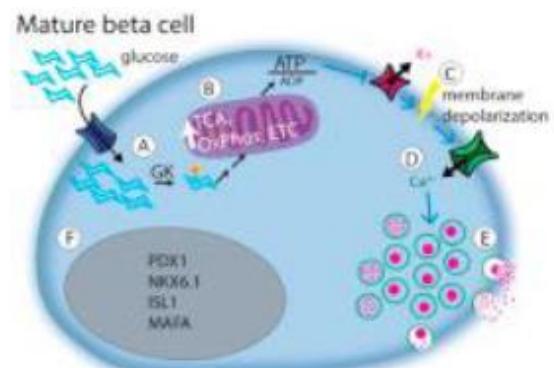
Cada una tiene pros y contras.

- **Islotes pancreáticos**

- **Pros.** El nicho que promueve el islote se mantiene.
- **Contras.** Heterogeneidad genética y suministro disminuido debido al bajo número de donantes de órganos.

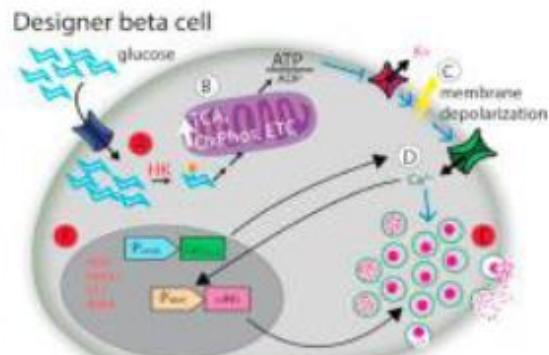
- **Stem-cell derived**

- **Pros.** Específicas del paciente y pueden ser modificadas genéticamente.
- **Contras.** No se ha conseguido que controlen de manera adecuada los niveles de glucosa en pacientes humanos, todavía.



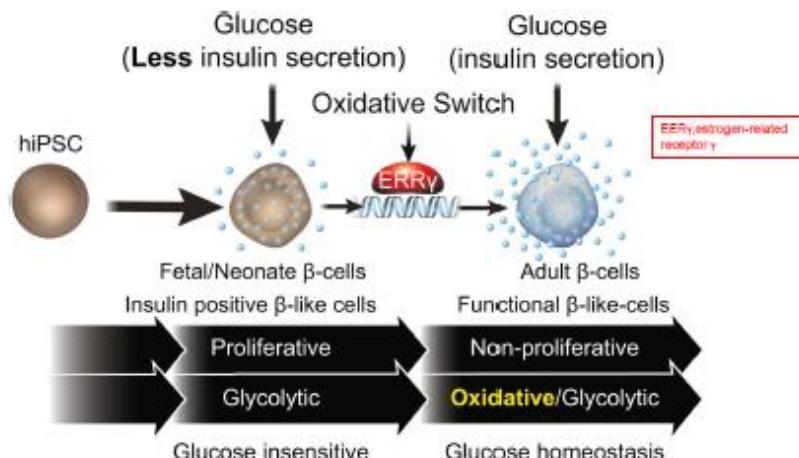
- Diseñadas

- **Pros.** Ilimitadas. Permiten hacer investigación con ellas.
- **Contras.** No se ha conseguido tener una célula que tenga una buena secreción de insulina en base a los niveles de glucosa y no se sabe cuáles podrían ser sus efectos a largo plazo.

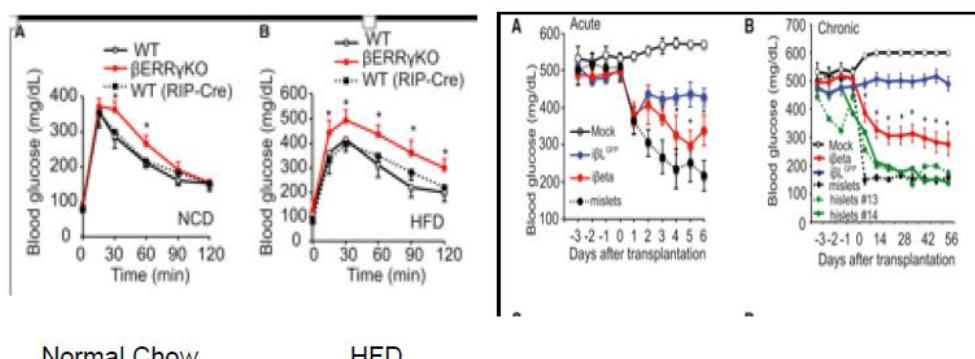


Unas células HEK293 con expresión constitutiva de un canal de Ca^{2+} , el transgen es sensible a calcio e incluye el gen de la insulina. Se reproduce el sistema de producción de insulina en respuesta a glucosa. Se puede mejorar el sistema introduciendo una glucoquinasa, por ejemplo.

Otro trabajo hecho con iPSCs muestra que se puede generar un tipo de célula β fetales o neonatales. Estas células, nunca han valido para secretar insulina. Tienen gránulos de insulina, **pero sin embargo son fundamentalmente glicolíticas**, faltándoles un fenotipo de fosforilación oxidativa.



En este trabajo, demonstraron que el ERRy, un factor de transcripción, es el fundamental (oxidative switch) es el que cambia las células de su fenotipo glicolítico a su fenotipo oxidativo/glicolítico. Estas células sí serían funcionales, capaces de secretar insulina en respuesta a glucosa.



Al ver el efecto que tiene sobre ratones **se consigue revertir el fenotipo**. En una situación de dieta grasa, **los KO para este factor tienen una intolerancia**. Al introducir las células, **se recuperan los ratones parcialmente**.

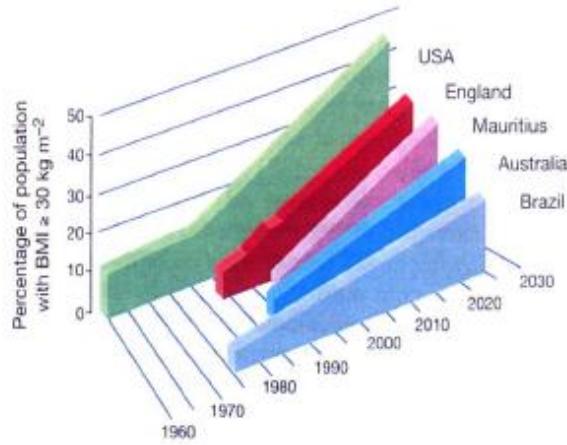
Obesidad, resistencia a insulina y diabetes de tipo II

La obesidad se define a día de hoy en base al **índice de masa corporal**. Es utilizado por los clínicos, para determinar el grado de susceptibilidad a distintos problemas metabólicos.

BMI (Kg/m ²)	Clasificación de la OMS	Denominación común
< 18.5	Bajo de peso	Delgado
18.5 - 24.9	Normal	Saludable, aceptable, normal
25 - 29.9	Grado 1 de sobrepeso	Gordo, relleno
30 - 39.9	Grado 2 de sobrepeso	Obeso
> 40	Grado 3 de sobrepeso	Obeso mórbido

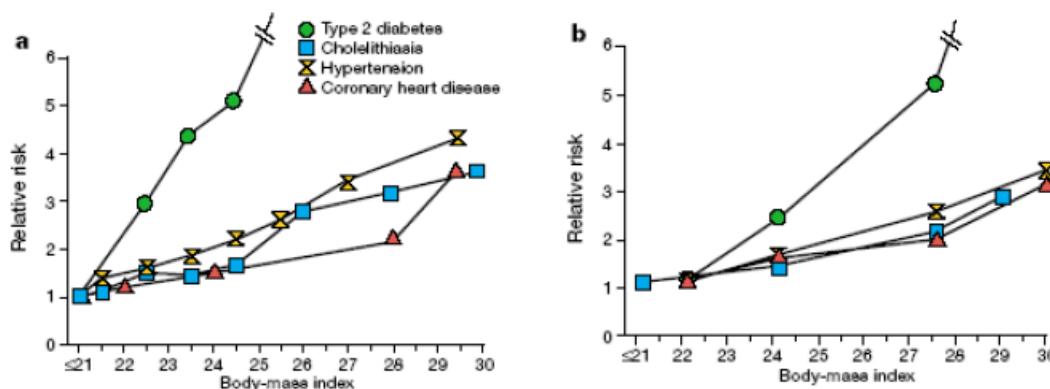
La obesidad se ha convertido en una epidemia. El incremento ha sido dramático desde los años 80 del siglo pasado. Los hábitos alimentarios han cambiado de tal manera que hay una prevalencia de obesidad exagerada.

