Apoptosis en la degeneración neurofibrilar de la enfermedad de Alzheimer

Luna-Muñoz J,[1,3] Soto-Peredo C,[1] García-Sierra F,[2] Mena López R[3]

RESUMEN

La apoptosis es un proceso de muerte celular que comprende una secuencia de eventos debidos a la actividad de enzimas específicas llamadas caspasas. Las caspasas rompen en fragmentos a las proteínas y el ADN celular llevando finalmente a la desintegración celular. La apoptosis está fuertemente regulada por mecanismos fisiológicos que son cruciales durante el desarrollo en etapas adultas para el mantenimiento del balance entre células en división y muerte celular. A diferencia de la apoptosis, la muerte celular por necrosis es causada por daños a la célula que se caracterizan por una rápida disrupción del metabolismo celular y una desintegración no fisiológica de las células. Los eventos que comúnmente disparan o inducen la muerte celular por necrosis son procesos tóxicos o traumáticos. La apoptosis y necrosis pueden distinguirse fácilmente por un número de cambios morfológicos y bioquímicos característicos. En la presente revisión se hace una descripción general de los mecanismos específicos de la muerte celular por apoptosis y la asociación que se ha encontrado con el proceso neurodegenerativo que caracteriza a la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: *apoptosis, caspasas, tau, maraña neurofibrillar tangle, Alzheimer.*

Rev Mex Neuroci 2004; 5(5): 476-485

Apoptosis in neurofibrillar degeneration of Alzheimer's disease

ABSTRACT

The apoptosis is a cellular death processing which involves a sequence of events due to a number of enzymes referred as caspases. During apoptosis, caspases activity results into protein and DNA fragmentation leading to the cellular death. Apoptosis is firmly down regulated by physiologic mechanisms functioning for the maintenance of the balance among living and cell death. In contrast to apoptosis, cellular death due to necrosis is caused by cellular damages which are characterized by a quick disruption of the cellular metabolism and a non-physiologic disintegration of the cells. In general, it is accepted that necrosis is related to toxic and traumatic processes; the apoptosis process can be easily distinguished from necrosis by a number of morphological and biochemical characteristic changes. In the present paper, we reviewed the specific mechanisms involved in apoptosis. Some work is discussed in relation with the role of apoptosis in neurodegenerating process involved in Alzheimer's disease.

Key words: *Apoptosis, caspase, tau, neurofibrillar , Alzheimer.*

Rev Mex Neuroci 2004; 5(5): 476-485

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia que clínicamente se caracteriza por un daño progresivo en las funciones cognoscitivas que llevan a la demencia. A nivel histopatológico esta enfermedad se caracteriza por presentar lesiones en áreas específicas del cerebro. Estas lesiones son conocidas como marañas neurofibrilares (MNF) (Figura 1A), neuritas distróficas (NDs) (Figura 1B) e hilillos del neuropilo (HN) (Figura 1b), las cuales están formadas por masivas acumulaciones de estructuras fibrilares llamadas filamentos helicoidales apareados (FHAs) cuyo principal componente estructural es la proteína tau.[1-3] Otra lesión característica en los cerebros de personas que fallecieron con la EA, es la placa neurítica (PNs) (Figura 1C) que están formadas por depósitos fibrilares extracelulares del péptido amiloide-β a los que se encuentran asociadas una gran cantidad de NDs.

1. Programa Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud Unidad Xochimilco. Universidad Autónoma Metropolitana.
2. Biología Celular.
3. Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN, México.

Correspondencia: Biol. José C. Luna Muñoz
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN,
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias.
Av. Instituto Politécnico Nacional Núm. 2508.
Col. San Pedro Zacatenco. Delegación Gustavo A. Madero.
CP 07300. Tel.: 5061-3800, Ext. 5130, 5061-3362.
Correo electrónico: jluna@fisio.cinvestav.mx

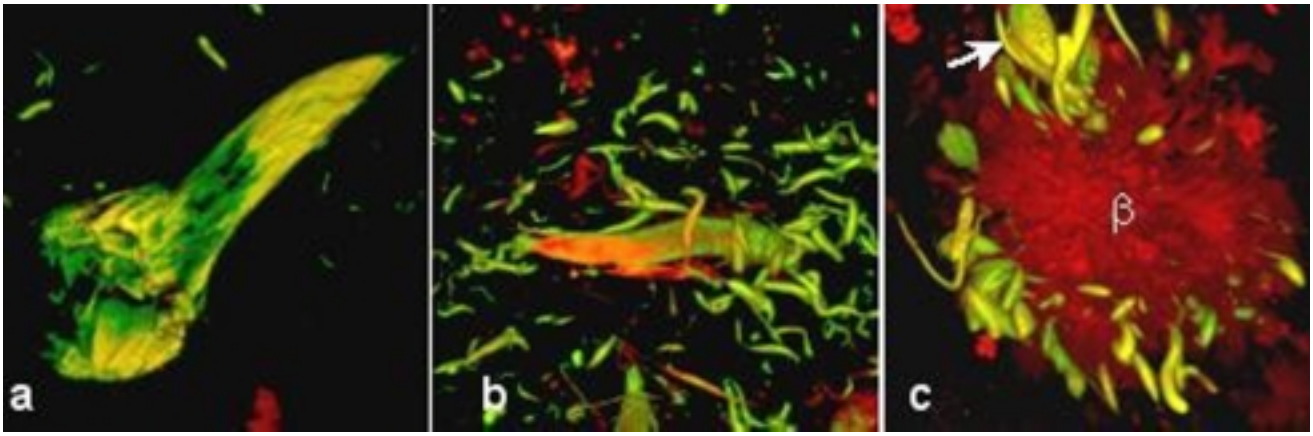

Figura 1. Lesiones características en la enfermedad de Alzheimer. **A.** Marañas neurofibrilares (teñido con un anticuerpo que reconoce la proteína tau patológica). **B.** Neuritas distróficas y **C.** Placas neuríticas de amiloide-β (β canal rojo), asociadas a estos depósitos se observan las neuritas distróficas (flechas).

Tabla 1
Características básicas de apoptosis y necrosis.

