



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

PATOLOGÍA DE LAS MOTONEURONAS EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA):

Bases celulares y moleculares de la patogenia

PATHOLOGY OF MOTOR NEURONS IN AMIOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS):

Cellular and molecular bases of pathogenesis

Autora: María Macho Mier

Directora: M. Teresa Berciano Blanco

Co director: Miguel Lafarga Coscojuela

Santander, Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	11
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1.Revisión bibliográfica	17
4.2.Estudio histopatológico en el ratón hSOD1^{G93A}	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1.Fisiopatología de la ELA humana y su clasificación	19
5.1.1.La esclerosis lateral amiotrófica humana.....	19
5.1.2.Rasgos clínicos de la ELA humana	21
5.1.3.Clasificación de la ELA.....	22
5.2.Biogénesis de especies reactivas de oxígeno (ROS): regulación por la SOD1	23
5.2.1.Papeles funciones de las ROS y de las SODs en la salud y en la enfermedad	24
5.3.Repercusión del estrés oxidativo en la ELAf humana por mutación en el gen SOD1	27
5.4.La réplica murina de la ELAf humana por SOD1-G93A desarrollada en Medicina Experimental	30
5.5.Mecanismos moleculares de la toxicidad de SOD1 en la patogénesis de la ELAf- SOD^{mut}	33
5.5.1. Repercusión del estrés oxidativo en las organelas de las MNi	33
5.5.2. Patogenia de las MNs-SOD^{mut} inducida por la glía circundante	35
5.6.Tratamiento	38
5.7.Estudio histopatológico en el ratón hSOD1^{G93A}	38
6. CONCLUSIONES.....	43
7. BIBLIOGRAFÍA	45
8. AGRADECIMIENTOS	49

ABREVIATURAS

ATM/Mec1: kinasa ataxia-telangiectasia

CAT: catalasa

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ELAe: esclerosis lateral amiotrófica esporádica

ELAf: esclerosis lateral amiotrófica familiar

EMG: electromiografía

EMT: estimulación magnética transcraneal

FMEEs: fibras musculares estriadas esqueléticas

Glu: glutamato

GPO: glutatión peroxidasa

IP: ioduro de propidio

MNi : motoneuronas inferiores

MNs: motoneuronas

MNsp: motoneuronas superiores

mRNAs: RNAs mensajeros

MVBs: cuerpos multivesiculares

pSOD1: estado fosforilado SOD1

REDOX: reducción-oxidación.

RER/RE: retículo endoplásmico rugoso

ROS: especies reactivas de oxígeno

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

SUP: sistema ubiquitina-proteasoma

UM: unidad motora

RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta tanto a las motoneuronas superiores (MNs) como a las espinales o inferiores (MNs). Aunque su sintomatología es muy inespecífica, las fasciculaciones y la parálisis son constantes en los enfermos, progresando posteriormente hasta alcanzar la afectación de la musculatura respiratoria, causa principal de muerte en estos pacientes. Aunque, en su mayoría, se trata de una enfermedad esporádica (ELAe), al menos un 5-10% de los casos son familiares (ELAf), con herencia autosómico recesiva. En los casos de ELAf destaca la mutación del gen que codifica la metaloproteasa SOD1 ($SOD1^{mut}$). La dismutasa SOD1 tiene funciones fisiológicas importantes, contribuyendo al mantenimiento del equilibrio redox celular. Sin embargo, en la ELAf inducida por déficit funcional de $SOD1^{mut}$ se induce estrés oxidativo que contribuye a aumentar los radicales libres de oxígeno, altamente tóxicos para la MN conllevando la disfunción de organelas vitales como son el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Además de la afectación propia de las MNs por el estrés oxidativo, otros elementos del neuropilo como la astrogelia, microglia y oligodendroglia, contribuyen a la patogenia de la ELA. El resultado final es la degeneración progresiva de las MNs, la denervación muscular y la parálisis progresiva. Desgraciadamente, no existe en la actualidad ningún tratamiento curativo para esta enfermedad.

Palabras clave: esclerosis lateral amiotrófica, estrés oxidativo, SOD1.

SUMMARY

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects both the superior (MNs) and the spinal or lower (MNs) motor neurons. Although the symptomatology is highly nonspecific, fasciculations and paralysis are present in the patients, that progress until reaching the affection of the respiratory musculature, the main cause of death in these patients. Although, for the most part, it is a sporadic disease (ALSs), at least 5-10% of the cases are familial (ALF), with an autosomal recessive inheritance. In ALF patients, the mutation of the gene encoding the metalloprotease SOD1 ($SOD1^{mut}$) is highlighted. SOD1 dismutase has important physiological functions, contributing to the maintenance of the cellular redox balance. However, in the cases of ALF caused by the functional deficiency of $SOD1^{mut}$, oxidative stress is induced, which contributes to the increase of free oxygen radicals, highly toxic to the MN, leading to dysfunction of vital organelles such as endoplasmic reticulum and mitochondria. In addition to the specific affection of MNs due to oxidative stress, other neuropil elements such as astrogelia, microglia and oligodendroglia, also contribute to the pathogenesis of ALS. The end result is the progressive degeneration of MNs, muscular denervation and progressive paralysis. Unfortunately, there is no current curative treatment for this disease.

Key words: Amyotrophic lateral sclerosis, oxidative stress, SOD1.

1. INTRODUCCION

Todas las actividades humanas relacionadas con el mundo que nos rodea se llevan a cabo a través de redes neuronales motoras, formadas por el conjunto de circuitos nerviosos asentados en el encéfalo y en la médula espinal. Este sistema garantiza la contracción voluntaria de los músculos del aparato locomotor. Sin embargo, para que el movimiento sea eficiente es necesaria la cooperación de los sistemas de información sensorial que garantizan el control involuntario postural, del equilibrio y de la respuesta refleja. En la mayoría de los tratados de anatomía humana se describen tres tipos de movimientos que, en función de sus características y de la necesidad de control voluntario, se definen como: i) movimientos reflejos, que son respuestas automáticas, rápidas e involuntarias de los músculos en respuesta a un estímulo sensitivo; ii) los movimientos rítmicos que combinan secuencias cíclicas repetitivas con ajuste voluntario; y, finalmente, iii) los movimientos voluntarios, que son los más complejos y requieren aprendizaje. A continuación, vamos a centrarnos en el estudio de los movimientos motores voluntarios, un sistema complejo y perfectamente jerarquizado y que, en última instancia, conlleva la contracción muscular (Ojeda-Sahagún e Icardo de la Escalera, 2005; García-Porrero y Hurlé, 2015) (Fig. 1).

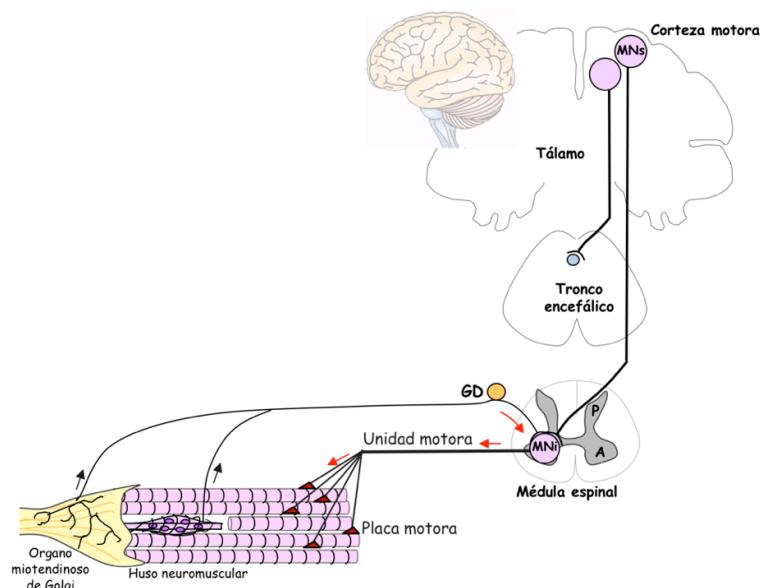


Figura 1. Sistema motor. La motoneurona superior (MNs) del tracto córtico-espinal con el curso descendente establece contacto sináptico con la motoneurona inferior espinal (MNI). El axón de la MNI se ramifica (unidad motora) dando las placas motrices sobre el sarcolema de las fibras musculares estriadas esqueléticas (FMEEs). La neurona sensitiva (GD) transmite información del tono muscular de los receptores musculares husos y órganos miotendinosos (Dra. MT Berciano).

La corteza motora comprende tres áreas diferentes del lóbulo frontal del cerebro, que están inmediatamente anterior al surco central: la corteza motora primaria (área 4 de Brodmann) o M1 y las áreas secundarias M2 que incluyen la corteza premotora y el área motora suplementaria (área 6 de Brodmann). La corteza motora primaria (M1) está localizada en la circunvolución precentral y en el lóbulo paracentral anterior de la superficie medial del cerebro y estimulándola con una mínima cantidad de corriente eléctrica, produce movimientos simples de partes concretas e individuales del cuerpo humano. En cambio, la estimulación de la corteza premotora o del área motora

suplementaria requiere mayores cantidades de corriente que dan como resultado movimientos más complejos que los producidos por la estimulación de la corteza motora primaria. Estudios realizados en monos estimulando las áreas secundarias por períodos prolongados de tiempo (500 mseg) produce el movimiento de una parte del cuerpo que, desde una posición inicial cualquiera llega a una postura o posición estereotípica. Por lo tanto, parece que la corteza premotora y el área motora suplementaria son regiones de nivel superior, que codifican los patrones motores complejos y seleccionan planes motores apropiados para obtener los resultados finales deseados. El área motora primaria (M1) contiene motoneuronas superiores corticales (MNsp) de gran tamaño que emiten sus axones para formar el sistema piramidal, sus fibras descenden por la cápsula interna hasta alcanzar la asta anterior de la médula donde sinaptan con la segunda motoneurona inferior espinal (MNI) (Fig. 2A). Las MNI están situadas en la asta anterior de la médula espinal (Ojeda-Sahagún e Icardo de la Escalera, 2005). Las MNI ubican su soma y dendritas en la asta anterior y sus axones forman las fibras nerviosas periféricas. Éstas están fuertemente mielinizadas y viajan a través de los nervios periféricos hasta alcanzar el músculo estriado esquelético al que inervan. A nivel del músculo, el axón se ramifica dando varias terminaciones nerviosas, cada una de las cuales inerva una fibra muscular estriada esquelética (FMEES) formando la denominada sinapsis neuromuscular. El conjunto de todas las fibras musculares estriadas esqueléticas inervadas por un único axón perteneciente a una MNI es una unidad funcional y se denomina unidad motora. A su vez, cada una de las terminales, de la unidad funcional forman una placa motora (Kierzenbaum y tres, 2016); Alberts y cols., 2015) (Figs. 1 y 2B). Cuando una MNI se estimula, todas las fibras musculares de la unidad que inerva se contraen al unísono, cumpliéndose la ley del “todo o nada” (García-Porrero y Hurlé, 2015).