Un incremento tan rápido de la prevalencia no puede deberse a cambios genéticos. Lo más probable es que el fondo genético que predispone para la obesidad estuviese ya presente en grandes poblaciones humanas y que ha bastado la presencia de un exceso de calorías para disparar la situación de obesidad.



Algunas vías lo vinculan a un cambio en la microbiota asociado.

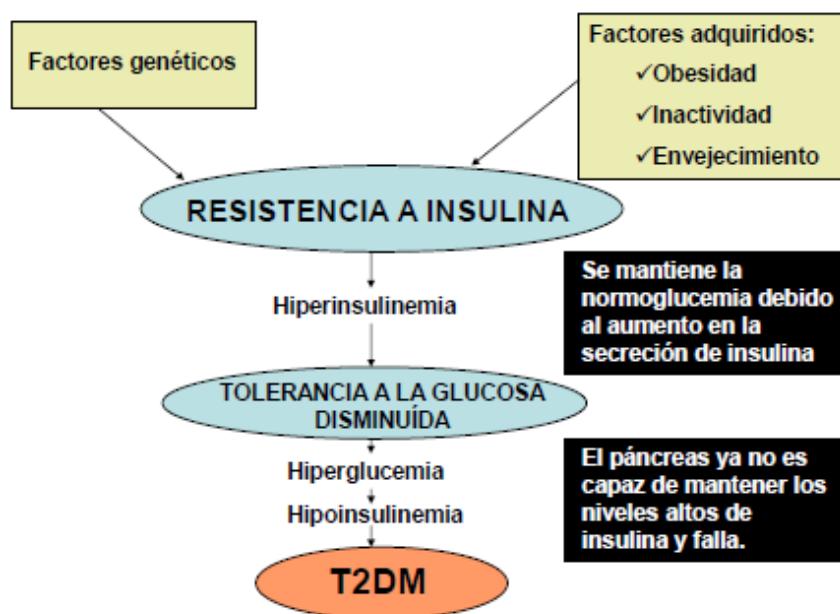
Hay una relación entre el BMI y el riesgo relativo de padecer diabetes de tipo 2 entre otras enfermedades.



Bases Moleculares de la Patología

Obesidad y diabetes tipo II – 08-05-2019

Hay varios factores que desencadenan la diabetes de tipo II. La obesidad está **altamente relacionada con ella**.



- **Importancia de los ácidos grasos.** Los ácidos grasos circulantes **inducen resistencia a insulina globalizada**. Esto se ha comprobado incluso en ausencia de obesidad.

La inhibición farmacológica de la lipólisis mejora la sensibilidad a insulina y disminuye FFA en sangre.

- Una homeostasis de glucosa y una sensibilidad a insulina normales requieren la presencia de tejido adiposo blanco, en una proporción adecuada al tamaño corporal.

Estos individuos sin tejido adiposo son también **resistentes a insulina**. Es necesario tener un órgano que actúe de **buffer de las grasas circulantes**. Se ha visto en casos de **lipodistrofias o carencia de adiponectinas**.

Tanto la obesidad como la lipodistrofia son perjudiciales para la salud.

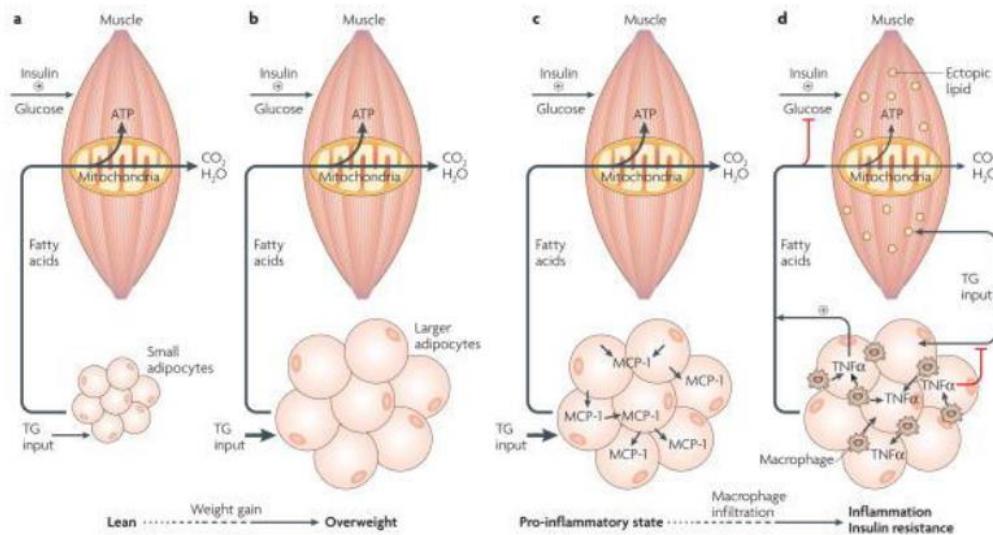
El tejido graso no solo es un reservorio de energía, sino que es un órgano endocrino, que secreta toda una serie de factores denominados adiponectinas, desempeñando estas una serie de funciones fisiológicas en el organismo fundamentales para mantener la homeostasis.

- La relación entre **obesidad y resistencia a insulina** se debe muy esencialmente a un proceso de inflamación.

El tejido adiposo es un tejido donde se acumulan triglicéridos, con un ciclo de formación y destrucción. Los ácidos grasos son consumidos por los tejidos que lo usan como fuente de energía (músculo, corazón...). Esto ocurre en un individuo normal.

Conforme vamos ganando peso, cuando el tejido va aumentando se produce una **hipertrofia de los adipocitos**, que **aumentan el tamaño de sus gotas lipídicas y aumentan de tamaño**. Si esta situación se vuelve crónica, se produce un estado pro-inflamatorio.

Los adipocitos comienzan a modificar su expresión génica, produciendo el factor **MCP-1**, una proteína **quimioatravante de los monocitos (monocyte chemoattractant protein-1)**, produciéndose una **infiltración de macrófagos** que transita hacia una **situación de inflamación propiamente dicha**.



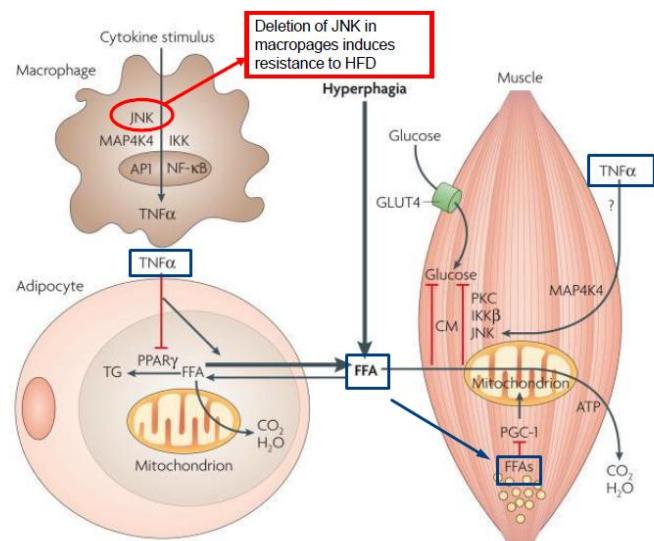
El tejido adiposo en situación de **inflamación por TNFα** no acumula triglicéridos, produciéndose una **liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo que interfiere con la captación de glucosa**. El TNFα **impide que se active la LPL**, con lo cual los triglicéridos da lugar a la deposición ectópica de grasa.

Así, se produce un primer paso de resistencia a insulina.