Apoptosis	Necrosis
Encogimiento celular	Hinchamiento celular
Ondulación membranal	Desintegración de membranas
Agregación de la cromatina	Degeneración del ADN al azar
ADN en escalera en gel de agarosa	Mancha de ADN en gel de agarosa
Formación de cuerpos apoptóticos	Lisis celular
Organelos y membranas se mantienen intactos	Desintegración de organelos
Procesos enzimático vía activación de caspasas	Perturbación de la homeostasis iónica
Dependiente de energía	Independiente de energía
Perfecto control de muerte celular, proceso activado por genes	El daño induce espontáneamente la muerte celular
No hay una respuesta inflamatoria *in situ*	Inflamación

Aunque el mecanismo exacto de la patogénesis de la EA no es muy claro, se han propuesto varias modificaciones postraduccionales de la proteína tau que parecen iniciar su agregación patológica en FHAs: 1) La hiperfosforilación,[4,5] 2) truncación[1-3,6-9] y recientemente se ha descrito una serie de 3) Cambios conformacionales.[10,11] De la misma manera se han podido observar cambios morfológicos y bioquímicos que apoyan la idea de que las neuronas en la EA degeneran mediante vías de apoptosis. También se ha observado que las neuronas en etapas iniciales de la EA presentan una fragmentación intensa del ADN y este daño se presenta incluso en neuronas que no han desarrollado MNFs. En el curso de la EA se acumula una gran cantidad de condiciones en el cerebro capaces de inducir apoptosis y esto mantiene en riesgo a la neurona. Este mecanismo de autoprotección puede ser contraproducente porque retarda la degeneración celular al tratar de mantener la función celular.

En este artículo se actualiza la información que existe acerca de la posible implicación de la apoptosis en la fisiopatogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Al considerar el complejo sistema de mecanismos involucrados en este proceso se antepone una revisión general de la muerte celular por apoptosis.

En general, la muerte celular puede dividirse en dos procesos de acuerdo con sus características morfológicas y bioquímicas que le suceden en el momento de que la célula se dispone a morir. Estos dos procesos son la **apoptosis** (también llamada *muerte celular programada*) y la **necrosis** (Tabla 1).

La necrosis es una muerte por asesinato celular (por ejemplo, algunos factores que inducen a las células a necrosis son células afectadas por toxinas bacterianas, daño traumático-tóxico, isquemia o hiperactivación enzimática focal), cuando la célula es afectada por alguna de estas causas; la célula

y las mitocondrias se hinchan hasta que se rompe la membrana, se observa una picnosis nuclear. Al romperse la membrana celular se liberan enzimas nocivas, que a su vez matan a sus células vecinas, este evento origina un proceso inflamatorio y una cicatriz fibrosa, que deforman el tejido y el órgano afectado. La apoptosis en cambio es completamente diferente, ya que una gran cantidad de células mueren en un espacio de tiempo muy corto sin que se produzcan reacciones inflamatorias ni lesiones en los tejidos en los que ocurre. Este proceso se desencadena por una gran cantidad de mecanismos tales como la perturbación de las moléculas de membrana (Fas, TNF, entre otras), la carencia de factores de crecimiento (paracrinos y aun autocrinos) que les permiten comunicarse con otras células, al recibir radiaciones ionizantes, drogas y diversos agentes químicos. El "suicidio" celular es una muerte fisiológica que no produce procesos reactivos a su alrededor, la célula destinada a morir se separa de sus células vecinas al perder sus moléculas de adhesión. Primeramente, se condensa el núcleo y posteriormente se fragmenta a consecuencia de la desorganización de la membrana nuclear interna, se produce una perturbación de la función mitocondrial, los cromosomas y el genoma se parten en fragmentos regulares (degradación del ADN intranucleosomal en múltiplos de 180 pares de bases) y finalmente, por la acción de proteasas sobre proteínas citoesqueléticas, se forman vesículas con restos celulares denominadas cuerpos apoptóticos. Estas estructuras son rápidamente absorbidas por las células vecinas (en este proceso no hay rompimiento de la membrana, por lo cual no hay productos tóxicos que se viertan al exterior, de esta manera no afecta a sus células vecinas).

La muerte celular programada es esencial en los organismos desde la embriogénesis, el desarrollo fetal y en la maduración del sistema inmune, así como también en la homeostasis inmune. Así pues, la muerte celular programada es esencial en los mecanismos fisiológicos para controlar el número de células en varios tejidos durante el desarrollo y en el organismo adulto. Por consiguiente, durante el desarrollo y maduración de las células del sistema nervioso se generan en exceso de una manera ordenada para dirigir el establecimiento del tejido intacto. El exceso de células nerviosas puede removerse mediante la inducción de apoptosis. Se han conservado algunas evidencias en las cuales genéticamente se presenta una desregulación en el mecanismo apoptótico presentándose una inapropiada muerte celular, lo cual provoca la proliferación celular descontrolada y por consecuencia se desarrolla el cáncer.[12]

Ejecutores de la apoptosis

El mecanismo central de la maquinaria de la muerte celular está constituido por una familia de ***cistein-proteasas*** comúnmente llamadas ***caspasas***,[13] por ser **C**istein-prote**ASAS** que hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de ácido **ASP**ártico. La actividad de estas enzimas es un prerrequisito para la activación de la apoptosis respondiendo a la activación de una cascada intracelular proteolítica que induce la activación o inhibición de diferentes sustratos celulares provocando la muerte celular. Las caspasas están formadas por una familia de enzimas (14 miembros),[14] de ellas seis se relacionan preferentemente con procesos inflamatorios y no con procesos de muerte celular. Sin embargo, todas comparten semejanzas en cuanto a su secuencia proteínica, estructura y espe-