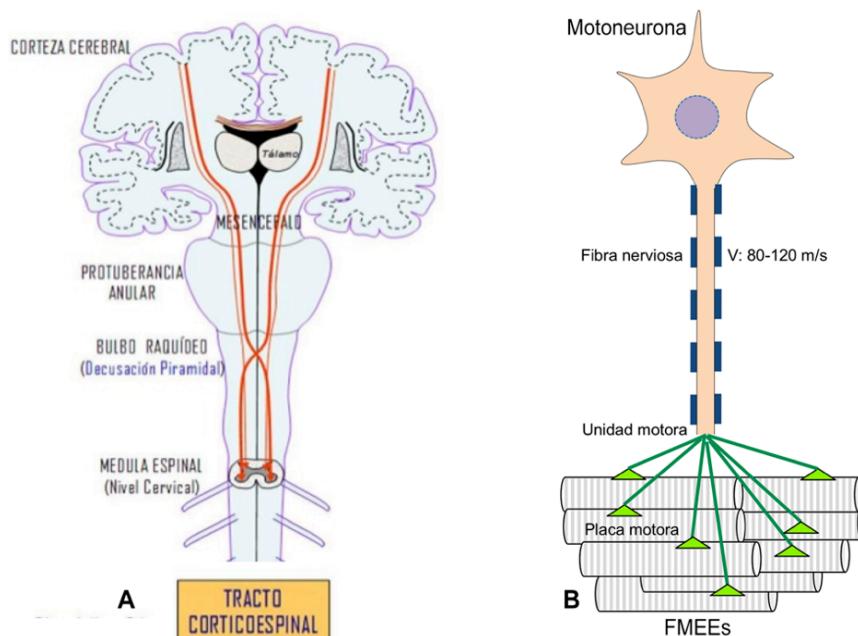


Figura 2. A. Ilustra el tracto motor corticomedular. B. Motoneurona inferior (MNI) en la que se ilustra su axón muy mielinizado (fibra nerviosa motora con velocidad de conducción muy rápida y como al llegar a las FMEEs se ramifica dando varias terminaciones nerviosas (placas motoras) en lo que conjuntamente se denomina una unidad motora (la imagen A es una reproducción de dominio público de <https://es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia>; B imagen cedida por Dra. MT Berciano).

En los pacientes con enfermedad de la motoneurona, como son la esclerosis lateral amiotrófica o la atrofia muscular espinal, en las que hay una pérdida progresiva de MNs, se produce la denervación de las fibras musculares estriadas esqueléticas (FMEEs) y la parálisis de los músculos esqueléticos y, consecuentemente, a la muerte de los pacientes en pocos meses o años tras el debut clínico de la enfermedad.

Centrándonos en la enfermedad de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (que a partir de aquí denominaré ELA), es una enfermedad motora neurodegenerativa, de etiología no filiada, que afecta a ambas MNs, las MNsp y las MNi. Si bien se han propuesto muchos factores predisponentes causantes de la enfermedad, parece que ninguno ha conseguido una relación estadísticamente significativa. Aunque la sintomatología motora no es específica de esta enfermedad, siempre cursa con debilidad muscular y atrofia de las FMEEs que va seguida de parálisis progresiva. Ésta puede afectar a cualquier segmento del cuerpo y sus síntomas y signos incluyen dishabilidad, incoordinación y dificultad en la marcha propios de la afectación de la MNsp o atrofia muscular y fasciculaciones en el caso de la afectación de las MNi. Incluso, la afectación neurológica puede ser mixta. Las manifestaciones más complejas corresponden a la afectación de la musculatura bulbar; incluyen la disartria y la disfagia; ésta última favorece la presencia de atragantamientos y aspiraciones en estos pacientes. Conviene recordar que, aunque la ELA se considera una enfermedad puramente motora, también pueden afectarse otros sistemas como son la alteración de la esfera cognitiva, síntomas autonómicos y alteraciones sensitivas. Con respecto al tratamiento clínico de los pacientes, desgraciadamente, solo disponemos de medidas sintomáticas puesto que ningún tratamiento ha conseguido la remisión de la enfermedad, tratándose de una incógnita hoy día (Farreras y Rozman, 2016; Zaranz, 2008).

Como veremos más adelante, la ELA es en la mayoría de los casos es una enfermedad esporádica (ELAe) aunque en un pequeño porcentaje de los casos se trata de una enfermedad familiar (ELAf) (5-10%). Generalmente, la herencia es autosómica dominante y se han descrito muchos genes y sistemas moleculares involucrados en su patología. Por esta razón a la ELA se le considera cuya etiopatología es multifactorial ya en su conjunto comprometen progresivamente la supervivencia de las MNs. Es muy intrigante la vulnerabilidad preferencial de las MNs a la neurodegeneración en la ELA, particularmente en las variantes de ELAf ya que la mutación o delección del gen comprometido se expresa por igual en todas las células somáticas, neuronales y no neuronales. Se justifica en sus características fisiológicas especiales, tales como son su gran tamaño, requerimientos metabólicos y bioenergéticos elevados. Además, las MNs son extremadamente sensibles a los agentes excitotóxicos y a las especies reactivas de oxígeno (ROS). De hecho, la mayoría de las enfermedades de la motoneurona cursan con estrés oxidativo. En este contexto, existe una enzima que parece jugar un papel central en la patogenia de una variante de ELAf. Se trata de la enzima superóxidodismutasa 1 (SOD1), encargada de eliminar radicales libres de superóxido ($O^{•-}$) y cuya forma mutada está presente en el 20% de las formas familiares de la ELA (Ferraiuolo and cols., 2011; Farreras y Rozman, 2016; Ruegsegger y Saxena, 2016;).

Todo lo comentado anteriormente, unido al hecho de tratarse de una enfermedad compleja y letal para los enfermos que la padecen, despertó mi interés y curiosidad científica para ampliar mi conocimiento acerca de esta enfermedad. Dada la enorme variedad de formas clínicas de ELA voy a centrar el presente TFG en la ELA familiar inducida por la mutación o delección del gen *SOD1* que codifica la dismutasa SOD1. En particular, estudiaré la repercusión del estrés oxidativo en las MNi espinales como consecuencia del déficit reductor de la enzima SOD1. A mi entender, su estudio tiene mucho interés ya que, la neurodegeneración inducida por el estrés oxidativo, es punto en común de todas las formas de ELA, independientemente de la disfunción de SOD1.

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Las enfermedades de la motoneurona (entre las que se encuentra la ELA) continúan representando un reto para cualquier profesional médico, tanto a nivel diagnóstico como terapéutico, puesto que la mayoría de ellas carecen de un tratamiento específico, o bien éste no es curativo. Es importante recalcar que la calidad de vida que presentan los enfermos con ELA es pésima; puesto que sus funciones intelectuales están preservadas y el paciente es plenamente consciente de su progresivo deterioro físico. Esto requiere de una atención multidisciplinaria, que intente evitar dentro de lo posible el sufrimiento del paciente (Oliveira y Pereira, 2009).

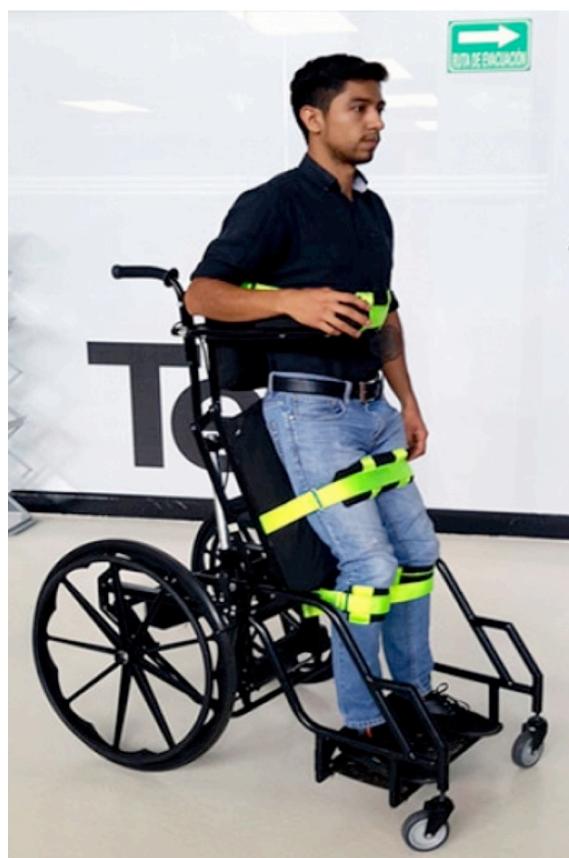


Figura 3. Imagen de un paciente con ELAf con 6 meses de evolución de la enfermedad desde su diagnóstico clínico. La reproducción de la fotografía ha sido tomada de ela.org.mx.

En el amplio y desconocido contexto de las enfermedades neurodegenerativas de la motoneurona en el adulto, nos centramos en una de las más devastadoras, la ELA. Como ya se ha comentado, si bien su epidemiología es muy variable, las formas familiares suelen debutar temprano, en torno a la 3^a o 4^a década de la vida (revisado de Pichler-Martel and cols, 2016). La supervivencia mediana de los pacientes con ELA oscila en torno a los 19-30 meses desde el momento del diagnóstico y la tasa de supervivencia media es del 22% a los 5 años y en torno al 10% a los 10 años.

Tal y como se ha explicado en la introducción, las causas que conducen a la enfermedad continúan siendo desconocidas. Durante varias décadas, ha sido la ELAf el principal objetivo de los estudios de los que disponemos, probablemente porque el

estudio de su fisiopatología es más específico, se debe a un déficit en la expresión génica heredado por mutaciones o delecciones concretas en las células germinales. No obstante, algunas de estas mutaciones y delecciones aparecen esporádicamente causando formas de ELAe. La base genética de la ELA familiar (ELAf) es muy diversa. Entre los genes mutados o delecionados destacan genes que codifican las proteínas TDP43 y FUS. Estas proteínas, son clave para el correcto funcionamiento de las MNs ya que, están implicadas en la transcripción, procesamiento y exportación de los mRNA, procesos muy activos en las células con gran actividad metabólica como es el caso de las MNs (Andersen y Al-Chalabi, 2011). Pero de todas las variantes de ELAf, se ha estudiado con mayor profundidad, tanto en la clínica humana como en modelos animales de medicina experimental, la ELA inducida por mutación en el gen *SOD1* que codifica la dismutasa soluble que lleva su nombre. El gen *SOD1* es muy vulnerable a la mutación; de hecho, se han descrito numerosas (más de 150) mutaciones puntuales en secuencias génicas codificantes y no codificantes que, mayoritariamente, provocan un déficit reductor y, consecuentemente, estrés oxidativo (Kaur y cols., 2016). No obstante, merece la pena señalar que aunque, en muchos casos, la mutación de *SOD1* no compromete su capacidad reductora pero las MNs experimentan estrés oxidativo. Se propone esto se debe más a una ganancia de función tóxica por su enorme tendencia a la agregación que a su déficit funcional enzimático. Además, la tendencia a la agregación compromete su degradación por vía ubiquitina-proteasoma (VUP). En consecuencia, se considera que la agregación y su defecto en la proteólisis son la base de su etiopatología (Ruegsegger y Saxena, 2016) (profundizaremos a lo largo del trabajo).

La pieza central de mi TFG será estudiar en profundidad el papel de la enzima SOD1 en condiciones fisiológicas y su repercusión funcional en la ELAf como consecuencia de la mutación puntual en la glicina (G) 93 que es sustituida por una alanina (A) (*G93A*) (Ruegsegger y Saxena, 2016). Como se describe en el apartado de resultados y discusión esta enzima se encarga de eliminar los radicales libres de oxígeno (O^{--}) redundantes para que las células preserven los niveles REDOX fisiológicos. Sin embargo, la SOD1 mutada en *G93A* (*SOD1^{G93A}*) el plegamiento aberrante y a la formación de agregados citoplasmáticos citotóxicos (no digeribles) alteran los sistemas de señalización celular que son fundamentales para la supervivencia celular siendo la principal diana las MNs (Riancho y cols., 2015a y b); Ruegsegger y Saxena, 2016).