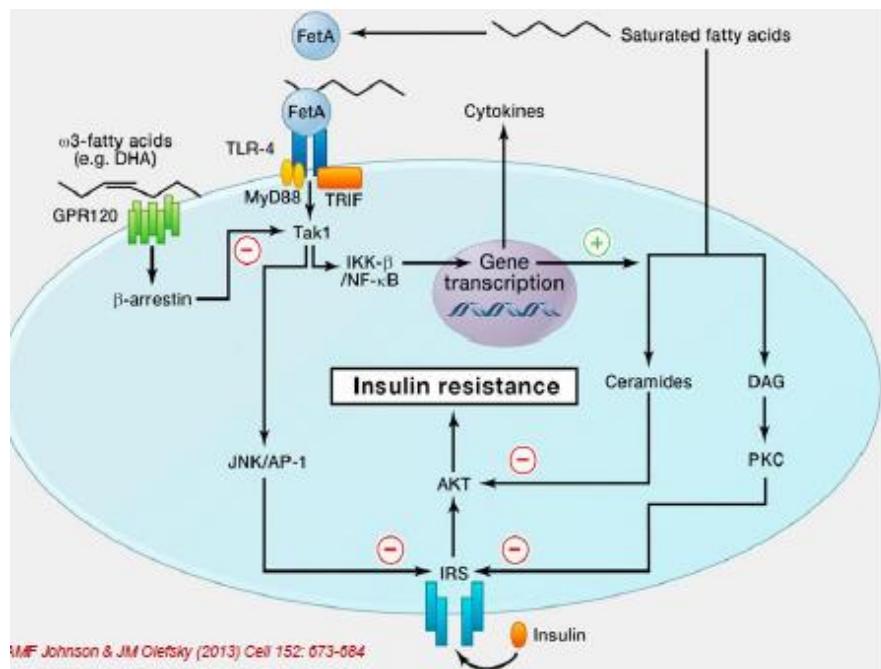
El factor fundamental es el **PPAR γ** . Es un factor de transcripción **lipogénico**, promoviendo la expresión de todos los genes lipogénicos (ACC, FASN, etc). El **TNF α** , al **bloquear el PPAR γ** , promueve que el ciclo se desplace más hacia los ácidos grasos que quedan libres para llegar hacia el músculo.

Este TNF α se produce por toda una serie de vías de señalización **ante un estímulo por parte de citoquinas, con participación de la JNK quinasa**. En los animales deficientes de JNK en macrófagos, **induce la resistencia a dietas grasas**.

Los ácidos grasos **interfieren en el transporte de glucosa mediado por insulina**. El TNF α también **induce una serie de quininas que interfieren en el metabolismo de glucosa**. Los FFAs además, **bloquean el PGC-1**, factor que está implicado principalmente en la generación de mitocondrias, disminuyendo su degradación y estando para otras vías.



Los ácidos grasos saturados, **forman DAG que estimula a PKC**, que inhibe a los **IRS**, inhibiendo la acción de insulina. También **forman ceramidas**, que inhiben a nivel de **Akt**.



Los ácidos grasos saturados se unen a la proteína **FetA**, que estimula el **TLR4** que por su vía de señalización activa a **JNK** (modulando negativamente a **IRS**) y dando lugar por otro lado a **un programa de transcripción génica que da lugar a la expresión de determinadas citoquinas**.

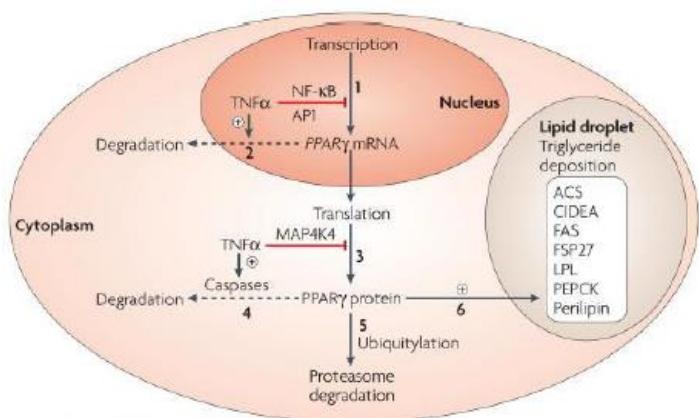
No obstante, los ácidos grasos ω3 tienen un receptor propio, el GPR120, que a través de la **β arrestina** es capaz de oponerse a la acción de ácidos grasos saturados. Así, la relación saturados/insaturados se oponen a la resistencia a insulina.

En la célula adiposa, **TNFα** actúa a todos los niveles. La diana de TNFα fundamentalmente es el PPARy. Puede bloquearlo a muchos niveles:

- Bloquea la transcripción del gen PPARy
- Está postulado, que favorece la degradación del mensajero.
- Inhibe la traducción de su mensajero por MAP4K4 y estimula la degradación de PPARy por medio de caspasas

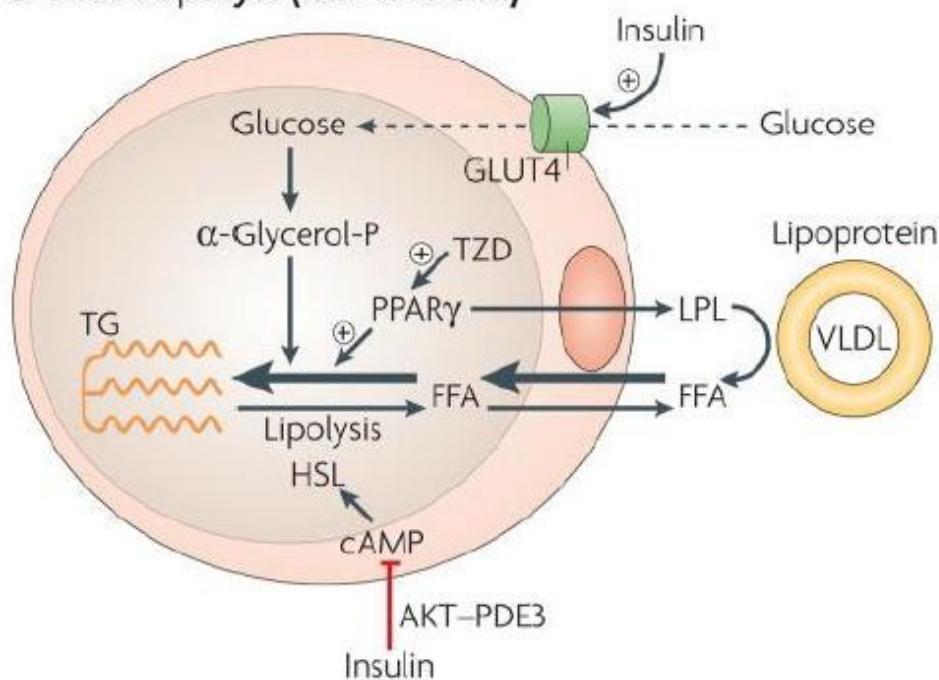
PPARy es un factor lipogénico, por lo tanto, en presencia de **TNFα**, dejan de expresarse los genes que están relacionados con él:

- ACS, FASN
- CIDEA, Perilipina, FSP27. Mantienen la estabilidad de la gota lipídica, siendo una proteína de tipo anfipático.
- PEPCK. Es una proteína gliceroneogénica. Esta proteína no se sintetiza en el adipocito en situación inflamatoria, no siendo capaz de acumularse ácidos grasos.



En individuos normales:

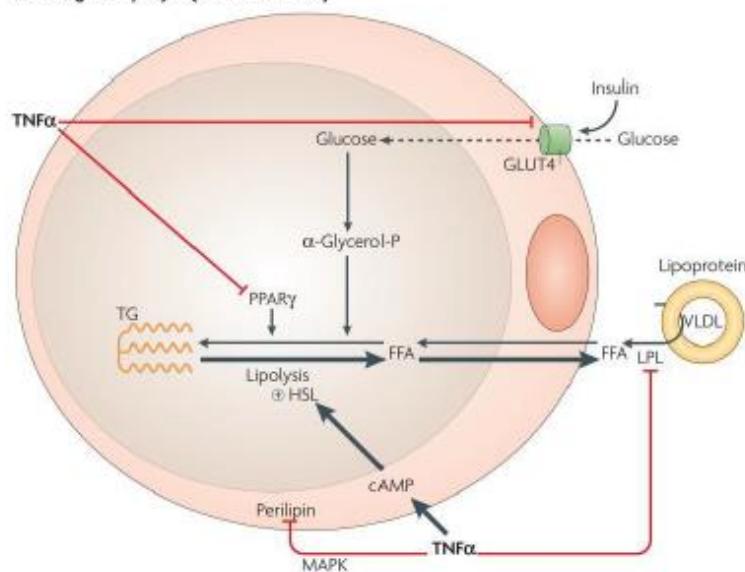
a Small adipocyte (lean condition)



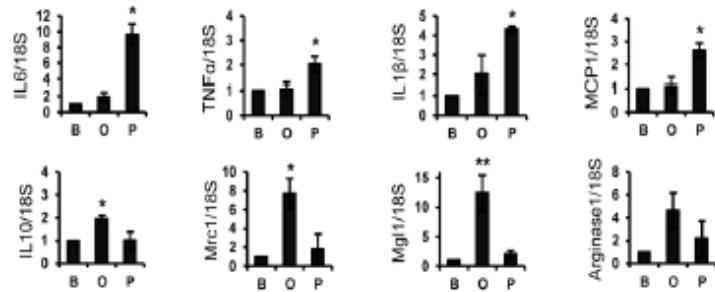
En individuos inflamatorios:

- **Niveles altos de TNFα**
 - Bloquea el **transporte de glucosa por GLUT4, bloqueando la señal de insulina**
 - Bloqueo de **PPARγ**
 - Favorece la formación de cAMP, inhibiendo la Gαi y con ello la PKA y la activación de la HSL, produciendo lipólisis
 - Inhibe la **perilipina por medio de la MAPK**, de manera que la lipasa sensible a hormonas tiene un mayor acceso a la gota lipídica.