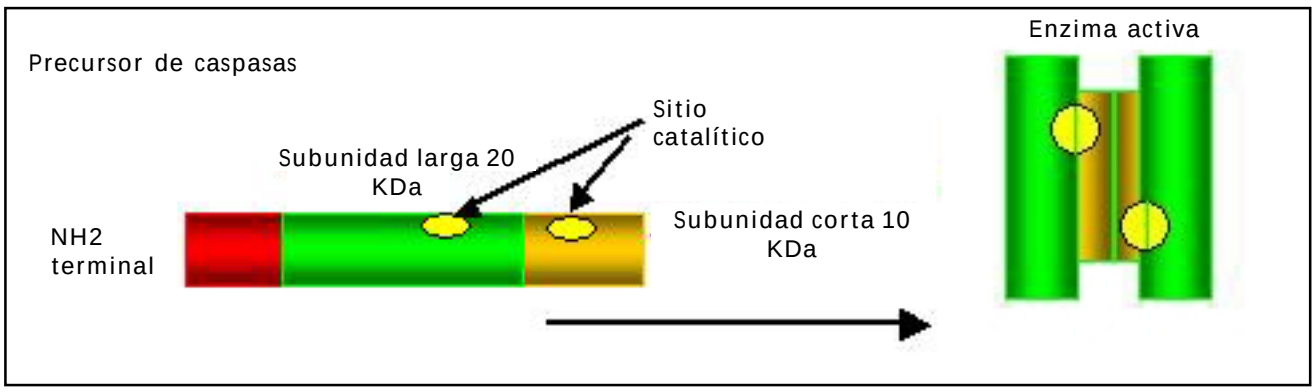

Figura 2. Las caspasas comparten semejanzas en las secuencias de sus aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. Todas ellas se expresan como proenzimas de 30-50 KDa, las cuales contienen tres dominios, uno es el amino terminal, una subunidad grande de 20 KDa y una pequeña de 10 KDa. La activación involucra el procesamiento proteolítico entre los dominios, seguido de una asociación de las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. La estructura cristalina de dos de las caspasas activas (caspasas 1 y 3) muestra que en ambos casos, dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero, con dos sitios catalíticos que parecen funcionar independientemente. Dentro de cada dominio catalítico las unidades grandes y pequeñas están íntimamente asociadas, contribuyendo ambas con los residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis.

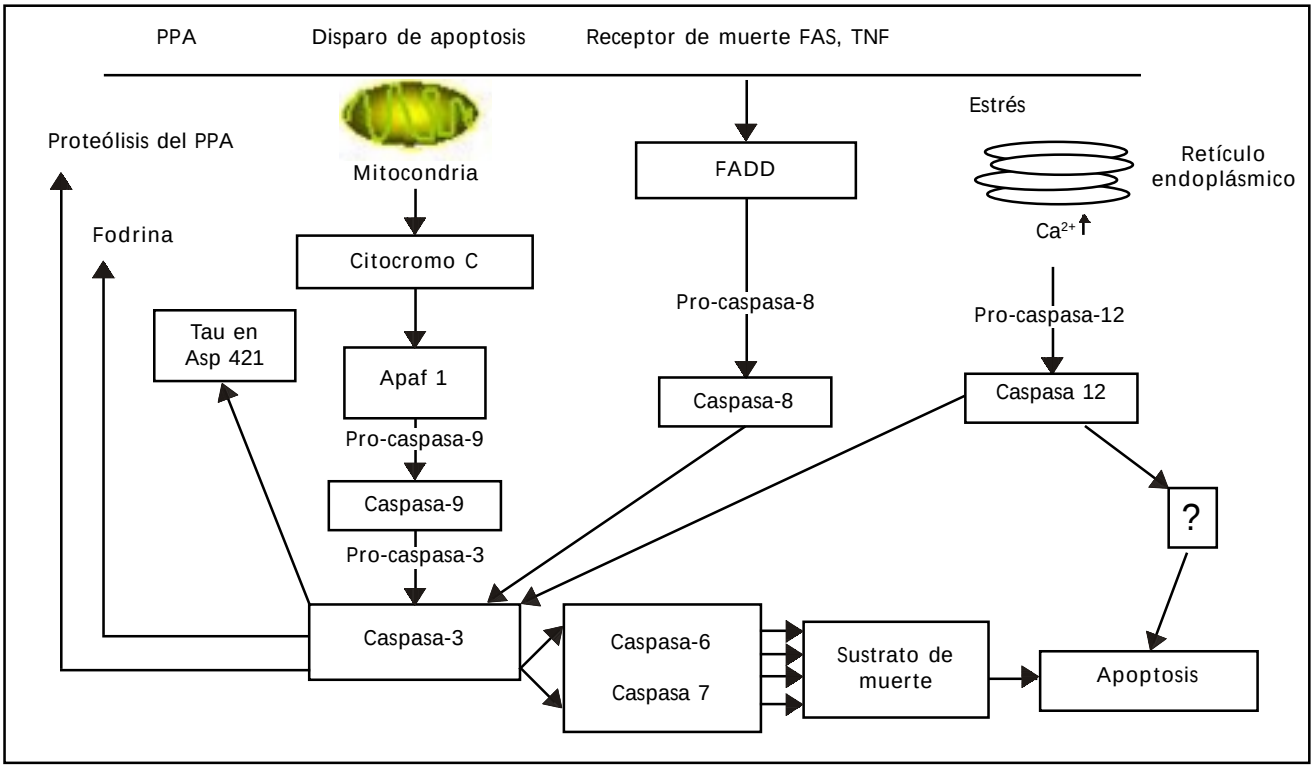

Figura 3. La activación de las caspasas puede implicar tres vías diferentes de señalización que disparen la apoptosis (ejemplo toxinas), receptores de muerte (ejemplo Fas-CD95) y condiciones de estrés intracelular. El daño mitocondrial libera el citocromo c, el cual es una molécula proapoptótica en el citoplasma. Ahí con ATP se forma un complejo con Apaf-1(apoptosis protease activating factor-1) y procaspasa-9 llevando a la activación de la caspasa-9. Una segunda vía de acción es a través de la vía de receptores de muerte celular, la cual requiere de unas moléculas adaptadas FADD, las cuales activan la caspasa-8 y el tercer mecanismo es mediante la activación de la caspasa-12 mediante la liberación del calcio seguido de un estrés sobre el retículo endoplásmico. Las tres diferentes vías tienen en común que activarán a la caspasa-3 y finalmente la activación de los sustratos de la muerte celular como la gelsolina, actina y otros, los cuales son modificados por la actividad de las caspasas y continúa con la fragmentación del ADN y culmina con la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, la caspasa-3 tiene una actividad de retroalimentación y proteólisis en la proteína precursora del amiloide. Así como también se ha detectado a la proteína tau como sustrato, la cual sufre una ruptura en el aminoácido Asp 421.

cificidad de sustrato.[15] Son sintetizadas a partir de un precursor inactivo (procaspasas) y éstos son activados mediante una proteólisis limitada y su asociación de las subunidades[16] con lo que las enzimas adquieren su actividad catalítica para proteolizar a su vez sus sustratos tras un residuo de aspártico. Reconocen, sin embargo, diferentes secuencias tetrapeptídicas, lo cual le confiere cierta especificidad de sustrato (Figura 2).