Para desarrollar el presente TFG se pretende profundizar en el conocimiento actual de la histopatología del ELA mediante el estudio bibliográfico del estado actual del tema. El parcial desconocimiento sobre esta enfermedad neurodegenerativa, su terrible desenlace y el apasionante mundo de la neurobiología han despertado mi interés para realizar este trabajo y para revisar los estudios realizados acerca de esta patología. Además, como parte de mi trabajo realizaré en el laboratorio de biología celular, dirigido por los profesores María Teresa Berciano y Miguel Lafarga, prácticas utilizando secciones histológicas de astas anteriores de médula espinal pertenecientes a ratones controles y transgénicos que expresan la SOD1 mutada (ratón ELA-*hSOD1^{G93A}*). Estos ratones son un modelo excepcional de medicina experimental ya que su clínica e histopatología mimetizan con bastante fidelidad la ELAf humana como cuya etiología se debe a la misma mutación.

En mi modesto entender, la oportunidad que se me brinda con este TFG en mi formación académica pues me ha permitido aproximarme a la investigación neurobiológica básica con proyección clínica. Como comentaré con más detalle más adelante, este modelo de ratón transgénico induce estrés oxidativo por lo que en la parte práctica estudiaré su repercusión histopatológica en las motoneuronas espinales (MNI).

3. OBJETIVOS

Los objetivos concretos que se van a desarrollar a lo largo del presente Trabajo de Fin de Grado son los siguientes:

1. Revisar bibliográficamente la situación y el conocimiento actual del tema referido a la fisiopatología humana de la ELA: clasificación, histopatología clínica y tratamiento.
2. Estudiar su extrapolación al modelo de medicina experimental del ratón transgénico hSOD1^{G93A}.
3. En particular, se pretende estudiar la función antioxidante de la enzima SOD1 en condiciones fisiológicas y la repercusión celular del estrés oxidativo mediado por su disfunción de la dismutasa SOD1.
4. Conocer las consecuencias específicas del estrés oxidativo en las motoneuronas espinales o inferiores (MNi) y en las células gliales, particularmente en la astroglia, microglia y oligodendroglia.
5. Comprender el concepto de prion-like referido a la dismutasa hSOD1^{G93A} y su potencial facultad en la transmisión entre las MNi y entre estas y elementos celulares no-neuronales residentes en el neuropilo del asta anterior de la médula espinal.
6. Analizar comparativamente la repercusión histopatológica del estrés oxidativo en las MNi del ratón transgénico hSOD1^{G93A} centrando nuestro interés en la maquinaria de síntesis de proteínas (grumos de Nissl), el RE y las mitocondrias cuando se compara con el ratón control.
7. Para desarrollar el objetivo 6 se utilizarán técnicas de microscopia óptica (MO) confocal y de microscopia electrónica (ME).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente Trabajo de Fin de Grado he empleado el siguiente protocolo:

4.1. Revisión bibliográfica

La información utilizada para desarrollar el presente trabajo ha sido obtenida de los siguientes instrumentos docentes: en primer lugar, de los libros de Neuroanatomía Humana publicados por los profesores de la UC Ojeda-Sahagún e Icardo de la Escalera (2005) y por los profesores García-Porrero y Hurlé (2015). Se trata de libros de texto con un gran interés docente, de los que he obtenido información valiosa para estudiar la anatomía del SNC y, para conocer las vías motoras corticomedulares descritas en la introducción y vías periféricas neuromusculares. Asimismo, la revisión de textos como el de los autores Kierzenbaum y tres (2016) y Alberts y colaboradores (2015) me ha permitido comprender y profundizar conceptos de gran importancia funcional en el campo de la neurohistología incluyendo el concepto de unidad funcional motora o la sinapsis neuromuscular. En segundo lugar, he revisado a través de PubMed artículos científicos originales y revisiones publicados entre los años 2006-2016 que se centran en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su papel fisiológico en la salud y en la enfermedad. Otro objetivo de la revisión bibliográfica era comprender el concepto de Prion-like de SOD1 y su posible papel en la amplificación y difusión de la enfermedad de la ELA. En tercer lugar, y en relación con la fisiopatología de la ELA, he revisado artículos que se centran, principalmente, en la clasificación de la ELA, en los daños neurobiológicos y moleculares que provocan la degeneración progresiva de las MNs afectadas en la ELA. A su vez, como material complementario adicional, me servido de gran ayuda informativa, las tesis doctorales dirigidas al estudio de las MNi y de las neuronas sensitivas de los ganglios dorsales en modelo murino hSOD1^{G93A} del doctor Javier Riancho Zarrabeitia (2015) y de la Dra. María Ruiz Soto (2016) y los trabajos científicos que de ambas tesis se han publicado en revistas científicas de gran impacto internacional. Además, dado que ambas tesis doctorales han sido dirigidas por la Profa. Berciano y el Prof. Lafarga y son especialistas en la enfermedad de la ELA humana y murina, realizar bajo su dirección mi TFG ha sido una oportunidad científica fundamental para mi formación médica. Finalmente, he utilizado la página web www.sen.es especializada en enfermedades neurológicas.

4.2. Estudio histopatológico en el ratón hSOD1^{G93A}

Con respecto a la parte práctica de mi trabajo, he podido tener acceso a diversas muestras histológicas de astas anteriores de la médula espinal obtenidas de ratones controles y con expresión ectópica del gen mutado que codifica la proteína hSOD1^{G93A}. Este modelo animal procede de los Laboratorios Jackson y se criaron y mantuvieron en el Servicio de Experimentación animal de la Universidad de la Universidad de Lleida. En este material se pretende estudiar mediante microscopia óptica y confocal la repercusión que el estrés oxidativo tiene en la distribución de la maquinaria de síntesis de proteínas utilizando respectivamente secciones semifinas teñidas con el colorante azul de toluidina y disociados neuronales marcados con ioduro de propidio (IP). El azul

de toluidina es un marcador básico y consecuentemente tiñe todas las estructuras acidad de la célula como son a nivel nuclear el DNA de la cromatina y del nucleolo y, en el citoplasma las áreas enriquecidas en ribosomas, RNAs y lisosomas. Por su parte, y de forma similar, el IP se une a los ácidos nucléicos del núcleo y del citoplasma y, en consecuencia, permite conocer la distribución normal y patológica de la organización de la cromatina y los grumos de Nissl citoplasmáticos. En segundo, en secciones ultrafinas se analiza la contrapartida ultraestructural para analizar con mayor detalle la repercusión inducida por el estrés oxidativo en la maquinaria de síntesis de proteínas (grumos de Nissl), en el RE, mitocondrias y dictiosomas de Golgi.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Fisiopatología de la ELA humana y su clasificación

5.1.1. La esclerosis lateral amiotrófica humana

Como ya hemos comentado en la introducción la ELA humana es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte preferente y progresiva de las motoneuronas (MNs), tanto de las superiores (MNsp) como de las inferiores (MNI). La degeneración primaria o secundaria de las MNI inferiores conlleva a la disfunción del circuito medular motor y, consecuentemente, a la denervación de los músculos esqueléticos y, a la atrofia y progresiva parálisis muscular (Fig. 4). La mayoría de los casos de ELA aparecen de forma espontánea (ELAe), si bien entre 5-10% son formas familiares con carácter hereditario (ELAf), pero por el momento, en la mayoría de los casos, la etiología es desconocida (veremos con detalle más adelante). No obstante, el descubrimiento de que determinadas variantes de ELA tienen base genética con mutación o delección de genes que codifican proteínas cuya función es bien conocida, ha permitido avanzar en el conocimiento de las causas que pueden desencadenar la pérdida selectiva de las MNs, sus devastadoras consecuencias y abierto un campo futuro para diseñar futuras estrategias terapéuticas dirigidas para minimizar o curar esta letal enfermedad (Zarei y cols., 2015).

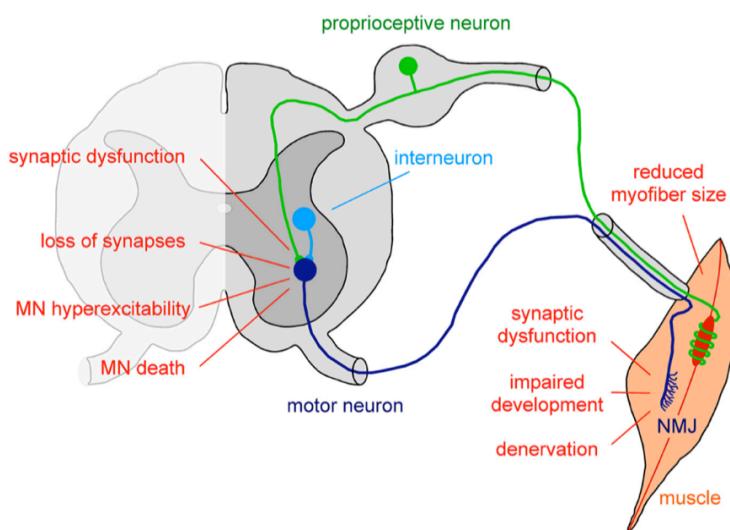


Figura 4. El esquema ilustra la repercusión de la neurodegeneración en el circuito medular de la MNI con el músculo estriado esquelético. Consecuentemente, la pérdida de neurosinápsis, provocan la disfunción muscular, su atrofia y parálisis progresiva (la imagen ha sido tomada Tisdale y Pellizzoni, 2015).

La ELA se describe por primera vez en la bibliografía en el año 1850 por los médicos Guillaume Benjamin Amand Duchenne y François-Amilcar Aran. Sin embargo, fue en el año 1869 cuando el neurobiólogo Jean-Martin Charcot y el anatomista Jean Cuveilheir describen la afectación simultánea de los tractos corticoespinales (MNsp) y de las MNI de la asta anterior de la médula espinal, estableciéndose el concepto actual de la enfermedad de la motoneurona como una esclerosis lateral amiotrófica o ELA. No obstante, en el curso del tiempo ha recibido diferentes nombres, se la conoce también

como la enfermedad de Charcot en honor a la primera persona que describió la enfermedad; como esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, parálisis bulbar progresiva y parálisis seudobulbar (ver Zarei y cols., 2015). Además, el hecho de que personajes famosos del deporte, el arte o la ciencia hayan padecido esta letal enfermedad ha servido de acicate para concienciar a la opinión pública y a los responsables de la sanidad pública de las devastadoras consecuencias de la enfermedad. De hecho, en Estados Unidos la ELA es conocida como la enfermedad de Lou Gehrig en honor a el jugador de béisbol de los Yankees de Nueva York, ya que padeció esta enfermedad en el año 1939.

De modo general, todas las variantes de ELA tienen como sello de identidad la pérdida de las MNs que, de forma primaria o secundaria conlleva un progresivo estrés celular que, por lo general, es oxidativo. Este estrés es irreversible y letal para las MNs pues sus dianas intracelulares son organelas requeridas para la supervivencia ya que alcanzan el núcleo y el citoplasma. De hecho, en el núcleo, el estrés neuronal genera daño en el DNA permanente que compromete su actividad transcripcional. Asimismo, en el citoplasma, afecta principalmente a la maquinaria de la síntesis de proteínas (RER), al retículo endoplasmico liso regulador del calcio intracelular (RE) y a las mitocondrias responsables de la síntesis de ATP (Andersen, 2004). Todo esto provoca cromatolisis central, degeneración axonal y la muerte neuronal programada por apoptosis. La pérdida progresiva neuronal conlleva la denervación de las FMEEs, la atrofia y parálisis muscular (Fig. 5).