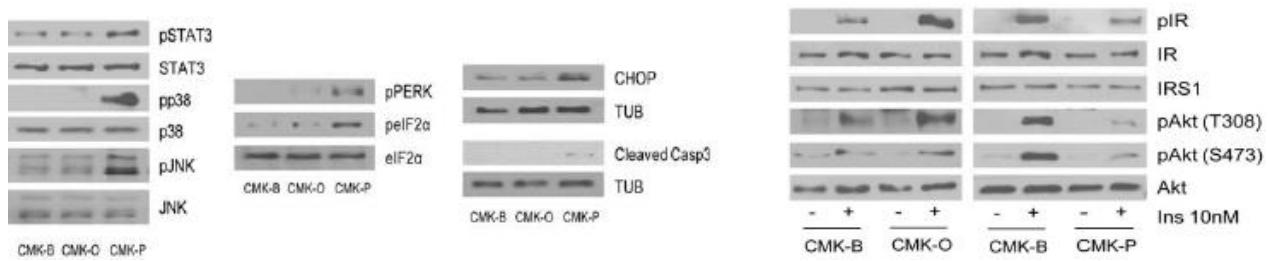
b Enlarged adipocyte (obese condition)



En situación de obesidad, el hígado también estimula los macrófagos (tanto reclutados como residentes, células Kupffer). Si se incuban con ácidos grasos, se producen distintos factores, dependiendo del tipo de ácido graso.



La estimulación con ácidos grasos saturados producen incremento de factores inflamatorios. Los factores anti-inflamatorios se estimulan más con ácidos insaturados.



Incubando el medio condicionado por estos macrófagos con hepatocitos, se ve cómo hay aumento de proteínas inflamatorias. Los ácidos grasos saturados generan también resistencia a insulina en las células hepáticas gracias a estos macrófagos.

Mecanismos moleculares del control del balance energético

Todos los individuos tienen una serie de **reservas energéticas**. Las reservas de energía responden al balance entre energía consumida y capturada.



La captación de energía en **animales es debida a la ingesta**. El consumo de energía es tremendo:

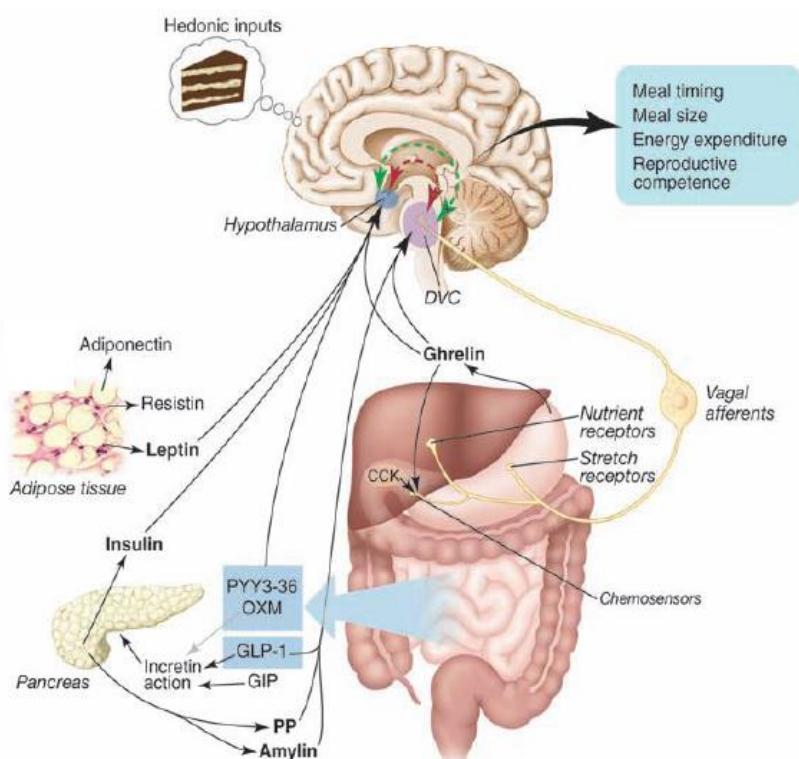
- **Metabolismo basal**
- **Termogénesis**
- **Actividad física**

Los animales estamos dotados de **sistemas homeostáticos que nos permiten mantener de manera más o menos estables las reservas de energías**. Estos sistemas homeostáticos son capaces de responder ante **variaciones agudas de este balance**. Estos mecanismos homeostáticos, nos permiten **variar el apetito y modificar el metabolismo basal**.

Si permanentemente tenemos una **variación crónica**, se puede dar una **obesidad o de anorexia/caquexia**. La regulación del balance energético **está sesgada hacia la conservación del límite superior de reservas energéticas**.

La supervivencia **está en la base evolutiva de este sesgo**. La adaptación resulta **perjudicial en un ambiente de abundancia calórica**.

Sabemos que el control de la homeostasis energética tiene que ver entre una comunicación permanente **entre la periferia y el SNC**. Hoy en día sabemos que **el hipotálamo es el receptor de infinidad de señales que proceden de la periferia** (tejido adiposo, páncreas y tracto gastrointestinal) que **producen factores que producen la modulación**. Estos factores se dividen en:



- **Señales de adiposidad.** Nos dan una idea general del estado energético del organismo. Leptina e insulina. Ambas actúan a nivel hipotalámico, y actúan también a nivel sistémico.
- **Señales de corto plazo.** Orexigénicas como la grehlina o anorexigénicas como el GLP-1 o la CCK.
- Señales nutricionales como glucosa o los ácidos grasos, que reflejan el estado nutricional del organismo y que modulan el apetito, el peso corporal y el metabolismo hepático.

Esto se solapa con los hedonic inputs, es decir, **el apetito y el balance de la homeostasis energética en general no sólo están modulados por los niveles de estas sustancias en el organismo**, sino que además hay un componente emocional importante que es capaz de modificarlos.

Bases Moleculares de la Patología

Control de la homeostasis energética – 09-05-2019

Leptina como factor lipostático

La teoría lipostática se describe durante la segunda mitad del siglo XX. El hipotálamo es identificado como un área implicada en el control del balance energético y se genera una teoría lipostática, en la que los propios niveles de grasa son capaces de autorregularse. En 1994 se clona el gen ob y en 1995 el gen db. Durante el siglo XXI se realizan estudios genéticos y optogenéticos. Hay ciertas evidencias científicas que apoyan que la leptina funciona como un adipostato:

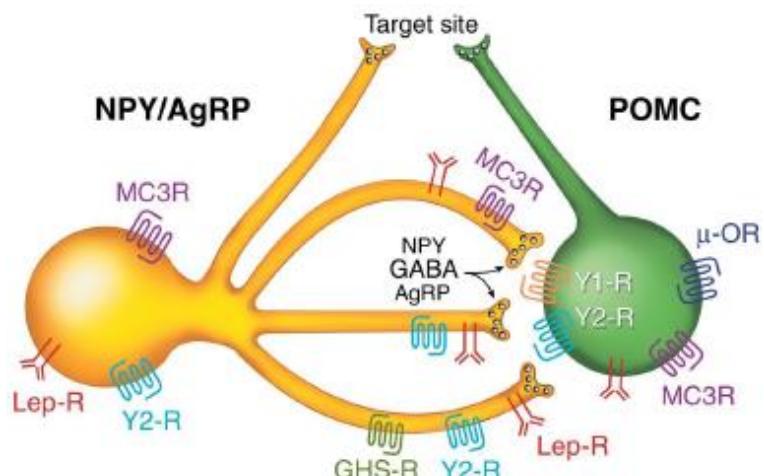
- Sus concentraciones son proporcionales a las reservas grasas, con la única excepción del ratón ob/ob, que carece de un gen de leptina que dé lugar a proteína funcional
- La leptina es transportada por la BBB y hay receptores de la misma en el hipotálamo, habiendo receptores en diversos núcleos hipotalámicos además de en neuronas del **núcleo del tracto solitario**.
- La administración de leptina induce disminución de ingesta y de peso corporal (salvo en obesos, que tienen resistencia a leptina). Además, incrementa el gasto energético.
- La obesidad en ratones ob/ob se corrige mediante administración de leptina
- Los ratones sin receptores de leptina sufren obesidad severa que no se corrige con leptina.