Las caspasas inactivas pueden ser a su vez sustrato de las activas y éstas pueden activar a su vez a otras caspasas siguiendo un orden jerárquico y una actuación en cascada (Figura 3).[17] Las caspasas que participan en la apoptosis pueden dividirse en dos grandes grupos: **las caspasas iniciadoras** (8, 9, 2 y quizás 10), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las **caspasas efectoras** (3, 6 y 7), las cuales proteolizan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos de las células.[14] Además, hay cierta especificidad de tejido para la caspasa requerida en el proceso apoptótico. Por ejemplo, los ratones mutantes que no producen caspasa-3 mueren al nacer presentando un número superior de células neuronales comparado con los normales, pero no presentan ninguna anomalía en el resto de sus órganos.[18] Otra caspasa que también se encuentra implicada en la muerte neuronal es la caspasa-2, que se encuentra en elevados niveles en el cerebro de ratones embrionarios, pero no en los adultos.[19] El ratón mutante que carece de caspasa-2 presenta una alteración en la muerte de las neuronas simpáticas en ausencia de NGF (factor de crecimiento neuronal).[20] La caspasa-1 se ha implicado en algunos procesos de muerte neuronal[21,22] aunque en el ratón mutante que carece de esta caspasa no presenta ninguna alteración en el desarrollo del cerebro.[23]

Se conocen una gran cantidad de sustratos para las caspasas,[24] entre éstos se encuentran proteínas que inhiben la muerte celular como Bcl-2,[25] proteínas que participan en la reparación del ADN o en la organización de la cromatina[26,27] y proteínas impli-

cadas en la regulación del citoesqueleto.[28] En la muerte celular del sistema nervioso puede participar otra proteasa, la calpaína, cistein proteasa dependiente de calcio.[29] En ocasiones la apoptosis neuronal requiere de participación conjunta de calpaína y caspasas.[30]

Reguladores intracelulares de la apoptosis

Los principales reguladores de la apoptosis son los miembros de la familia Bcl-2 que en los mamíferos está constituida por 15 miembros[31,32] y en una forma general todos ellos presentan cuatro dominios homólogos a Bcl-2 (BH1 a BH4). Algunos miembros de esta familia inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X_L) y otros la activan (Bax, Bad, Bid). Como ambos tipos pueden heterodimerizar su concentración determina si la célula se dirige a apoptosis o sobrevive.[33] Estas proteínas se anclan en la cara citoplásmica de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, de manera que pueden registrarse daños en dichos organelos.[34] El siguiente nivel de regulación en mamíferos está determinado por la Apaf-1 con algunas caspasas iniciadoras, Bcl-X_L y Bcl-2, que impiden la activación del complejo Apaf-1/ procaspasa-9,[35] además de impedir directa, o indirectamente, la liberación del citocromo c mitocondrial; lo que a su vez parece ser un cambio conformacional en Apaf-1 que le permite procesar a la procaspasa-9 (Figura 3).[36,37] Bcl-2, Bcl-X_L y Bax participan en la muerte celular del sistema nervioso.[38] Los ratones mutantes para este gen mueren durante el desarrollo embrionario, los cuales presentan una muerte masiva de neuronas posmitóticas inmaduras en cerebro y médula espinal,[39] mientras que los ratones mutantes que carecen de Bcl-2 nacen, pero mueren aproximadamente a los 30 días mostrando una pérdida progresiva de motoneuronas. Las mutantes que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X_L presentan un incremento en número de neuronas y tienen una mayor resistencia a morir frente a los estímulos de la apoptosis.[40]

Reguladores extracelulares

Dentro de los reguladores extracelulares de la apoptosis se encuentran las neurotrofinas y los factores de crecimiento en el sistema nervioso, que regulan a las proteínas de la familia Bcl-2 y las procaspasa-2. Sus señales de supervivencia se pueden traducir por la vía intracelular que implica a la PI3K (fosfatidil-inositol-3 cinasa)[41] y la consecuente activación de la protein-cinasa B o Akt o por la vía que implica a las MAPk (protein-cinasas activadoras de mitógeno). La activación de Akt supone la fosforilación directa de Bad que mantiene unido a la proteína 14-3-3. Por el contrario, Bad no fosforilado se une a Bcl-X_L (o a Bcl-2) impidiendo que ejerza su acción de supervivencia.

Otra vía de inducción de muerte implica la señalización a través de los llamados receptores de muerte (Fas y TNF) que participan en el sistema inmune. En el sistema nervioso hay una activación del NGF, la cual es esencial para la muerte celular que afecta el desarrollo de neuronas simpáticas, la sobreexpresión de su dominio intracelular puede inducir la muerte de algunas neuronas *in vivo,*[42] la unión del NGF a p75 puede inducir la liberación de ceramida y activación de JNK (c-jun-aminoterminal-cinasa) en células gliales.

En el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas se originan de células precursoras que una vez diferenciadas no se dividen más. Antes de emitir axones y dendritas, las células inmaduras migran hasta su localización definitiva, cuyo objetivo es el de establecer conexiones interneurales correctas, si ello no ocurre las neuronas no reciben la acción de factores de crecimiento secretados por la célula receptora a la que pertenece el axón conectado y la célula que hizo la conexión equivocada muere por apoptosis. En enfermedades neurodegenerativas se ha observado apoptosis en biopsias de pacientes con Alzheimer, Huntington y Parkinson, fallecidos por otras causas. La apoptosis en la enfermedad de Alzheimer no es sistematizada, sino más bien difusa, que coincide con el polimorfismo de la lesión. Cotman, en 1998,[43] detectó que en la enfermedad de Alzheimer muestra un mayor número de células apoptóticas principalmente en células del hipocampo.