Aunque los datos de incidencia y prevalencia de la ELA son muy variables en los cinco

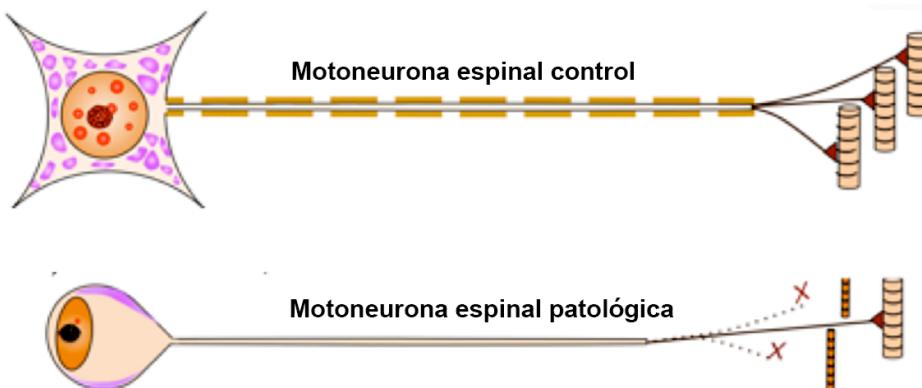


Figura 5. El esquema superior ilustra una MNI control. En el citoplasma se dibujan manchas que indican la gran abundancia de grumos de Nissls. El axón está fuertemente mielinizado y ramificado (unidad motora, UM) en varias terminaciones pre-sinápticas o placas motoras. En el esquema inferior se muestran los cambios citoplasmáticos tempranos en una MNI con ELA. Destaca desintegración de los grumos de Nissls, degeneración axonal y denervación de las FMEEs (la imagen cedida por la Profa. MT Berciano).

continentes podemos situarla entre 4-6 casos por cada 100.000 habitantes y la probabilidad de desarrollar la enfermedad aumenta con la edad, siendo la franja de edad más habitual entre los 65-70 años (Farreras y Rozman, 2016; Zarzanz, 2008). Se considera que hay diversos factores que predisponen al desarrollo de la enfermedad entre los que destacan, la exposición a toxinas ambientales, el ejercicio físico extenuante o el tabaquismo. Sin embargo, no se ha demostrado que éstos factores riesgo tengan una relación causal estadística con la enfermedad (Andersen y Al-Chalabi, 2011).

5.1.2. Rasgos clínicos de la ELA humana

Clínicamente, se considera que en la ELA humana existe una fase **presintomática**, en la que sin haber debutado las manifestaciones clínicas ya se ha producido una disfunción biológica importante en las MNs. Probablemente, este retardo clínico puede deberse a una respuesta reactiva inicial nueroprotectora de las MNs que permanecen sanas para mantener el circuito cortico medular y neuromuscular. De hecho, las MNi emiten mayor número de placas motoras por unidad motora (UM) sobre las FMEEs. Esta va seguida de la **fase clínica sintomática** en la que pueden aparecer en un mismo paciente y de forma conjunta signos y síntomas derivados de la afectación de ambas MNs, MNsp y MNi. Sin embargo, para facilitar la comprensión de los rasgos clínicos específicos, académicamente se explican de forma independiente la sintomatología característica de la afectación de las MNsp o de las MNi espinales (Zarranz, 2008; Farreras y Rozman, 2016).

En el caso de la **afectación de las MNsp**, su pérdida conlleva a un enlentecimiento del movimiento esquelético con dificultad para la marcha (secundaria al componente espástico de la misma), dishabilidad e incoordinación. En la exploración física aparece hiperreflexia con rigidez muscular y reflejo cutáneo plantar extensor. La disartria, disfagia y ronquera son los síntomas característicos de la afectación de la musculatura bulbar. En los pacientes de ELA con afectación bulbar es importante describir el síndrome pseudobulbar que consiste en risa y llanto inapropiado y a veces acompañado de laringoespasmo. Esto se produce como consecuencia de la degeneración de las proyecciones corticobulbares que inervan el tallo encefálico, provocando una exacerbación de la expresión motora de la emoción. La marcada inespecificidad de los síntomas complica el diagnóstico, que se realiza por exclusión, y hace que el enfermo peregrine por numerosos servicios en busca de una explicación a su problema (Farreras y Rozman, 2016).

Por su parte, la **afectación de las MNis** espinales se caracteriza clínicamente, en primer lugar, por una pérdida de fuerza asimétrica de desarrollo gradual, que comienza en la zona distal de una de las extremidades. También pueden aparecer calambres con los movimientos voluntarios, fundamentalmente durante las primeras horas de la mañana (Zarranz, 2008). Como consecuencia de la pérdida de fuerza muscular se produce atrofia muscular que se acompaña, en la fase inicial, de fasciculaciones. La debilidad muscular depende de la región afectada. Así, puede aparecer dificultad para el sostén cefálico y el mantenimiento del tronco por debilidad de la musculatura axial; disnea, que irá empeorando progresivamente hasta hacerse de reposo, con intolerancia al ejercicio e insuficiencia respiratoria por afectación de la musculatura respiratoria y diafragmática; con la afectación de las MNi se exacerba la disartria y la disfagia, favoreciendo los atragantamientos, las broncoaspiraciones y las infecciones respiratorias. No obstante, la musculatura ocular extrínseca y la esfinteriana se mantienen intactas hasta estadios muy avanzados de la enfermedad (Farreras y Rozman, 2016).

Es de gran importancia recalcar que, aunque a la ELA se la considera predominantemente motora es una enfermedad multisistémica. Así, en numerosos trabajos han relacionado a la ELA con la demencia fronto-temporal familiar

(ocasionada por la mutación o delección del gen *C9ORF72*) y, en algunos pacientes, con la enfermedad de Parkinson (Picher-Martel and cols, 2016). Otra entidad clínica que a menudo pasa desapercibida en los enfermos de ELA es la asociación con cuadros de depresión, que repercute negativamente en su calidad de vida. A medida que la enfermedad va progresando, suele debutar estreñimiento y retraso en el vaciamiento gástrico. Finalmente, aunque no es lo más frecuente, los enfermos pueden presentar alteraciones de la esfera sensitiva, siendo las parestesias su manifestación más común. Ésta ha sido la hipótesis central del trabajo de Tesis Doctoral desarrollado en un modelo en medicina experimental murino de ELA realizado en el laboratorio de los profesores Berciano y Lafarga (Ruiz Soto (2016).

No existe una prueba específica que nos proporcione la certeza diagnóstica, y se trata de un diagnóstico de exclusión, descartando aquellas patologías que dispongan de un tratamiento específico. Según el comité de la World Federation of Neurology existen unas guías diagnósticas que clasifican el diagnóstico como definitivo, probable, posible y sospechada, en función de las características clínicas y analíticas que presente el paciente. Como norma general, se solicita una analítica sanguínea completa, un estudio neurofisiológico y una prueba de neuroimagen (Zarranz, 2008). Los estudios analíticos se pueden ampliar según la sospecha diagnóstica; así, por ejemplo, si existen antecedentes familiares se analizan algunos genes implicados en la ELA o se realiza una punción lumbar si la sospecha va más orientada a un síndrome “ELA-like”. En todos los pacientes se debe descartar la neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción a través del estudio EMG, ya que puede confundirse con el ELA. En el EMG encontraremos, de manera difusa, un patrón de conducción neurógeno, con potenciales de UM con duración y amplitud aumentada, y potenciales polifásicos (Iriarte Franco y Artieda González-Granda, 2014). Recientemente, la estimulación magnética transcraneal (EMT) ha permitido valorar alteraciones de la conducción de la vía piramidal. En todos los pacientes con ELA se debe de realizar una resonancia magnética nuclear (RMN) para establecer un diagnóstico diferencial con otras patologías reversibles del SNC causadas por procesos inflamatorios o infiltrativos (Zarranz, 2008).

5.1.3. Clasificación de la ELA

De modo simplificado se distinguen dos formas de ELA: las variantes bulbares, en las que se afecta la musculatura bulbar y respiratoria, manifestándose en dificultad para tragar y masticar principalmente y las formas medulares, más frecuentes, que comienzan por afectación de la musculatura esquelética de las extremidades. Otra forma de clasificación es por su debut que, en la mayoría de los casos, es esporádico (ELAe) y en otros puede tener base hereditaria (ELAf). Lógicamente, la ELAe aparecen de novo y es la forma más habitual de desencadenar la ELA ($\approx 90\%$). Por el contrario, los casos familiares son mucho menos frecuentes ($\approx 10\%$) y la herencia suele ser autosómica dominante. No obstante, ahora sabemos que, algunos casos de ELAe puede también deberse a mutaciones génicas que aparecen espontáneamente pero no se transmiten a la descendencia (Andersen, 2006; Majounie y cols., 2012) (Fig. 6). Aunque en el 90% de los casos de ELAf la base genética no es conocida, se han identificado mutaciones en varios genes que codifican proteínas muy importantes para la supervivencia celular. En dos ellos destacan mutaciones que afectan a genes que

codifican proteínas de unión a RNA/DNA: la proteína TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) y la proteína FUS (fused in sarcome) ya que, funcionalmente, ambas proteínas son fundamentales para garantizar la proteostasis celular. La TDP43 es una proteína nuclear perteneciente a la familia de las ribonucleoproteínas donde interacciona con las moléculas de DNA y mRNA, interviniendo en la transcripción, “splicing” y la posterior exportación de mRNAs. Similarmente, la proteína FUS participa en el procesamiento de los mRNAs, tanto el “splicing” como en la exportación y en su traducción citoplasmática (ver Hayashi y cols., 2016). Recientemente, se ha descrito otra mutación responsable de otra variante de ELAf+. Se trata de expansiones por repeticiones de hexanucleótidos en el gen *C9orf72* (*chromosome 9 open reading frame 72*) que se traduce en una proteína expandida mutada con importantes alteraciones en los terminales pre-sinápticos. Es la forma más frecuente de ELAf (38%) y de la ELAe (6%). Como ya hemos comentado, la mutación o delección de este gen también puede causar demencia fronto-temporal. Otra variante de ELAf está ocasionada por la mutación del gen *SOD1* que codifica la metaloproteasa superóxido dismutasa 1 (*SOD1*). Aunque no es la forma más frecuente de ELAf es la mejor estudiada (el 20% de la forma hereditaria y un 3% de las formas esporádicas). Es precisamente en esta variante en la que centramos el interés del presente trabajo. En la figura 6 se ilustran la distribución proporcional de los genes implicados en las formas familiares y esporádicas de la ELA en relación con las formas de ELA con etiología desconocida (ELAf) (Andersen, 2006).

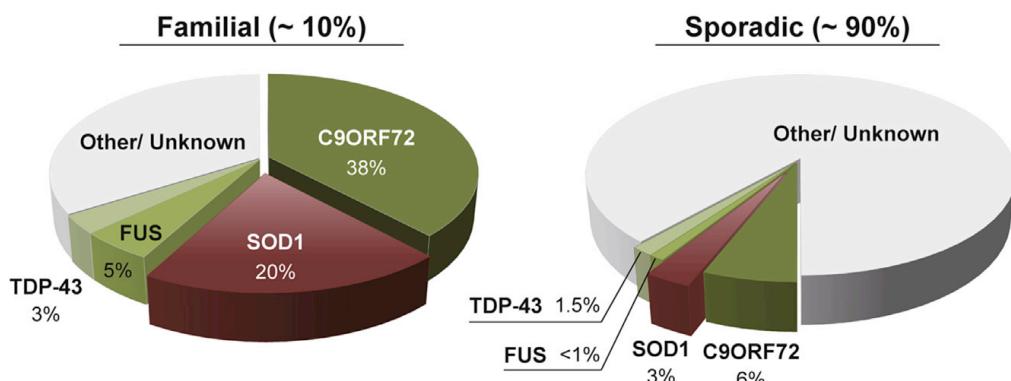


Figura 6. Se ilustran los genes mutados más importantes implicados en la ELAf y en la ELAs. La frecuencia de los genes se representa proporcionalmente. Nótese como la segunda causa genética, de aproximadamente un 20% de los casos de ELAf y un 3% de las formas esporádicas, se deben a la mutación en el gen *SOD1*. Tanto en la ELAf y ELAe la mayor proporción tiene etiología desconocida (Andersen, 2006).