Modelo de control del comportamiento alimenticio y la homeostasis energética

La investigación se centró en el núcleo arcuato del hipotálamo pero posteriormente se ha extendido a más zonas. En el núcleo arcuato estaría el sitio fundamental de la homeostasis energética.

Se postula como el “modelo ying-yang” del control del apetito y la homeostasis energética. Se basa en la existencia de **dos tipos neuronales**, con receptores de leptina, sensibles a leptina:

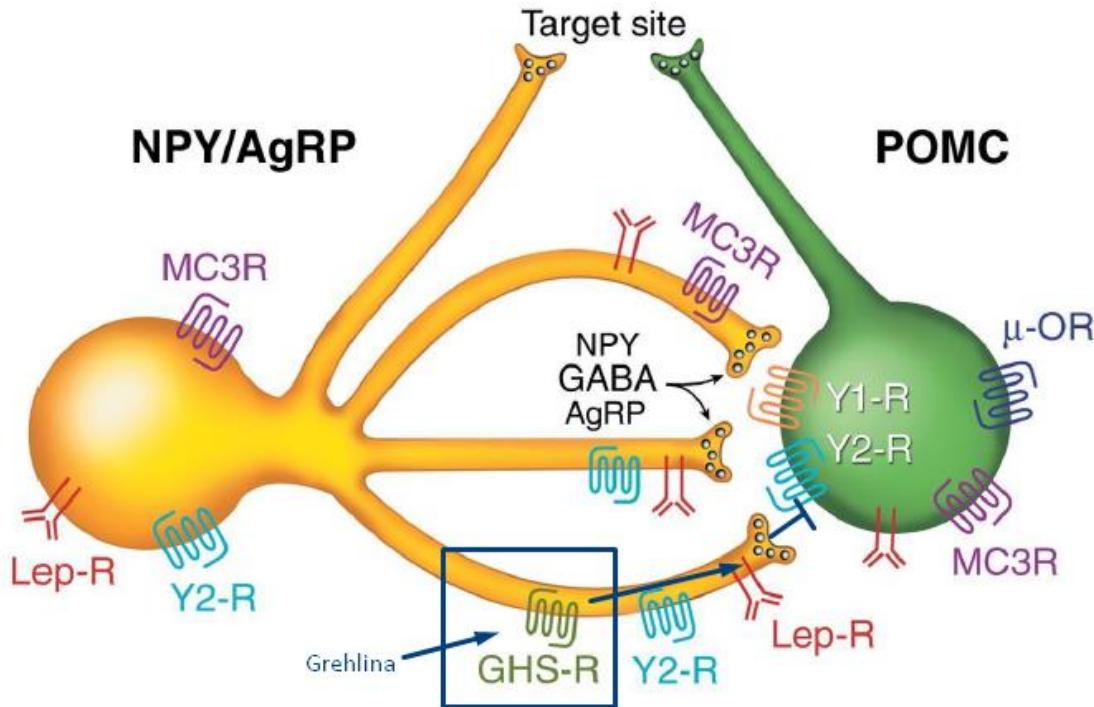
- Un tipo neuronal produce pro-opiomelanocortina que dará lugar a α -melanocortina. Estas son denominadas **neuronas anorexigénicas**, producen falta de apetito y se activan por leptina.
- Un tipo neuronal que produce el NPY/AgRP. Estas son denominadas **neuronas orexigénicas** y se inhiben por leptina.



Las neuronas que secretan POMC son anorexigénicas (producen falta de apetito) pues secretan α -MSH y las NPY son orexigénicas (producen apetito).

Las neuronas orexigénicas son productoras de GABA y controlan a las anorexigénicas, manteniéndolas inhibidas tónicamente. Esto explica el pequeño sesgo acumulatorio que tenemos los mamíferos hacia la ingesta.

El receptor de grehlina se encuentra en las células productoras de NPY/AgRP, orexigénicas. La activación de estas neuronas por la unión de la grehlina a sus receptores en los axones produce una inhibición sobre las neuronas anorexigénicas productoras de POMC.



El sistema se jerarquiza. Las neuronas del núcleo arcuado, tanto orexigénicas como anorexigénicas, proyectan sus axones hacia **neuronas de segundo orden** que se encargan de la producción de hormonas que modulan el comportamiento alimenticio del individuo. Así:

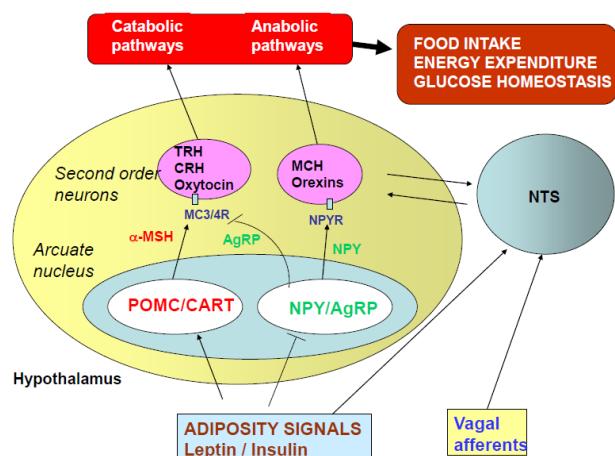
- Las neuronas de **segundo orden** controladas por las **neuronas POMC** (anorexigénicas) se activan por la unión del α -MSH a los receptores MC3/4R. Su activación, produce la producción de TRH, CRH y oxitocina, hormonas que modulan las vías catabólicas.

Contienen también **receptores de tipo inhibitorio** que son activados por la AgRP secretada por las neuronas orexigénicas.

- Las neuronas de **segundo orden** controladas por las **neuronas NPY/AgRP** (orexigénicas) se activan por la unión del NPYR al NPY. Su activación, produce la producción de MCH y orexinas, que controlan vías anabólicas.

Los aferentes del nervio vago modulan el núcleo del tracto solitario. Las señales de adiposidad como leptina también tienen receptores en el NTS.

El NTS está conectado con neuronas secundarias u otras neuronas dentro del organismo de tal manera que se produce una respuesta integradora, que se traduce en los fenómenos fisiológicos de ingesta, gasto energético y la homeostasis de glucosa.

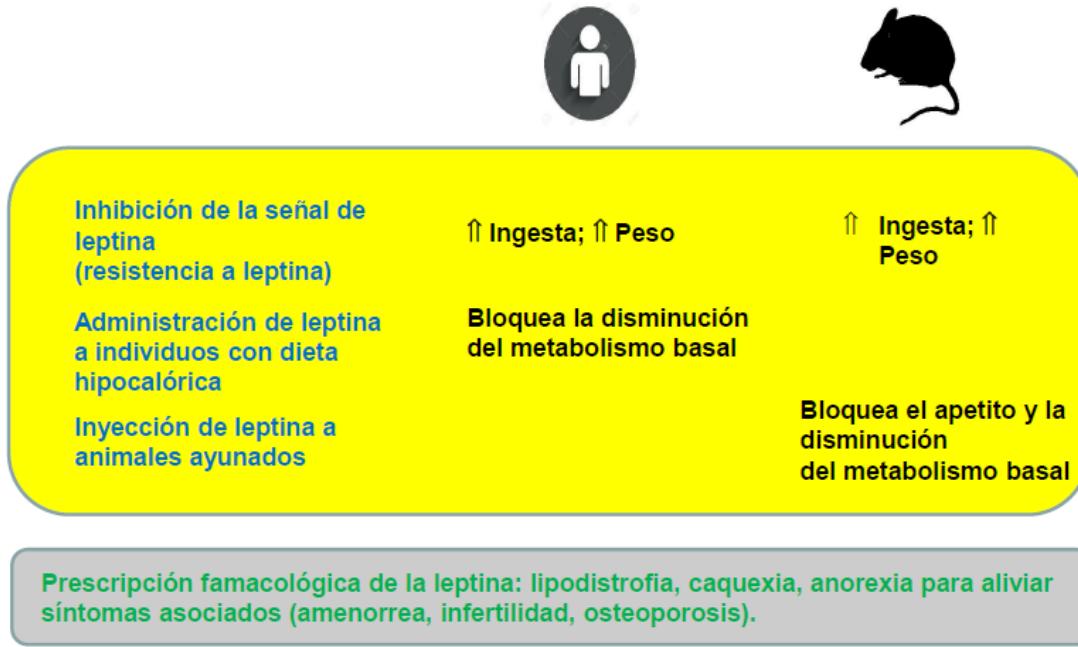


La leptina como adipostato (II)