Apoptosis en el tejido cerebral humano con la EA

Se han realizado una gran cantidad de estudios en los cuales se ha detectado la fragmentación del ADN en el cerebro humano con la EA, indicándonos un daño en la neurona. Esta observación se ha determinado mediante la técnica de túnel (Figura 4)[44] en algunos de estos estudios las células positivas a la tinción con la técnica de túnel, morfológicamente presentaban un encogimiento celular y cuerpos apoptóticos[44,45] (Figura 4). Otros estudios han revelado que a pesar de la tinción positiva que evidencia la fragmentación del ADN, las características morfológicas de apoptosis no se observan y que posiblemente una vía alternativa para el proceso de muerte celular es la necrosis.[44,46] Algunos otros grupos han reportado que los cambios morfológicos que se encuentran en las células de los cerebros con la EA no son característicos de la apoptosis, sino de necrosis y estas células son positivas a la técnica del túnel evidenciando la fragmentación del ADN, sin

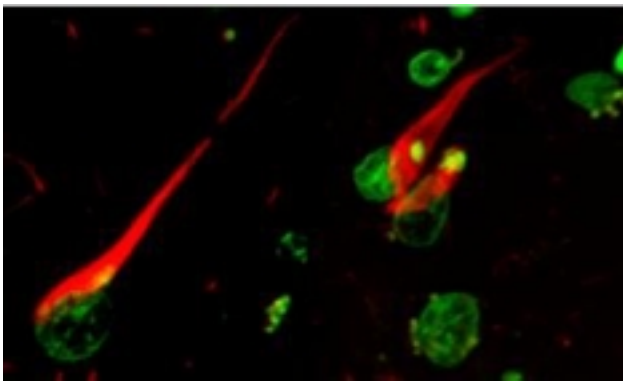

Figura 4. Maraña neurofibrilar de un caso de EA. Tinción del ADN fragmentado mediante la técnica de túnel (verde), la cual se asocia a las MNFs, (rojo). Imagen tomada al microscopio con focal (MRC600 Bio-Rad).

embargo, las únicas células que presentan características morfológicas de apoptosis se observan en el hipocampo (por ejemplo, reducción del tamaño celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos).[47,48] En relación con la controversia de que si en las células neuronales en la EA se encuentran sus núcleos fragmentados, se han tratado de utilizar otros marcadores como, por ejemplo, la proteína c-jun, la cual colocaliza con el ADN fragmentado,[49,50] el cual es un gene inicial necesario para la activación de la apoptosis en neuronas.[51] Así también en la EA se ha observado un incremento en la expresión de proteínas proapoptóticas como son c-jun, c-Fax, Bax, p53 Apo1/Fas-DC95 y proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X).[52-55] Estos estudios sugieren que la apoptosis podría ser un mecanismo inicial en el daño neuronal en la EA, así también se han observado una gran cantidad de núcleos neuronales que no se asocian a MNFs (Figura 4), lo cual podría indicar un mecanismo alternativo para la formación de la maraña. También se ha encontrado elevada la enzima reparadora de ADN (Ref-1) en la EA sugiriendo que esos núcleos están tratando de ser reparados, pero esta reparación es deficiente.[56]

Dentro del proceso de apoptosis se encuentra la actividad de las caspasas, las cuales se han relacionado con los procesos de formación de las MNFs. Dentro de esta familia de caspasas la que se ha asociado principalmente con los procesos neurodegenerativos es la caspasa-3. Recientemente tanto *in vitro* como *in vivo* se ha determinado que la caspasa-3 puede hidrolizar a la proteína tau[57] en el aminoácido aspártico 421 de la porción carboxilo terminal seguido de Gli, Ser o Ala[58] esta hidrólisis sobre la proteína tau mantiene los dominios repetidos de asociación al microtúbulo (región de los residuos 351-380) y son los que forman el núcleo mínimo de los FHAs (1, 2, 3) y subsecuentemente se observa una disrupción del citoesqueleto como resultado de la muerte celular. Han desarrollado un anticuerpo que reconoce esta hidrólisis de la serina 421 denominado tau-C3 (Figura 5).[59]

Estudios realizados por el Dr. García–Sierra en cortes de cerebros con la EA, muestran que la inmunorreactividad de este anticuerpo tau-C3 no colocaliza con la inmunorreactividad de un anticuerpo que reconoce la porción carboxi-terminal, lo cual sugiere que la proteína tau presenta una truncación inicial (comunicación personal) y ésta posteriormente continuará hidrolizándose por otras enzimas hasta llegar a la truncación en la porción Glu-391 evidenciada por el anticuerpo 423, que es la porción límite del núcleo mínimo de los FHAs,[2,9] la acumulación de este núcleo mínimo en el cuerpo neuronal y su exposición al espacio extracelular sería la etapa final de degeneración neuronal.[9,58,60] De esta manera, la sobreexpresión del núcleo mínimo