5.2. Biogénesis de especies reactivas de oxígeno (ROS): regulación por la superóxido dismutasa1 (*SOD1*)

Antes de describir la variante de ELAf humana debida a la mutación del gen *SOD1* y su réplica en el modelo murino de medicina experimental haré una breve revisión acerca de la biogénesis de los ROS y de sus funciones, tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta al estrés oxidativo celular. Centraré mi interés en aquellas mutaciones de *SOD1* (*SOD1^{mut}*) en las que se produce estrés oxidativo por déficit funcional en la capacidad reductora de *SOD1*.

5.2.1. Papeles funcionales de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de las superóxido dismutasas (SODs) en la salud y en la enfermedad

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por "reactive oxygen species") representan un grupo de moléculas oxidadas generadas en el metabolismo oxidativo intracelular. Estos metabolitos son reactivos e incluyen el superóxido ($O_2^{-\cdot}$) y radicales libres de hidroxilo (OH^-), así como de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En base al compartimento celular en los que originan los ROS se definen cuatro mecanismos fundamentales: i) la transferencia electrónica mitocondrial, la fuente más importante de $O_2^{-\cdot}$ y de OH^- ; ii) a partir de reacciones enzimáticas inducidas por factores de crecimiento y proto-oncogenes incluyendo las catalizadas por la NADPH oxidasa (NOX), la xantina oxidasa, lipooxigenasas y el citocromo P450; iii) mediante la peroxidación de ácidos grasos de cadena larga en los peroxisomas; y , iv) los generados en el RE en respuesta al estrés inducido por el acúmulo de proteínas malplegadas y de Ca^{2+} (che y cols., 2016) (Fig. 7).

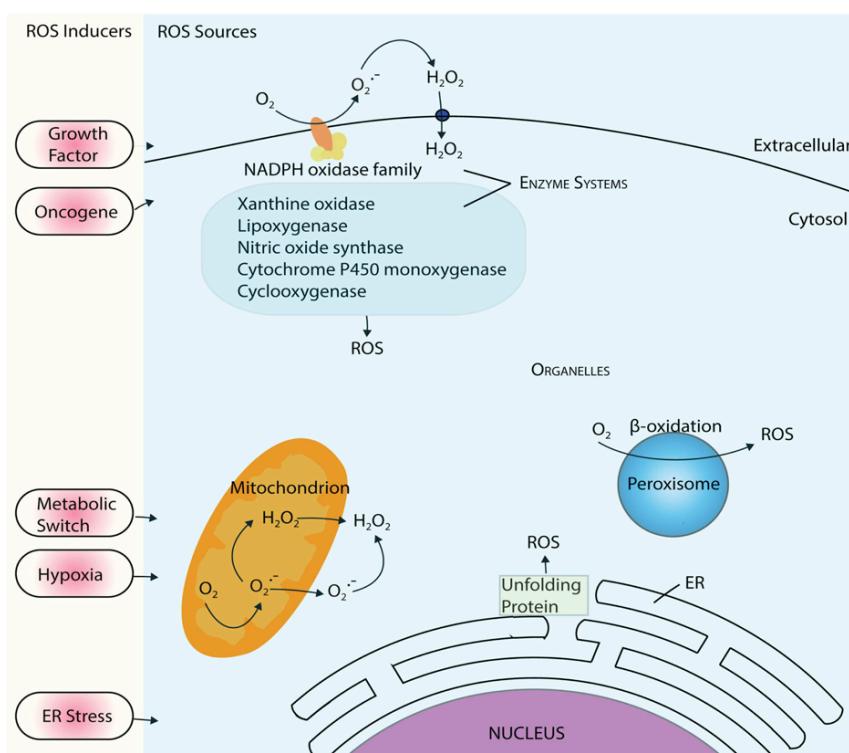


Figura 7. Mecanismos intracelulares de producción de ROS en las células eucariotas. La producción de ROS puede proceder de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (fuente principal $O_2^{-\cdot}$ y del H_2O_2); de reacciones enzimáticas incluidas las catalizadas NADPH oxidasa (NOX), xantina oxidasa, lipooxigenasa; de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en los peroxisomas; y de la respuesta de estrés del RER (Che y cols., 2016).

En **condiciones fisiológicas**, los niveles controlados de ROS son necesarios para modular determinadas funciones metabólicas intracelulares. Estas incluyen la transducción de señales en respuesta al estrés celular que a su vez regulan la expresión de genes de supervivencia celular. Por ejemplo, el $O_2^{-\cdot}$ oxida grupos de hierro-sulfuro (Fe-S) en enzimas como la aconitasa. Esta enzima, en su estado oxidado, puede activar la fase inicial del ciclo de Krebs. Asimismo, el $O_2^{-\cdot}$ ajustar la producción de ATP mitocondrial ejerciendo un "feedback" negativo reduciendo el transporte de e^- de la cadena respiratoria y, consecuentemente, la producción del ATP. Otra importante

función de los ROS procede del H_2O_2 ; ésta molécula es capaz de inactivar determinadas fosfatasas (Tirosina fosfatasa y fosfatasas lipídicas). la inhibición enzimática se debe a que el H_2O_2 oxida los residuos activos de las cisteínas catalíticas, lo que provoca un cambio conformacional en su estructura molecular y su inhibición funcional. Lógicamente, su inactivación permite que dianas como el receptor tirosina kinasa y segundos mensajeros lipídicos permanezcan en estado fosforilado que les capacita activar a factores de crecimiento, reguladores del metabolismo y de la proliferación celular (ver Andersen, 2004; Che y cols., 2016; Mondola y cols., 2016). Sin embargo, es muy importante que las células preserven la homeostasis celular de los ROS, cuyos niveles deben de estar en permanente equilibrio. Es decir, la producción de ROS debe de equiparse con la actividad de los sistemas antioxidantes. Cuando los ROS alcanzar niveles excesivos, particularmente en situaciones patológicas, provocan un desequilibrio entre fuerzas opuestas, el déficit de factores antioxidantes incrementa la producción de ROS. A esta situación se le denomina estrés oxidativo al que al menos en la fase inicial, las células responden a las vías productoras de ROS (inductoras), incrementando las vías antioxidantes (eliminadoras). Pero si no se consigue, el estrés oxidativo progresará exponencialmente llevando consecuencias deletéreas en las células que lo padecen. De hecho, niveles excesivos de ROS oxidan macromoléculas tales como el DNA, causando numerosas mutaciones, que repercuten en la biogénesis de proteínas aberrantes (mutadas). Esto puede llevar a ineficiencia de organelas específicas y de otras estructuras como las membranas celulares. Asimismo, los ROS pueden oxidar directamente proteínas, glúcidos y lípidos de uso intracelular que, en situaciones extremas, puede causar la muerte celular programada por apoptosis.

Las células somáticas controlan el estrés oxidativo desarrollando sistemas antioxidantes muy sofisticados entre los que destaca la dismutación de los radicales de $O_2^{•-}$ en peróxido de hidrógeno y oxígeno por las metaloproteasas superóxido dismutasa (SODs). Estas dismutasas pertenecen a una familia de isoenzimas altamente especializadas en neutralizar $O_2^{•-}$. Las células de los mamíferos poseen 3 isoformas que están codificadas por genes independientes: la forma dimérica Cu/Zn-SOD (SOD1) y, dos tetraméricas, la Mn-SOD (SOD2) y Cu/Zn-SOD (SOD3) (Pasinelli y Brown, 2006) (Fig. 8). Mediante la reducción y reoxidación del Cu^{2+} en SOD1 y SOD3 y del Mn en la SOD2, las tres enzimas, catalizan la misma reacción química, pero mientras que las SOD1 y SOD2 actúan a nivel intracelular, la SOD3 es extracelular (Fig. 8).

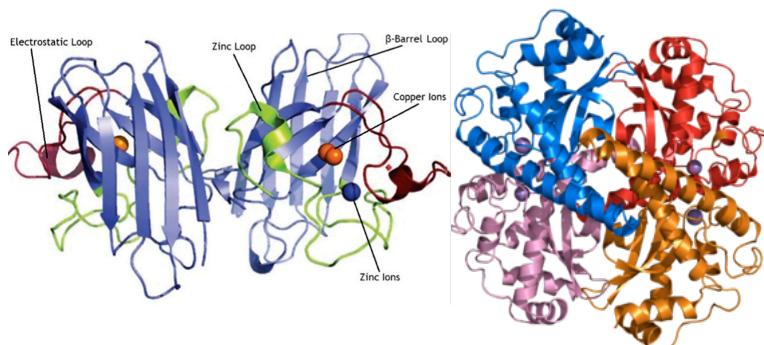


Figura 8. La estructura de la izquierda corresponde a la metaloproteasa dimérica SOD1 y la de la derecha a una forma tetramérica de SOD2 o de SOD3 (tomado de Kaur y cols., 2016).

Funcionalmente las SODs representan la primera defensa enzimática de las células contra el daño causado por los ROS. En el caso particular de la liberación de $O_2^{•-}$ las tres dismutasas lo reducen en H_2O_2 según se indica en la figura 9. Seguidamente, el

peróxido de hidrógeno generado en el proceso de la reducción se transforma en oxígeno molecular (menos tóxico) y agua debido a la acción de la catalasa (CAT) o de la enzima glutatión peroxidasa (GPO), protegiendo así a las células del estrés oxidativo (ver Andersen, 2004; Mondola y cols., 2016).

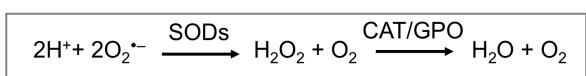


Figura 9. En la fórmula química en la que las SODs catalizan el $\text{O}_2^{\cdot-}$ transformándolo en H_2O_2 y O_2 que son convertidos en H_2O y oxígeno por la CAT y GPO.

La **SOD1** en su forma monomérica no es funcional por lo que de modo natural dimeriza para adquirir la forma activa. Es la metaloproteasa intracelular más importante, representa el 80% del total de las proteínas SODs. Además, mientras que **SOD2** es una reductasa de acción exclusiva en la matriz mitocondrial, la SOD1 se localiza en el citosol, en el espacio intermembranoso mitocondrial y el núcleo celular lo que le confiere la capacidad de actuar como agente antioxidante a nivel general intracelular. (Che y cols., 2016; Mondola y cols., 2016) (Fig. 10).

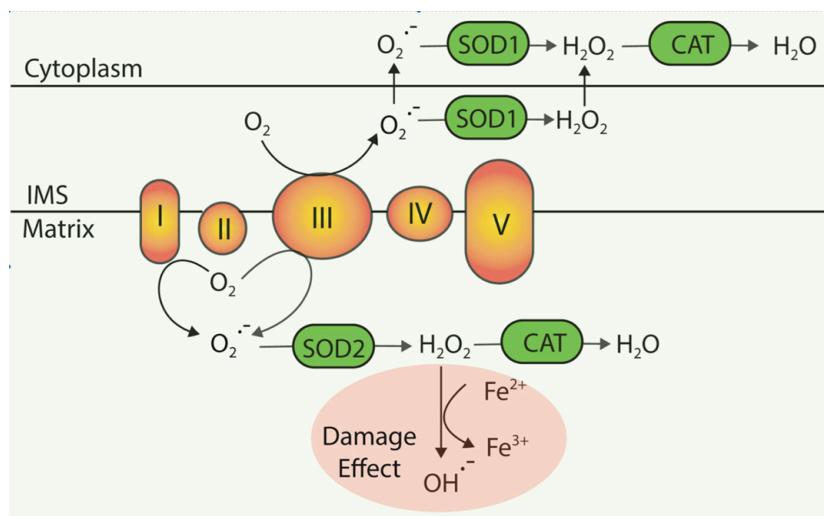


Figura 10. Sistemas celulares antioxidantes. Las enzimas SOD1 (citosólica y del espacio intermembranoso mitocondrial) y SOD2 (de la matriz mitocondrial) y la catalasa (CAT) eliminan, respectivamente, el anión superóxido de la cadena transportadora de electrones y el peróxido de hidrógeno (imagen tomada de Che et al, 2016).