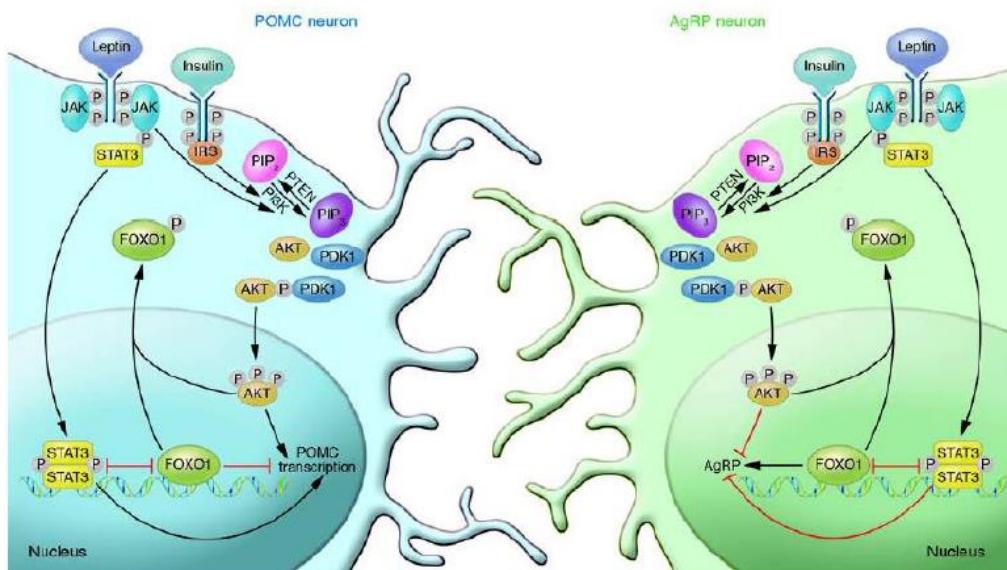
La leptina es la forma en la que el organismo “se entera” de las reservas grasas. Si se inhibe la señal de leptina, aumenta la ingesta y el peso.

Si se administra leptina a individuos con dieta hipocalórica, se bloquea la disminución del gasto energético.

Se prescribe farmacológicamente leptina en lipodistrofia, caquexia y anorexia para aliviar síntomas asociados. Podría ser una posibilidad, sí que se ha recomendado en lipodistrofia.



La insulina también tiene receptores en las NPY y las POMC. Actúa por PI3K y AKT, promueve la transcripción de POMC y al mismo tiempo inhibe la inhibición de la misma por FOXO. STAT3 también bloquea la acción de FOXO.



En las neuronas NPY se bloquea la transcripción de AgRP mediada por FOXO.

Efecto de eliminar el receptor de insulina

Si se elimina el receptor de insulina en las neuronas del hipotálamo, no hay cambios en el comportamiento alimentario. Se vuelven un poco hiperfágicos pero no mucho, no como en el caso de la leptina.

Su eliminación en las neuronas orexigénicas, bloquea el efecto de la insulina sobre la producción hepática de glucosa. El HGO tiene un componente del SNC.

Su eliminación en neuronas POMC tiene que ver con la actividad locomotora y el gasto energético en general, pero no influye en la modulación por insulina del HGO.

Efecto de eliminar el Receptor de Insulina

- Pocos cambios en el comportamiento alimentario
- Su eliminación en neuronas AgRP/NPY bloquea el efecto de insulina sobre la HGO y su activación de nuevo revierte el efecto
- Su eliminación en neuronas POMC tiene que ver con la actividad locomotora y el gasto energético, pero no influye en la modulación por insulina del HGO

Efecto de eliminar el receptor de leptina

Si se elimina el receptor de leptina:

Ratones hiperfágicos. Comportamiento alimentario.

- En neuronas POMC se observa obesidad, no tan dramática. No nos basta con carecer de respuesta anorexigénica.

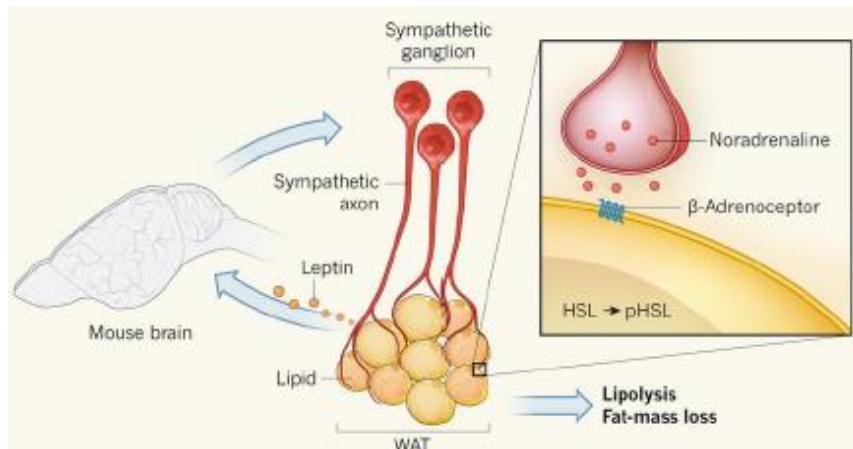
Efecto de eliminar el Receptor de Leptina

- Los ratones ob/ob y db/db son obesos e hiperfágicos
- La eliminación selectiva en neuronas POMC induce una obesidad menor que la de ratones db/db. Se observa una disminución del gasto energético pero no hay variaciones en la ingesta. La reactivación mejora la sensibilidad a insulina y disminuye el HGO en ausencia de variaciones en los niveles de insulina.

Acción de la leptina en reservas de grasas:

- Leptina es un factor lipostático, tiende a disminuir la reserva grasa.. Señal simpática noradrenérgica son las responsables de las respuestas lipolíticas.

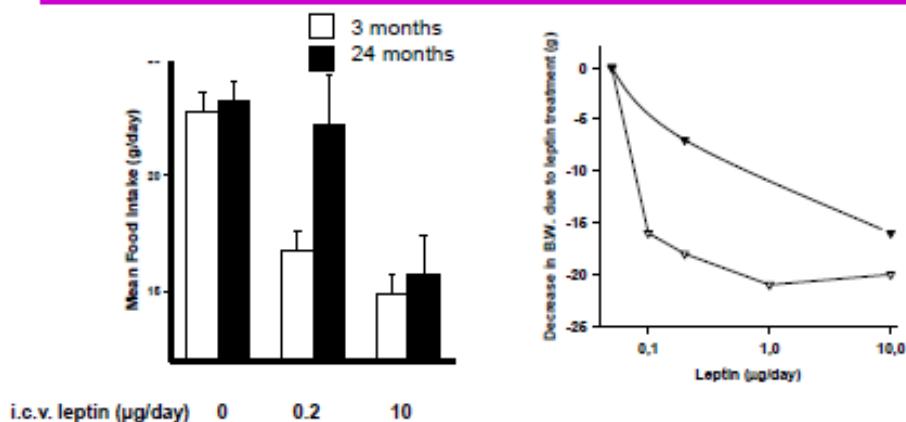
La leptina es un sensibilizador a insulina del organismo tradicionalmente. Esto es cierto salvo en el tejido adiposo, donde produce resistencia a insulina.



Diferenciar entre respuestas periférica y central. Se inyecta **leptina directamente en el cerebro** (intracerebroventricular). Infusión disminuye la ingesta. Las ratas jóvenes bajan más de peso y las ratas viejas tienen un metabolismo basal más lento.