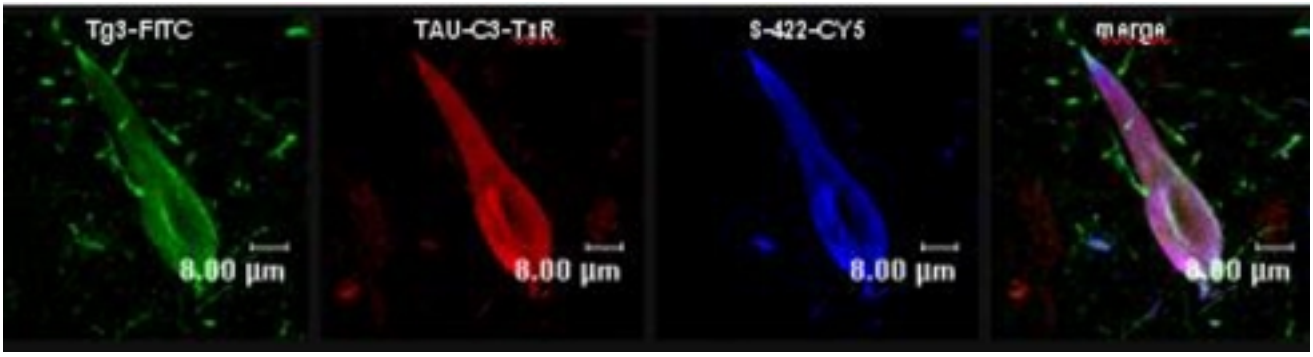

Figura 5. Triple inmunodetección de una maraña neurofibrilar de un caso de EA. Con anticuerpos que reconocen la proteína tau en diferentes regiones de la molécula. **A**) TG-3 (reconoce una conformación regional en la Ser232 y Thr 235); canal verde. **B**) Anticuerpo TAU C-3 (que reconoce una truncación en la porción Asp 421, proteólisis realizada por la caspasa-3); canal rojo **D**) anticuerpo S422 (reconoce la Ser 422) canal azul. **D**) proyección de los tres canales en la cual se muestra una clara colocalización entre los marcadores de tau patológica (**A** y **C**) y con la proteólisis realizada por caspasa-3.

de los FHAs en células Cos induce a las células a apoptosis, sugiriendo que el núcleo mínimo del FHA es tóxico para la célula.[61] Asimismo, se ha podido observar que el fragmento 1-44 aminoácido de la proteína tau de su porción amino tiene un efecto tóxico elevado en neuronas granulares cerebelosas, induciéndolas a apoptosis, este efecto pudo ser inhibido por receptores antagonistas NMDA. Sin embargo, cuando se utilizó el fragmento completo del 1-230 aminoácido (libre de los dominios repetidos) se observó un efecto antiapoptótico determinando la importancia fisiológica de la porción amino de la proteína tau, sin embargo, en el procesamiento de la proteína tau en la EA se ha sugerido que hay una proteólisis tanto de su porción carboxilo como amino terminal mediada por proteasas apoptóticas, las cuales podrían generar fragmentos altamente tóxicos y éstos podrían contribuir a la muerte neuronal.[62] El proceso de hiperfosforilación de la proteína tau también se ha asociado a procesos apoptóticos mediante la combinación de la técnica del túnel y con panel de anticuerpos que reconocen tau hiperfosforilada en diferentes regiones de la molécula de tau. Kobayashik K. y col. pudieron determinar que posiblemente la fosforilación entre los aminoácidos 159-163 y del 202-205 tienen una mayor asociación con los procesos apoptóticos.[63]

Dentro de las caspasas que más se han visto asociadas a la patología de la EA es la caspasa-3, la cual mediante técnicas de inmunodetección de la fracción activa de caspasa-3 en cerebros con la EA se confina a unos gránulos citoplásmicos, lo cual indica que la célula que presenta el daño trata de neutralizar su efecto secuestrándola en vacuolas autofágicas.[64] De la misma manera se han observado algunas vacuolas inmunorreactivas a la proteína tau que se encuentra conformacionalmente alterada (anticuerpo TG-3) (Figura 6), la cual presenta una morfología semejante a las observadas con caspasa-3,[64] lo cual sugiere que en estas vacuolas podría iniciar la actividad de la caspasa-3 sobre tau. También se ha detectado un decaimiento en la función mitocondrial en las células piramidales del hipocampo en cerebros con EA.[65-67]

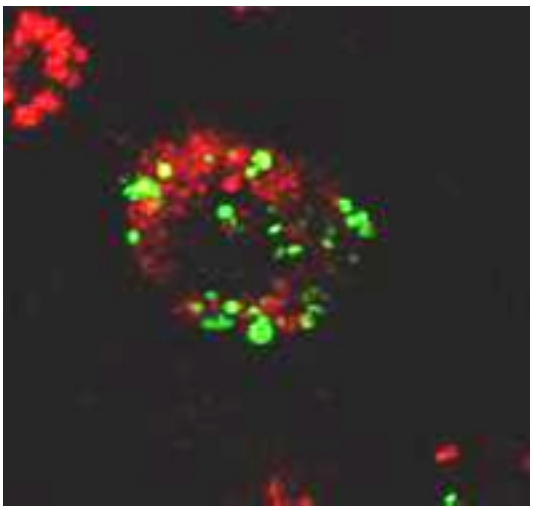

Figura 6. Tinción con el anticuerpo que reconoce la proteína tau con una conformación específica (verde) en la cual se pueden observar unas estructuras semejantes a vacuolas. El patrón es semejante a la inmunorreactividad observada por caspasa-3. En rojo se observa la autofluorescencia de la lipofucina. Micrografía tomada al microscopio con focal de un caso de EA.

El daño oxidativo es una característica normal en el envejecimiento, sin embargo, en la EA es más extensiva[68] y éste puede selectivamente inducir la apoptosis.[69] La mitocondria es particularmente vulnerable al daño oxidativo y éste provoca la liberación del citocromo c de la mitocondria, la cual puede interaccionar con Apaf-1 y este complejo a su vez activa a la caspasa-9 (Figura 3).[70] Rhon y col. 2002[71] observaron que la inmunorreactividad de la caspasa–9 colocalizó en un número considerable de neuronas que presentaban inmunorreactividad al anticuerpo 8oxodG (este anticuerpo reconoce un daño oxidativo en el ADN nuclear y mitocondrial y en el ARN), en estudios previos el anticuerpo anti80xodG se ha asociado con una disfunción mitocondrial[72] y a su vez la caspasa-9 activa a la caspasa-3 (Figura 3). Rohn y col.[71] evidenciaron mediante técnicas de inmunodetección en cerebros con la EA que la inmunorreactividad de la caspasa-9 (fracción activa) se localiza en estructuras en forma de flama y en NDs que se asocian a los depósitos de amiloide (placas neuríticas).