Junto con las funciones canónicas clásicas de la SOD1 y de la SOD2 como antioxidantes intracelulares, hay evidencias muy sólidas que indican que ambas modulan otros procesos celulares. Por ejemplo, en la respiración mitocondrial, se sabe que SOD1 controla los niveles de H_2O_2 y, como ya hemos comentado, cuando éstos se elevan activan las vías de señalización para la proliferación celular (Fig. 11). Asimismo, tienen mucho interés las observaciones que demuestran que la presencia de SOD1 en el núcleo celular es fundamental para el mantenimiento de la estabilidad genómica. De hecho, recientemente se ha demostrado en fibroblastos humanos que la importación de SOD1 requiere su fosforilación (pSOD1) (Fig. 11). En su forma fosforilada se transfiere al núcleo donde actúa como factor transcripcional regulando genes implicados en el estrés oxidativo, en la replicación, en el daño en el DNA, en el estrés general y en la homeostasis Cu/Fe. Es más, aunque el mecanismo final por el que SOD1 participa en la transcripción no es bien conocido, el hecho de que la proteína SOD1 disponga de una secuencia específica de unión al DNA sugiere que tenga un panel

directo en la regulación génica (Fig. 11). Otro aspecto muy interesante de SOD1 es su implicación en el cáncer. Sabemos que la homeostasis REDOX y el estrés oxidativo son bases moleculares implicadas en la carcinogénesis. Por lo tanto, no es sorprendente que SOD1 esté íntimamente relacionada con esta enfermedad. De acuerdo con lo comentado anteriormente acerca de los papeles de los ROS, estudios realizados en laboratorios independientes han demostrado que la pérdida de SOD1 incrementa los niveles de ROS que, a su vez, estimulan la carcinogénesis. Por otra parte, SOD1, impide el daño excesivo celular que les induzca la progresión a la muerte programada por apoptosis. De hecho, los ratones "knockout" SOD1 (mouse SOD1-null), son relativamente normales, pero con la edad muestran enfermedades tales como la atrofia muscular, la degeneración macular y la presencia de tumores hepáticos (Che y cols., 2016).

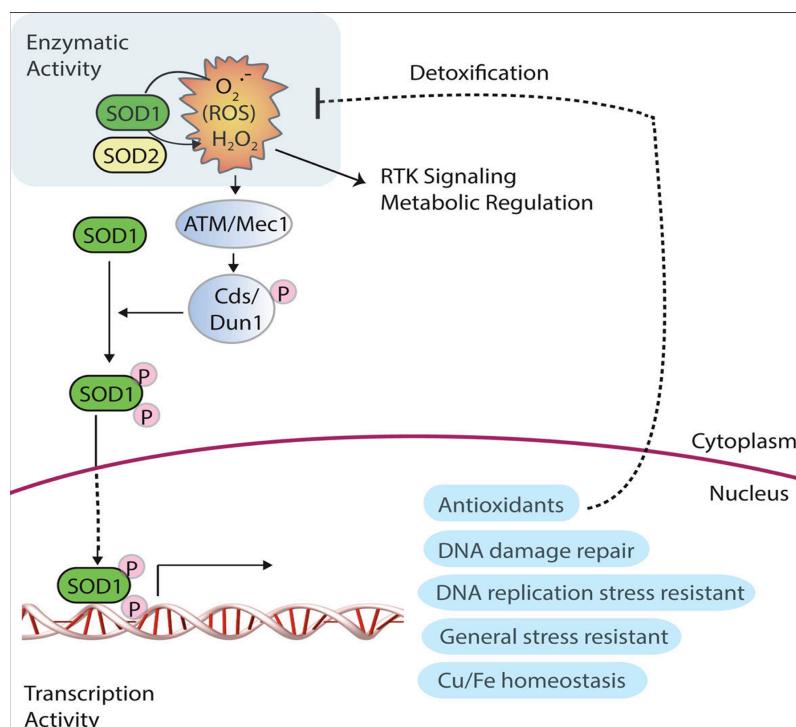


Figura 11. Papel de las enzimas SOD1 y SOD2 en la regulación redox y la señalización celular. Las metaloproteasas SODs, además de su función redox, regulan procesos celulares como la señalización mitogénica y la respuesta al estrés oxidativo. En la imagen se muestra como H_2O_2 puede activar el receptor de la tirosina-quinasa (RTK). Cuando el H_2O_2 alcanza un nivel excesivo activa a la quinasa ATM (checkpoint kinase ataxia-telangiectasia mutated kinase), que fosforila a la kinasa Cds/Dun1 que a su vez fosforila SOD1. La SOD1 fosforilada es importada y actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo (imagen tomada de Che et al, 2016).

5.3. Repercusión del estrés oxidativo en la ELAf humana por mutación en el gen *SOD1*

A pesar de que el oxígeno es fundamental para la vida, cuando intracelularmente se produce un superávit de ROS se desencadenan etapas oxidativas sucesivas en las que no solo se acumule anión O_2^- , radicales OH^- y H_2O_2 , sino que también se incrementa el óxido nítrico (NO^*). En condiciones fisiológicas, el NO^* es un neuromodulador fundamental para las neuronas que requieren este neurotransmisor, pero a su vez es

un precursor con mucho riesgo de provocar estrés oxidativo irreversible ya que, en presencia O_2^- , se convierte en peroxinitrito ($ONOO^-$) (Andersen, 2004) (Fig. 12). El $ONOO^-$, es extremadamente nocivo ya que espontáneamente oxida proteínas y lípidos de las membranas celulares e intercepta la actividad reductora de los lisosomas provocando la biogénesis de cuerpos residuales. Estos cuerpos residuales son factorías letales de oxidación que directamente pueden provocar la muerte celular (Andersen, 2004; Ruiz Soto, 2016).

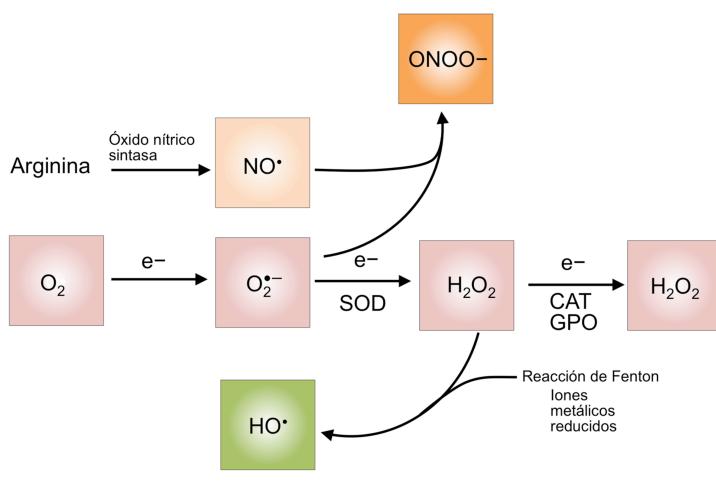


Figura 12. El O_2^- puede ceder un e^- para formar O_2^- y otro e^- para formar H_2O_2 ; la pérdida de un e^- lo convierte en H_2O_2 inerte. El O_2^- también reacciona con el NO^\cdot para formar $ONOO^-$ (modificado de Andersen, 2004).

Por lo anteriormente comentado, es fácil deducir que mutaciones en cualquiera de las SODs que comprometan su función biológica, en particular en la SOD1, pueden ocasionar devastadoras consecuencias que el estrés oxidativo ocasionan en las células que lo experimentan ya que fracasa la primera defensa antioxidante contra los ROS. De hecho, muestras cerebrales de pacientes afectos de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y ELA, mostraban índices elevados de ROS en las regiones específicas afectas. Algo que es comprensible ya que el SNC es considerado el órgano más susceptible a acumular ROS debido a su alto índice metabólico aeróbico y a su reducida capacidad para la regeneración celular en comparación con otros tejidos somáticos. En el caso concreto de la ELA, se han encontrado marcadores de peroxidación lipídica en el LCR y de oxidación proteica en las MNs. Como ya hemos comentado mutaciones en las células germinales del gen *SOD1* causan una entidad importante de ELAf (Mondola y cols., 2016). No obstante, aunque la degeneración de las MNs son la diana de la enfermedad los elementos no-neuronales como la glia y microglia también experimentan estrés oxidativo y contribuyen a la patogenia de la enfermedad (Brites y Vaz, 2014).

El descubrimiento por Rosen y cols., (1993) de que la mutación del gen humano *SOD1* causa una forma hereditaria humana de ELAf despertó el interés y aceleró la investigación para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan la muerte específica de las MNs. Sin embargo, el estudio en el material biológico procedente de pacientes afectos de ELA por mutación de *SOD1* ($SOD1^{mut}$) es imposible; no solo por su escasa incidencia (menos de 10% de las formas ELAf) sino también porque las muestras de necropsia solo informan de la fase final de la neurodegeneración en la mayoría de MNs. Sin embargo, es muy importante establecer

los criterios acerca de cuándo y cómo se inicia y desarrolla el proceso neurodegenerativo. Esto es clave para diseñar posibles dianas terapéuticas dirigidas a minimizar las devastadoras consecuencias de la enfermedad. Con esta finalidad, en laboratorios especializados en enfermedades neurodegenerativas concretas, han recurrido a modelos de medicina experimental utilizando, principalmente, ratones transgénicos que reproducen enfermedades humanas. Estos modelos experimentales son excelentes ya que mimetizan con bastante fidelidad la patología humana, son de gran utilidad por su sencillez de manejo, en ellos se tiene la mayor experiencia y son de bajo coste económico. Entre estos modelos experimentales se encuentran diferentes formas de ELAf, particularmente causada por mutaciones puntuales del gen *SOD1* (Hayashi y cols., 2016).

El gen que codifica *SOD1* es muy pequeño, se localiza en el cromosoma 21q22.1 e incluye 5 exones separados por 4 intrones. El transcripto codifica una proteína soluble, que incluye 155 aminoácidos, filogenéticamente muy conservada y se expresa ampliamente en el SNC ($\approx 0,5\text{--}0,8\%$ de las proteínas solubles del cerebro). Funcionalmente actúa como un homodímero muy estable ya que los monómeros establecen entrecruzamientos de triptófano 33 (residuo de dimerización) entre sí. La estructura secundaria en barril de cada monómero lo forman ocho láminas beta antiparalelas, unidas por siete hélices que organizan numerosos bucles o lazos (fig. 13B). En particular, los bucles formados a nivel de las hélices 4 y 6 son muy importantes pues confieren a la dismutasa la capacidad de unir metales. Por esta razón se denominan respectivamente el bucle electrostático y el de Zn. Su disposición y los residuos implicados se muestran en la figura 13A. Otra importante función del lazo 4 de cada monómeros es que Cys⁵⁷ establece un enlace disulfuro con la Cys¹⁴⁶ situada en la lámina ocho lo que le proporcionan estabilidad estructural y favorece la homodimerización (Fig.13C). En su estado metalizado el dímero es extremadamente rígido y muy resistente a la desnaturación térmica. De hecho, se propone que su estado metalizado garantiza un estado conformacional que permite la coordinación funcional iónica Cu-Zn (Arnesano y cols., 2004; Valentine y cols., 2005).