TESTING LEPTIN RESISTANCE

Effect of i.c.v. infused leptin on food intake and body weight in Wistar rats



Receptores de melanocortina MC4R

La α melanocortina tiene un papel importante. La mayor parte de los casos de obesidad genética son defectos en el receptor de la melanocortina 4. Un análogo de la α -MSH suprime la ingesta en ratones.

RECEPTORES DE MELANOCORTINA MC4R

Pruebas de su implicación en el control de la ingesta

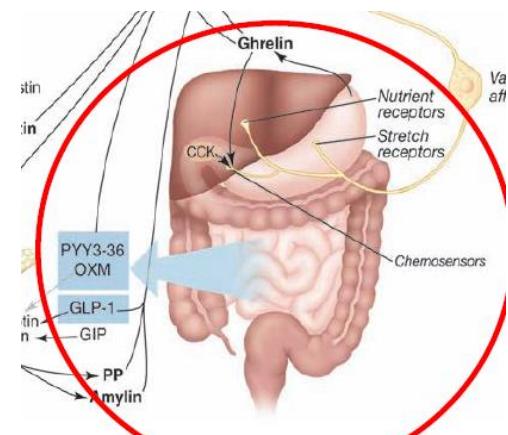
- ✓ La forma más común de obesidad asociada a hiperfagia se asocia con mutaciones en dicho receptor
- ✓ La inyección icv de Melanotan II, análogo de α -MSH, suprime la ingesta en ratones
- ✓ La inyección de un antagonista de MC4R produce un incremento de la ingesta
- ✓ Ratones ko para el MC4R tienen fenotipo obeso, hiperfágico, hiperglucémico e hiperinsulinémico
- ✓ AgRP es antagonista del receptor y su inyección icv promueve la ingesta
- ✓ El ko de AgRP apenas tiene fenotipo ya que las neuronas siguen produciendo NPY, factor orexigénico

Señales de hambre y saciedad

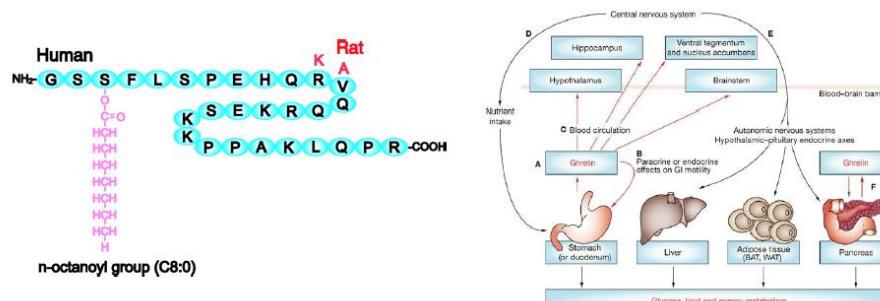
- Grehlina único péptido orexigénico, se secreta en células del estómago, modulando el apetito directamente sobre las neuronas orexigénicas, inervando el nervio también vago por esas terminaciones.

Se octanoila para ser activo.

El receptor de grehlina se expresa también en el hipotálamo, no en las neuronas POMC sino solo en las NPY. Deficientes en el receptor de grehlina, pierde el apetito.

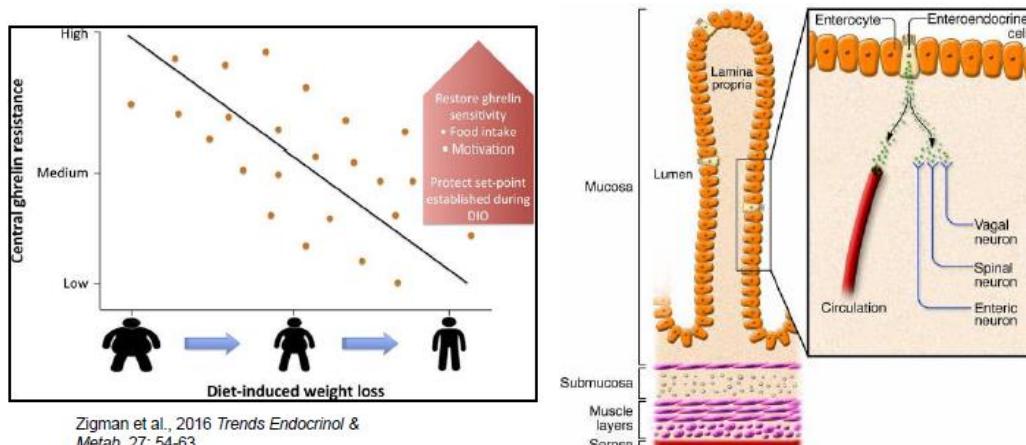


Guarda una relación con largo plazo. Niveles circulantes de grehlina inversamente con masa magra. El organismo puede detectar si hay o no músculo.



- ❑ El receptor de grelina es el GHSR; se expresa en las mismas regiones en las que lo hace el de leptina.
- ❑ Los ratones deficientes en GHSR son hipofágicos y almacenan poca grasa cuando se les somete a una HFD. Al mismo tiempo tienen una gran actividad locomotora y una extraordinaria homeostasis de glucosa.
- ❑ La grelina aumenta durante el ayuno y disminuye tras la ingesta. También aumenta en situaciones de restricción calórica prolongada como en los individuos sometidos a dieta, y su disminución tras la ingesta es inferior en obesos.
- ❑ Los niveles circulantes de grelina guardan una relación inversa con la masa magra. Todo ello permite afirmar que la grelina no es sólo un factor de regulación a corto plazo, pero tiene más que ver con el peso en general que con las reservas grasas.

Puede haber resistencia a grehlina, que está muy relacionada con el peso del individuo.



- CCK en enteroendrocrinas del epitelio intestinales que generan CCK y GLP-1 que pueden ir a circulación o a neuronas del nervio vago, espinales y entéricas.
 - Las del nervio vago conectan con el STN
 - CCK manda saciedad hacia el NTS. Inhibe la producción hepática de glucosa inhibiendo la producción hepática del hígado a través de otra señal procedente de NTS. La dieta grasa influye a los receptores de CCK-AR en las neuronas del nervio vago.

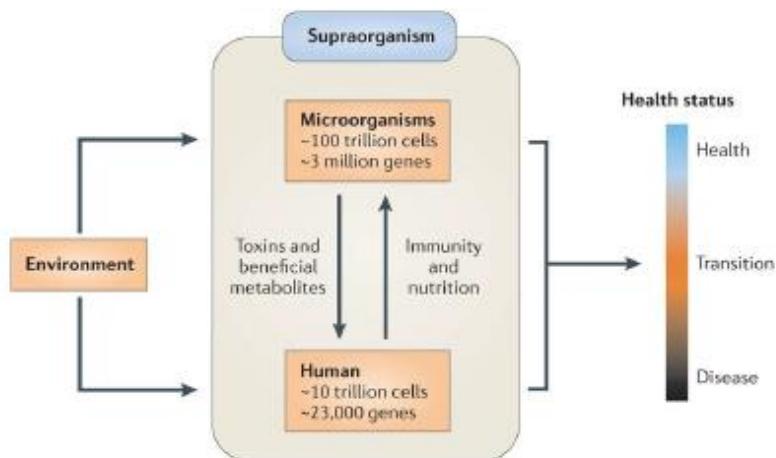
- ❑ Péptido producido principalmente por las células endocrinas del duodeno, con efecto de saciedad, que se presenta en varias formas moleculares
- ❑ Actúa también modulando la homeostasis de glucosa a través de un eje intestino – cerebro – hígado (bloqueando la HGO) y se sintetiza también en el SNC
- ❑ Sus efectos están mediados en parte por la estimulación del nervio vago
- ❑ Se conocen dos tipos de receptores los cuales se expresan en el SNC, si bien fuera del mismo el CCK-R1 es el predominante
- ❑ Se han descrito interacciones entre la acción de leptina y la sensibilidad de los receptores de CCK en el tallo cerebral.

Papel de la microbiota en la homeostasis metabólica

Microbiota

Existe una **relación entre la microbiota y la obesidad**. Estudios de asociación apuntan a que **distintos tipos de composiciones microbióticas** estarían asociados a **distintos fenotipos obesos**. Queda un camino para **determinar si hay una relación causa-efecto**, es decir, si la microbiota podría estar determinando el estado obeso.