Con base en la formación de la MNF y la activación de la caspasa-9 se ha observado una relación inversa, ya que en casos moderados de EA se observan una gran cantidad de células positivas a la caspasa-9 y esta inmunorreactividad disminuye conforme se incrementa la presencia de las MNFs positivas al anticuerpo PHF-1 (anticuerpo que reconoce la proteína tau fosforilada en los aminoácidos Ser 396 y Ser 404) en casos severos de EA, lo cual puede indicar que la caspasa-9 puede estar actuando previo a la formación de la MNF[71] (Figura 3). Asimismo, la inmunorreactividad del anticuerpo anticaspasa-9 colocalizó con la caspasa-8, esto sugiere que podría realizarse una activación concurrente en ambas vías de apoptosis en las neuronas, mediante diferentes estímulos. Por un lado la caspasa-8 está implicada en Fas/CD95 o el factor de necrosis tumoral (TNF) que es un receptor de muerte programada, en este contexto la caspasa-8 es un miembro inicial de la familia de las caspasas que es reclutada por proteínas adaptadoras (por ejemplo, Fas asociada a un dominio de muerte, FADD) y la convierte a una forma

activa por autoproteólisis,[73] en la proteólisis de la caspasa-8 resultan dos fragmentos activos de 11 y 18 KDa ambos representan la forma activa de la enzima y éste activa particularmente la caspasa-3 (Figura 3).[74] Tanto la caspasa-8 y 9 colocalizan con fodrina (que es un producto de hidrólisis por la caspasa-3) y a su vez colocalizan con MNFs inmunorreactivas a AT8 (reconoce los aAc 202 y 205 de la proteína tau hiperfosforilada) y PHF-1.[75,76] Sin embargo, la modulación de sustratos hidrolizados por la caspasa-3 puede modificar la vía clásica de apoptosis y esto puede explicar la falta de evidencia de los estados terminales de la apoptosis en la que se incluye la condensación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos,[77] a este proceso de apoptosis no terminal se le ha denominado abortosis.[78]

En conclusión, basándose en los resultados observados se puede decir que bajo tantos estudios in vitro como in vivo se favorece la apoptosis en la EA. Sin embargo, esta apoptosis en forma general no es una apoptosis clásica, que lleva a la neurona a la disgregación de los componentes celulares, sino más bien se echa a andar la maquinaria de apoptosis, pero que su punto esencial es la de activar a la vía de las caspasas cuyo fundamento es la de proteolizar a la proteína tau en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS

1. *Novak M, Kabat J, Wischik CM. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. Emboj 1993; 12(1): 365-70.*
2. *Mena R, Edwards P, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 1996; 91: 633-41.*
3. *Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. Structural characterization of the core of the paired helical filaments of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1998b; 85: 4884.*
4. *Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lübke U, Vandermeern M, Crass P, Trojanowski JQ, Lee VM. The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser202 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during develoment. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5066-70.*
5. *Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. 1993; 10: 1089-99.*
6. *Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau reveled by epitope analysis of mAbs 423 and 7.51. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5837-41.*
7. *Wischik CM, Crowther RA, Stewart M, Roth M. Subunit of paired helical filaments in Alzheimer's disease. J Cell Biol 1985; 100: 1905-12.*
8. *Wischik CM, Novak M, Thogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. Isolation of fragment of tau derived from the core of the paired helical filaments of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA; 85: 4506-10.*
9. *Mena R, Wischik CM, Novak M, Milstein C, Cuello AC. A progressive deposition of paired helical filaments (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. J Neuropathol Exp Neurol 1991; 50: 474-90.*
10. *Jicha GA, Bowser R, Kasam IG, Davies P. Alz-50 and MC-1 a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. J Neurosci Res 1997a; 48: 128-32.*
11. *Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L Jr., Hoffmann R, Davies P. A conformation-and phosphorilation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. J Neurochem 1997b; 69: 2087-95.*
12. *Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980; 68: 251-306.*
13. *Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/ced-3 protease nomenclature. Cell 1996; 87: 171.*
14. *Thornberry NA, Lazebnick Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281: 1312-16.*
15. *Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. Trends Biochem Sci 1997; 22: 299-306.*
16. *Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of caspases. Biochem Biophsy Acta 1998; 1387: 17-31.*
17. *Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. Cell 1997; 91: 443-6.*
18. *Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature 1996; 384: 368-72.*
19. *Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the Caenorhabditis elegans cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1b-converting enzyme. Genes Dev 1994; 8: 1613-26.*
20. *Bergeron L, Perez GI, McDonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2 deficient mice. Genes Dev 1998; 12: 1304-14.*
21. *Troy CM, Stefanis L, Prochiantz A, Greene LA, Shelanski ML. The contrasting roles of ICE family proteases and interleukin 1b in apoptosis induced by trophic factor withdrawal and by copper/zinc superoxide dismutase down-regulation. Proc Natl Acad Sci USA; 1996; 93: 5635-40.*
22. *Tanaka M, Sawada M, Miura MY, Marunouchi T. Insulin-like growth factor-I analogue prevent apoptosis mediated through an interleukin-Ib-like protease of cerebellar external granular later neurons: developmental stage-specific mechanism of neural cell death. Neuroscience 1998; 84: 89-100.*
23. *Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered cytokine export and apoptosis in*

mice deficient in interleukin-1b converting enzyme. Science 1995; 267: 2000-3.