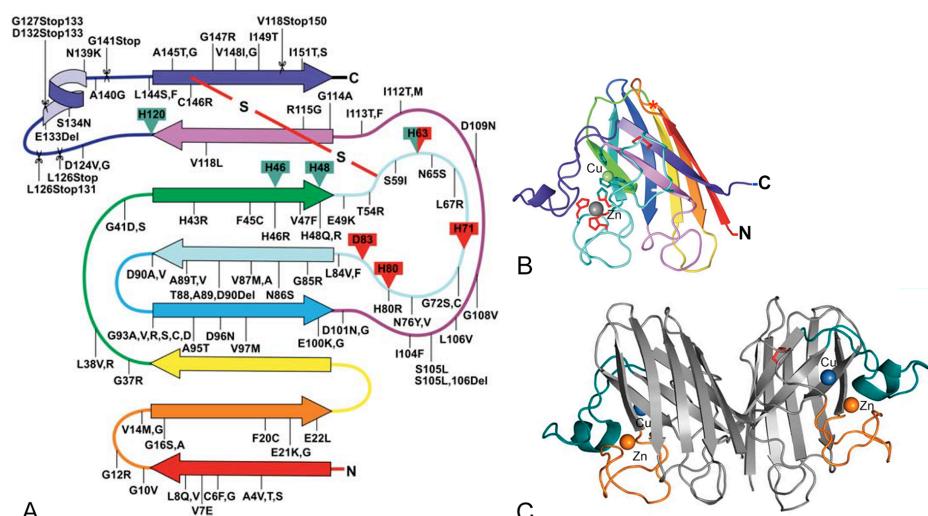


Figura 13. A. Estructura secundaria de SOD1 humana mostrando las mutaciones de la proteína SOD1. En los bucles 4 (en azul claro) y en el 6 (en lila) y, parcialmente, en la lámina 6, se indican los ligandos del Cu (verde) y del Zn (rojo). B. imagen de cristalografía de rayos X del monómero SOD1 (los metales aparecen como esferas). C. homodímero funcional SOD1 (tomado de Valentine y cols., 2005).

Estudios de genética molecular han demostrado que el gen *SOD1* es muy vulnerable a la mutación genética. Se han descrito más de 155 mutaciones en secuencias codificantes y no codificantes. La mayoría son mutaciones puntuales, aunque también se han descrito delecciones del gen. En la figura 12A aparecen ilustradas las mutaciones de la proteína *SOD1* referidas hasta el año 2005 por Valentine y sus colaboradores. Sin embargo, no todas confieren fenotipo de ELA y, en el caso de inducirlo, la severidad también es muy diferente. Por ejemplo, si la mutación afecta a ligandos para el Cu y el Zn el fenotipo es de estrés oxidativo típico por disfunción en la capacidad reductora de *SOD1*; mientras que, si afecta a otros residuos también puede ocasionar estrés oxidativo, pero no por disfunción reductora sino por cambios en la estructura que hace que la enzima sea ineficaz (veremos más adelante). Las más comunes son las que afectan a los exones 1 y 4, particularmente, en los nucleótidos de los codones codificantes del aminoácido A4 (la Alanina 4 es sustituida por una Valina, *SOD1-A4V*) y en los residuos de D90 y G93 (el Aspartato 90 es sustituido por una A, *SOD1-D90A* y la glicina 93 es sustituida por una Alanina, *SOD1-G93A* (Kaur y cols., 2016).

La expresión de *SOD1^{A4V}* humana es la causa más frecuente de ELAf en la población de los U.S. (representa ≈50% de los pacientes con ELAf). Induce un fenotipo característico de ELAf, los pacientes muestran síntomas clínicos con un marcado inicio repentino y una rápida progresión de la enfermedad que conlleva a la degeneración de las MNs y a la muerte en menos de dos años. Cursa con debilidad muscular de los músculos de las extremidades y de los músculos bulbares, si bien la disfunción de las MNi inferiores suele preceder a la de las MNsp y la aparición clínica es predominantemente motora típica de patología medular (Valentine y cols., 2005). Por su parte, la expresión *SOD1^{D90A}* es la mutación más conocida y con mayor prevalencia de los casos de ELAf humana en Europa. Representa el 50% de todos los casos de ELAf en Suecia y en Finlandia. Es hereditaria y puede presentarse de forma dominante o, más frecuentemente, de forma recesiva. En los casos reportados en la literatura se muestra un fenotipo heterogéneo con una fase pre-parética seguida de parésia a los 14 años de evolución clínica. En la primera fase, los pacientes suelen presentar molestias sensoriales en la parte inferior de la espalda y las caderas, dolor en la rodilla y/o sensaciones de calor. Estos se progresan lentamente al comienzo de la segunda fase. Otros trastornos afectan a la vejiga, muestran ataxia recurrente y brotes de dolor (Andersen y cols., 2004).

Finalmente, la mutación *SOD1^{G93A}*, que describiremos a continuación, es una mutación relativamente rara en la clínica humana pero se ha estudiado muy a fondo ya que fue la primera mutación que se describió en un modelo de ratón transgénico. Tienen la peculiaridad de que la mutación es seudo-WT ya que preserva la actividad enzimática pero es capaz de generar en los animales transgénicos síndrome muy similar a la ELAf humana (Valentine y cols., 2005).

5.4. La réplica murina de la ALAf humana por *SOD1-G93A* desarrollada en Medicina Experimental

Como ya hemos comentado el modelo experimental más utilizado de ELA es el ratón transgénico que expresa ectópicamente el gen humano mutado en la G93A (ratón-*hSOD1^{G93A}*). Este modelo mimetiza con mucha fidelidad la evolución clínica e

hispopatológica de la variante de ELA humana. El modelo original expresa muy pocas copias del gen humano mutado (aproximadamente 8 copias) y se generó en el laboratorio de Gurney (1994). Los genes humanos mutados se insertan al azar en el genoma del ratón. Los animales se seleccionan por genotipificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real y el número de copias expresadas en los animales se determina por la técnica molecular de Southern blot. El limitado número de copias génicas humanas expresadas sumado a que los ratones no son “knockout” para la proteína endógena silvestre es fundamental para poder correlacionar los hallazgos con la patología humana ELAf-SOD1^{G93A} ya que, en la enfermedad humana solo está mutado el gen en un alelo. Es decir, conservan una copia del gen silvestre (*SOD1*^{wt}) lo que a efectos prácticos podría traducirse en una SOD1 nativa y minimizar el efecto de del producto génico generado por el alelo mutado. De esta forma la réplica génica de la ELA experimental murina es muy similar a la humana. Sin embargo, tanto en el fenotipo de ELA humana como en el ratón, el gen dominante es el mutado y los niveles de proteína Wt son indetectables. Por otra parte, los ratones-hSOD1^{G93A} tienen una evolución clínica de la enfermedad muy similar al humano, debutan con temblor y dificultad para el movimiento en sus patas traseras y parálisis progresiva que conllevan a la muerte del animal hacia el día 120 de la vida postnatal (Riancho y cols, 2014, 2015).

Es muy interesante el hecho de que, aunque la mutación de la hSOD1^{G93A} no afecta a su función reductora *in vitro*, su expresión en el ratón induce un fenotipo característico de ELA con un importante componente de estrés oxidativo. Es más, su expresión ectópica intercepta la actividad de la enzima endógena anulando su capacidad reductora. Se da la paradoja de mientras que en el ratón SOD1-null no causa fenotipo de ELA la expresión de hSOD1^{G93A} sí que lo induce. El hecho de que la sobreexpresión de hSOD^{G93A} teniendo su capacidad funcional genere una ELA con un importante componente oxidativo ha suscitado numerosos estudios en laboratorios independientes incluido el dirigido por los Profesores Lafarga y Berciano. Uno de los fundamentos que pueden explicar esta disyuntiva es que la metaloproteasa hSOD1^{G93A} *in vitro* no une de forma tan ávida los metales de Cu y de Zn como la forma de SOD1 endógena salvaje (*SOD*^{wt}). Asimismo, se ha demostrado que la mutación G93A produce un plegamiento anormal de la proteína y un incremento de su capacidad de agregación tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células. Como en otras enfermedades por depósito, la agregación puede justificar su déficit funcional y, en el caso particular de hSOD1^{G93A}, estrés oxidativo. Puede contribuir a su agregación que no pueda ser degradada por el sistema proteolítico de la ubiquitina-proteasoma (SUP). Además, es bien conocido que los proteasomas proteolíticos (20S y 26S) son muy susceptibles de inactivarse por el estrés oxidativo y, consecuentemente, puede potenciar la agregación de hSOD1^{G93A}. En este contexto, merece la pena señalar que tanto la SOD1 normal como la forma mutada son por si mismas muy vulnerables a la oxidación y que los agregados de proteínas oxidadas inducen una respuesta de estrés celular acompañada del desensamblaje de los proteasomas e inhibición de su actividad proteolítica (Reinheckel y cols., 2000; Palanca y cols., 2014).

Otro mecanismo intrigante, que puede contribuir a la agregación de hSOD1^{G93A} y comprender la razón del porque la hSOD1^{G93A} ectópica inhibe la actividad reductora de la SOD1 endógena (*SOD1*^{wt}) se fundamenta en la propiedad de “prion-like” o prionoide otorgada en estudios *in*

vitro a la hSOD1^{G93A} y, en menor proporción a la dismutasa hSOD1 silvestre (Polymenidou y Cleveland, 2011; Maniecka y Polymenidou, 2015). Estos autores atribuyen la propiedad de “prion-like” a determinados agentes que, no siendo por sí mismo patogénicos, comparten similitudes con el ciclo infeccioso que los priones desarrollan en las células de los mamíferos. Se da la circunstancia que ambas metaloproteasas silvestre y mutada cumplen los 5 paradigmas patogénicos básicos establecidos para determinar que una proteína es “prion-like” (Figura 14), a saber: (1) facultad permanente para homooligomerizar (círculo rojo) en agregados formando un “germen” primario (autoensamblaje o autoagregación); (2) capacidad para modificar la estructura nativa de la proteína endógena homóloga silvestre (círculo verde) (agregación o conversión cruzada); (3) propiedad de elongación por adición de monómeros de la proteína mutada y silvestre modificada; en el caso de la hSOD1^{G93A} produciría un déficit de SOD1 funcional y, consecuentemente, pérdida de su capacidad reductora endógena; además, el germen primario puede dividirse en pequeñas fracciones, que generan nuevos agregados patobiológicos; (4) capacidad para que los gérmenes se engloben en cuerpos multivesiculares (MVBs) formando priones-like que podrán de liberarse al espacio extracelular, propagándose de esta manera a las células del entorno (5) (transmisión célula a célula). De esta forma la célula receptora añadirá a su propio estrés el transmitido por la célula vecina (Polymenidou y Cleveland, 2012).