El ser humano **puede considerarse un supraorganismo**, es decir, **una conjunción de microorganismos y humano**, condicionados por el medioambiente ambos y en una **interrelación** en la que están implicadas **toxinas y metabolitos beneficiosos**, al mismo tiempo que relaciones inmunes y la nutrición. Estas interacciones determinan el **estado de salud del individuo**, posicionándolo en un **estado de salud o de enfermedad**.



Se traduce en que nuestro estado de salud no depende de los efectos ambientales sobre nuestras células, sino también sobre la microbiota.

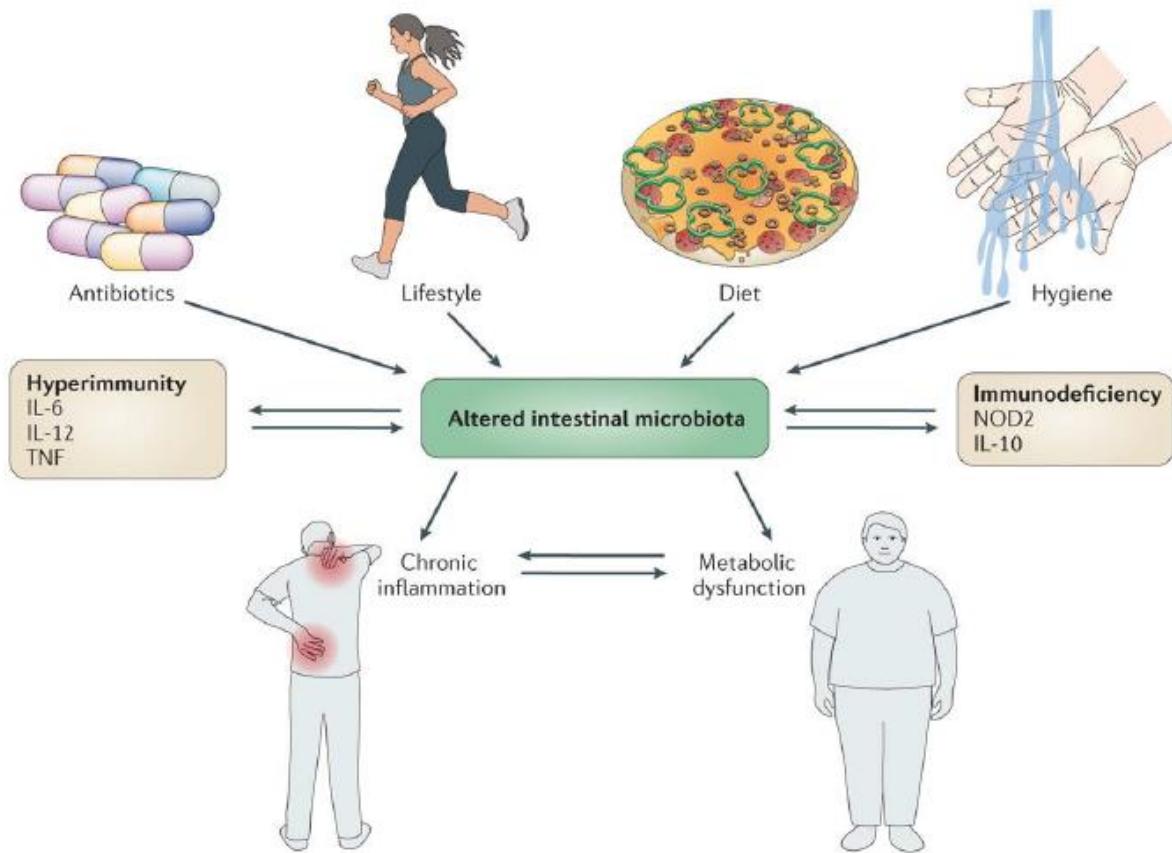
Hay ciertas funciones biológicas del huésped que están influenciadas notoriamente por la microbiota:

- **Digestión de moléculas de ingesta** que no seríamos capaces de digerir sin los microorganismos, **como la digestión de polisacáridos**.
- **Síntesis de vitaminas**.
- **Protección frente a la invasión** frente a patógenos oportunistas, generando un microambiente no proclive a la invasión
- **Mantenimiento de la homeostasis** de los tejidos, como el tejido óseo.

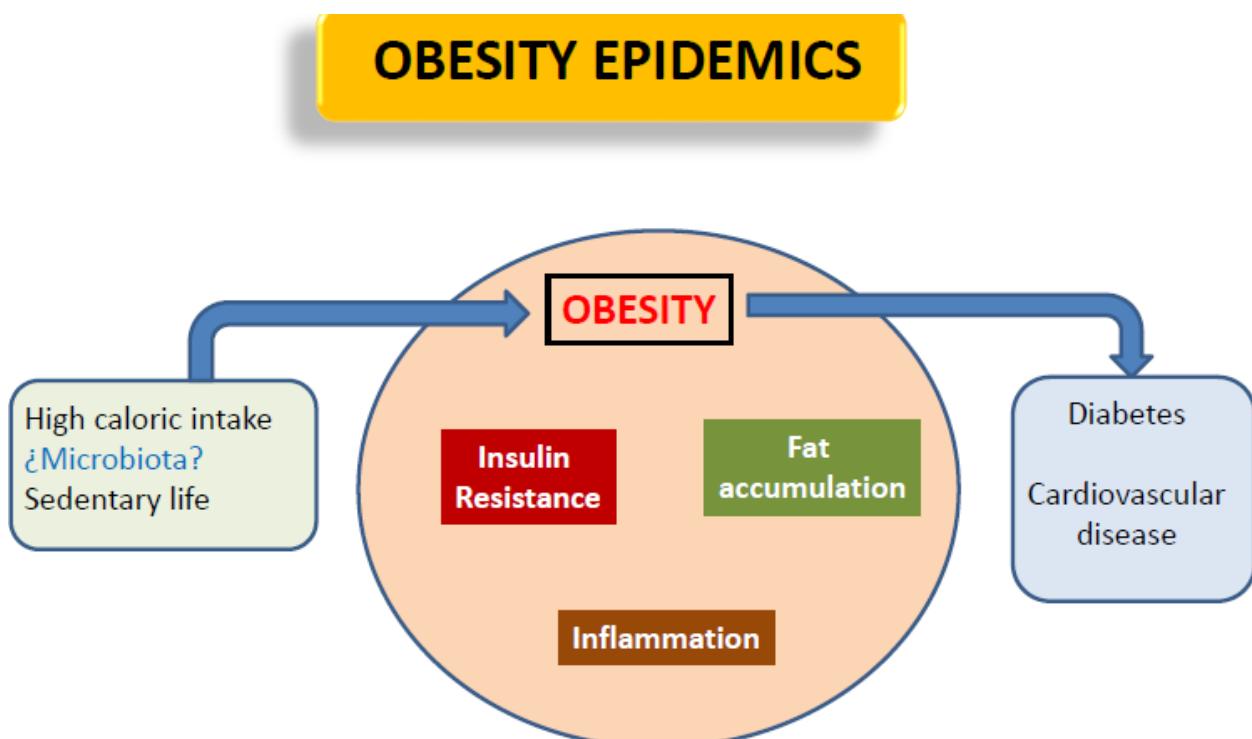
La **composición de la microbiota** está muy caracterizada. En general, **se compone de bacterias anaerobias en su mayoría, junto con facultativos o aerobios**. Unas 1000 especies de unos pocos phyla están implicadas..

Abundantes: firmicutes y bacteroidetes, otros tan minoritarios. Hay **gradientes de los mismos**, caracterizados por técnicas de metagenómica.

La alteración produce procesos inflamatorios y disfunción metabólica. Puede venir por la higiene, dieta, estilo de vida y antibióticos.



Analizar distintas familias para ver producción de butirato que es un antiinflamatorio o bacterias del genero *lactobacillus* están disminuidas en obesidad.



OBESE MICROBIOTA

{ ↑ Firmicutes/Bacteroidetes
↓ Butyrate producing bacteria

LEAN MICROBIOTA

{ ↓ Firmicutes/Bacteroidetes
↑ Butyrate producing bacteria

Uso de probioóticos y prebióticos como moduladores de la microbiota del intestino.

TOOLS TO MODULATE GUT MICROBIOTA

Prebiotics

Nondigestible food ingredients that beneficially affect the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of the bacteria in the guts

Probiotics

Live microorganisms which, when given orally in quantities adequate to allow colonization of the colon, confer a health benefit to the host