24. *Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. Genes Dev 1998; 12: 1551-70.*
25. *Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl.Xl. Nature 1997; 379: 554-6.*
26. *Kaufmann SH, Desnoyer S, Ottavino Y, Davison NE, Poirier GG. Specific proteolítico cleavage of poly (ADP-robose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res 1993; 53: 3976-85.*
27. *Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A. Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. J Exp Med 1996; 183: 1957-64.*
28. *Rudel T, Bokoch GM (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cell regulated by caspase-mediated activation of PAK2. Science ; 276: 1571-4.*
29. *Squier M, Miller A, Malkinson A, Cohen J. Calpain activation in apoptosis. J Cell Physiol 1994; 159: 229-37.*
30. *Jordan J, Galindo MF, Miller RJ. Role calpain and interleukin 1b converting enzyme-life proteases in the b-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. J Neurochem 1997; 68: 1612-21.*
31. *Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulator of cell death. Ann Rev Immunol. 1998; 16: 395-419.*
32. *Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbitres of cellular survival. Science 1998; 281: 1322-6.*
33. *Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74: 609-19.*
34. *Green DR, Reed JC. Mitochondrial and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-12.*
35. *Hu Y, Benedic MA, Wu D, Inohara N, Núñez G. Bcl-XlL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspasas 9 activation. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 4386-91.*
36. *Zou H, Henzel WE, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1 a human protein homologous to C elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 1997; 90: 405-13.*
37. *Li P, Nijhawan, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic preotease cascade. Cell 1997; 91: 479-89.*
38. *Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Nuñez G. Bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(10): 4304-8.*
39. *Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fuji S, Loh DY. Massive cell death of immature hematopoietic cell and neurons in Bcl-X-deficient mice. Science 1995; 267:1507-10.*
40. *Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holzman DM, Snider WD. Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. J Neurosci 1998; 18: 1009-19.*
41. *Kulik G, Weber MJ. Akt-dependent and –independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. Mol cell Biol 1998; 18: 6711-18.*
42. *Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Belliveau D, Fawcet J, Miller FD, Barker PA. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. J Neurosci 1997; 17: 6988-98.*
43. *Cotman CW. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 1998; 19(S1): S29-S32.*
44. *Su JH, Deng GM, Cotman CW. Bax protein expression is increased in Alzheimer brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression and brain pathology. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56: 86-93.*
45. *Lassman H, Bancher C, Breitscholpf H, Weigiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. Acta Neuropathol 1995; 89: 35-41.*
46. *Cotman CW, Anderson AJ. Apotential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. Mol Neurobiol 1995; 10: 19-45.*
47. *Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW. Immnunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. Neuroreport 1994; 5: 2529-33.*
48. *Troncoso JC, Subo RR, Kawas CH, Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55: 1134-42.*
49. *Lucanssen PJ, Chung WC, Kamphorst W, Swaab DF. DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ and labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer's disease in absence of apoptotic morphology. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56: 887-900.*
50. *Standelmann C, Bruck W, Bancher C, Jellinger K, Lassman H. Alzheimer's disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. J Neuropathol Exp Neurol 1998; 57: 456-64.*
51. *Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A beta): association of c-Jun with A beta-induced apoptosis. J Neurochem 1995; 65: 1487-98.*
52. *Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Jonson EM Jr. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: Identification of c-Jun as necessary for neuronal apoptosis. J cell Biol 1994; 127: 1717-27.*
53. *Anderson AJ, Su JH, Cotman CW. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization con c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area and effect of postmortem delay. J Neurosci 1996; 16: 1710-19.*
54. *Tortosa A, López W, Ferrer I. Bcl-2 y Bax protein expression in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 1998; 95: 407-12.*
55. *Kitamura Y, Shimahama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry PJ, Whitehouse PJ, Taniguchi T. Alteration of protein regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32 in Alzheimer's disease. Brain Res 1998; 780: 260-9.*
56. *Cotman CW. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 1998; 19(1S): S29-S32.*

57. Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A. The neuronal microtubule associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. J Neurochem 2000; 75: 624-33.
58. Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, Kwon YK, Kim HH, Gwag BJ, Mook-Jung IH, Jung YK. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. Neurobiol Dis 2001; 8: 162-72.
59. Gamblin CT, Chen F, Zambrana A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet A, Lu M, Fu Y, García-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry R, Binder LI. Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillar tangle in Alzheimer's disease. PNAS 2003; 100(17): 10032-7.
60. García-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Muñoz J, Mena R. Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforate pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. J Chem Neuroanat 2001; 22: 65-77.
61. Fasulo L, Visintin M, Novak M, Cattaneo A. Tau truncation in Alzheimer's disease: expression of a fragment encompassing PHF core tau induces apoptosis in COS cells. Alzheimer's Rep 1998; 1: 25-32.
62. Amadoro G, Serafino AL, Barbato C, Ciotti MT, Sacco A, Calissano P, Canu N. Role of N-terminal tau domain integrity on the survival of cerebellar granule neurons. 11: 217-230
63. Kobayashi K, Nakano H, Hayashi M, Shimazaki M, Fukutani Y, Sasaki K, Sugimori K, Koshino Y. Association of phosphorylation site of tau protein with neuronal apoptosis in Alzheimer disease. J Neurol Sci 2003; 208: 17-24.
64. Standelmann C, Deckwerth T, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H. Activation of caspasas-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1999; 155(5): 1459-66.
65. Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller W. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol 2003; 66: 1627-34.
66. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Jonson AB, Crees Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. J Neurosci 2001; 21: 3017-23.
67. Cottrell DA, Borthwik GM, Johnson MA, Ince PG, Turnbull. The role of cytochrome C oxidase deficient hippocampal neurons in Alzheimer's disease. Neuropathol App Neurobiol 2002; 28(5): 390-6.
68. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochem Biophys Acta 2000; 1502: 139-44.
69. Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredensen DE. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amiloid beta-protein precursor. Nat Med 2000; 6: 397-404.
70. Kuida K. Caspase-9. Int J Biochem Cell Biol 2000; 32(2): 121-4.
71. Rhon TT, Rissman RA, Davis MC, Cotman CW, Head E. Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in Alzheimer's disease brain. Neurobiol Dis 2002; 11(2): 341-54
72. Aliev G, Smith MA, Seyidov D, Neal ML, Lamb BT, Nunomura A, Gasimov EK, Vinters HV, Perry G, La-Manna JC, Friedland RP. The role of oxidative stress in the patophysiology of cerebrovascular lesions in Alzheimer's disease. Brain Pathol 2002; 12: 21-35.
73. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3 like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell 1996; 85: 817-27.
74. Takahashi A. Caspase: Executioner and undertaker of apoptosis. Int J Hematol 1999; 70: 226-32.
75. Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. Neurosci Lett 1995; 189: 167-9.
76. Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. J Neurosci Res 1994; 39: 669-73.
77. Perry G, Nunomura A, Luchasen P, Lassmann H, Smith MA. Apoptosis and Alzheimer's disease (Letter). Science 1998; 282: 1268-9.
78. Raina A, Hochman A, Zhu X, Rottamp C, Nunomura A, Siedlak S, Boux H, Castellani R, Perry G, Smith M. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 2001; 101: 305-10.