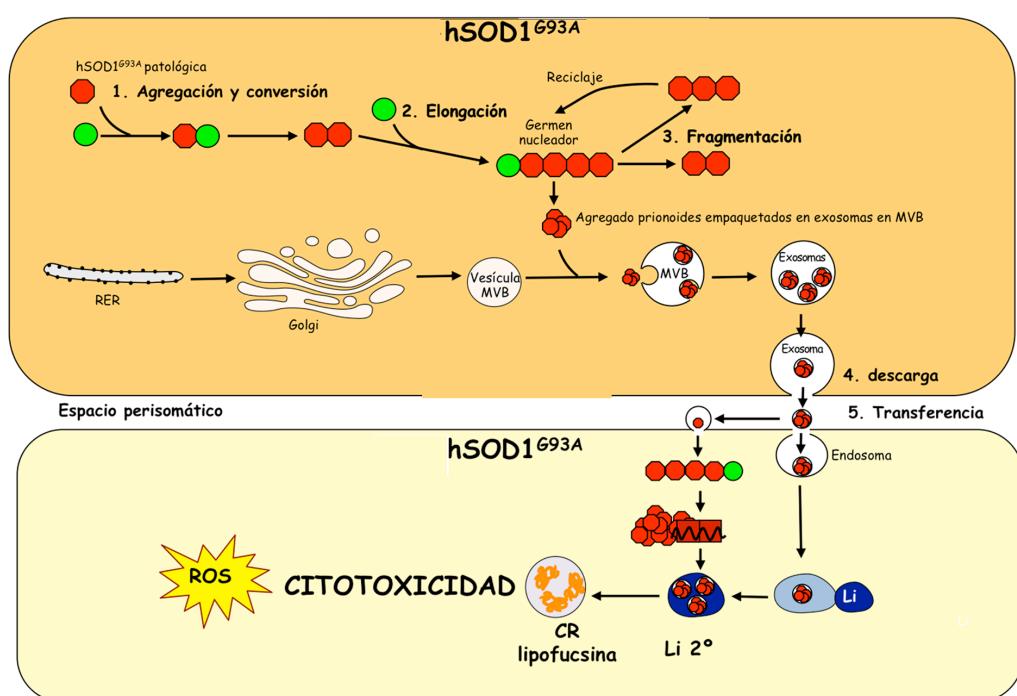


Figura 14. Esquema teórico de la acción de hSOD1^{G93A} como prionoide. Ruta clásica de amplificación del prion-like (hSOD1^{G93A}). (1 y 2) La proteína ectópica malplegada interacciona con la proteína nativa (SOD1) y la convierte en una molécula patológica. Ambas se agregan en un núcleo germinal primario (2). Este se fragmenta en múltiples núcleos que pueden fusionarse al primario o generar nuevos puntos de agregación. (3) El mecanismo de descarga es mediante cuerpos multivesiculares (MVB) que generan exosomas enriquecidos en el prionode. (4) Por fusión vesicular los exosomas se propagan al espacio extracelular. (5) Los exosomas se transfieren a la célula huésped por fusión vesicular o pinocitosis (esquema de la Dra. Berciano).

Sobre la base de la esta propiedad prion-like de SOD^{G93A} se propone que las MNi en la ELAF humana que las células no-neuronales, astroglia, microglia y oligodendroglia son la principal fuente de los “priones-like”. Además, dado que las células gliales experimentan estrés oxidativo pero no degeneran se asume que la glia es la productora de priones-like para su

desintoxicación y las MNs son las receptoras. Es decir, que las MNs añadirían a su propio estrés el procedente el procedente de los priones-like transferidos de las células vecinas. De esta forma, mientras las células transmisoras se desintoxicarían (elementos gliales) los aceptores incrementarían su patogeneidad (MNs) (Brites y Vaz, 2014; Bunton-Stasyshyn y cols., 2014). Aunque este mecanismo de transmisión no está totalmente conocido estudios de co-cultivos de MNs sanas con astrocitos afectos de ELAf-SOD^{mut} han demostrado que las MNs sanas enferman y desarrollan la enfermedad pero no a la viceversa (Bunton-Stasyshyn y cols., 2014). En la figura 15 se ilustran estos hallazgos.

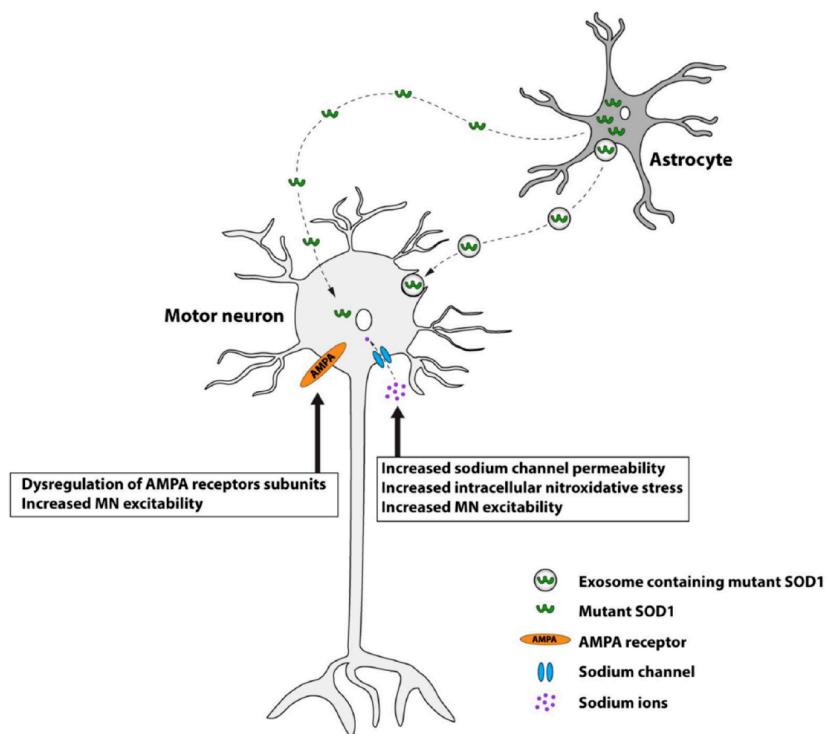


Figura 15. Mecanismo de transmisión de SOD1 mutada. La dismutasa SOD1 mutada se transfiera desde el astrocito a la MN, causando la muerte neuronal. La SOD1 mutada es secretada por los astrocitos en exosomas y es internalizada por las MNs lo que induce incremento en la permeabilidad de los canales de Na^+ , estrés nitrooxidativo; excitabilidad por desregulación de los receptores ionotropos AMPA (tomado de Bunton-Stasyshyn y cols., 2014).

5.5. Mecanismos moleculares de la toxicidad de SOD1 en la patogénesis de la ELAf-SOD1^{mut}

Como ya hemos comentado en varios puntos del trabajo la mayor información científica para despejar ciertas incógnitas acerca de la repercusión del estrés oxidativo, procede de los estudios realizados en el ratón-hSOD1^{G93A}. Este modelo de medicina experimental ha permitido, no solo conocer la fisiopatología y la repercusión celular en enfermedades de la MN, si no que han sido cruciales para el desarrollo de dianas terapéuticas (Riancho y cols. 2015). Sin embargo, el fenotipo clínico y fisopatológico generados por otras mutaciones en SOD1 son muy similares y en todos ellos se produce una neurotoxicidad secundaria al estrés oxidativo irreversible causando en las MNs la alteración estructural y funcional de compartimentos celulares específicos que pasamos a describir a continuación. Asimismo, asumiendo que la glia juega un papel clave en la toxicidad de las MNs también haremos referencia a los mismos.

5.5.1. Repercusión del estrés oxidativo en las organelas de las MNi

El **Retículo endoplasmático rugoso (RER)** es una de las organelas celulares más vulnerables al estrés oxidativo. Es un compartimento especializado en el procesamiento (modificaciones postraduccionales) y en la organización estructural de las proteínas recién sintetizadas (chaperonización) ya que el déficit funcional de SOD1^{G93A} provoca la oxidación de proteínas y, consecutivamente, un plegamiento estructural anormal. Inicialmente, se disparan mecanismos de respuesta protectora del RER para que las proteínas adquieran su forma nativa. Uno de ellos consiste en corregir los errores en el plegamiento con la intervención de las chaperonas, particularmente de la chaperona BiP dependiente de ATP. Entre las proteínas oxidadas para se encuentra la SOD1^{mut}. Sin embargo, su enorme tendencia natural a la agregación hace ineficaz el proceso de chaperonización y los agregados comprometen la integridad estructural y funcional de las cisternas del RER. Otro mecanismo que neuroprotector del RER consiste en activar la vía de “respuesta a las proteínas mal plegadas” (UPR), un proceso en el que está implicada la proteína Derlin-1, uno de los componentes principales asociados a la degradación de proteínas mal plegadas en el RER. Es un proceso muy complejo que permite exportar las proteínas mal plegadas desde la luz del RER al citosol para su degradación por el sistema ubiquitina proteasoma (SUP). Aunque inicialmente la activación de SUP puede contribuir al aclaramiento de SOD^{mut}, la activación prolongada y la propia oxidación de la dismutasa puede conducir a una severa disfunción de la proteostasis y finalmente a la apoptosis de las MNs. Además, la autoagregación de SOD1^{mut} oxidada recluta otras proteínas (función “prion-like”) causando la formación de macrocomplejos y la deficiencia de la proteólisis proteasomal (Bendotti y cols, 2012; Chen y cols, 2012). Estos macroagregados hiper-oxidados configuran auténticas “factorías de oxidación” intracelular. Además, podrían comprometer, no sólo la SUP sino también la autofagia fisiológica. De hecho, se ha detectado un incremento de autofagosomas en las MNs de pacientes con celular ELA y en las MNs de ratón^{G93A}. El conjunto de todos estos hallazgos conlleva a la alteración estructural y funcional del RER, al destino de las proteínas complejas al dictiosoma de Golgi destinadas a la exportación de las (ejemplo, vesículas sinápticas) y al incremento de la maquinaria lisosomal (Ruiz Soto, 2016) (Fig. 16).

La **motocondria** es una organela muy vulnerable al estrés oxidativo y su alteración es una de las manifestaciones fisiopatológicas más precoces observadas en el modelo murino de ELAf-SOD1^{G93A} (Riancho et al., 2014). Esto es muy razonable si se tiene en cuenta que SOD1 es una metaloproteasa que se localiza en el espacio intermembranoso mitocondrial y es clave para neutralizar los ROS generados en el transporte de e- de la cadena respiratoria. Consecuentemente, la pérdida de capacidad reductora de SOD1 no solo reduce los potenciales de membrana y sus propiedades biofísicas, sino que, hacen que la mitocondria sea un foco de estrés oxidativo con consecuencias devastadoras para la célula. Además, La homeostasis mitocondrial se ve afectada debido a que SOD1^{G93A} interacciona con algunas proteínas integrales de la membrana mitocondrial que contribuye a que se modifiquen sus funciones fisiológicas y sean tóxicas para el metabolismo mitocondrial. Este déficit incluye la producción de ATP, alteración en el canal VDAC1 con la entrada y acúmulo de Ca²⁺, la inhibición de moléculas que bloquean la apoptosis como es la proteína Bcl-2

y la liberación del citocromo C del espacio intermembranoso. Esto activa la vía intrínseca de las caspasas y, consecutivamente, la muerte programada por apoptosis de las MNs (Hayashi y cols., 2016) (Fig. 16).

La oxidación afecta también a otras organelas incluyendo el RE y el núcleo celular. El RE oxidado altera los niveles citosólicos de Ca^{2+} y, consecuentemente, el control de la excitabilidad de la MNs. Otro efecto tóxico de los ROS es la oxidación de proteínas, lípidos y glúcidos. Una proteína sustrato de la oxidación es la tubulina que, en estado hiperpoxidado no puede polimerizar y, consecuentemente, se intercepta el tráfico anterógrado y retrógrado axonal, principalmente de vesículas sinápticas, requeridas en la unión neuromuscular. Dado que SOD1 fosforilada es un factor transcripcional nuclear es comprensible que en su forma mutada oxidada contribuya a la oxidación molecular principalmente del DNA y a la disfunción transcripcional (Hayashi y cols., 2016). Todas alteraciones pueden detectarse incluso en un estadio preclínico de la enfermedad y el resultado final es la parálisis muscular (Riancho y cols., 2014) (Fig. 16).

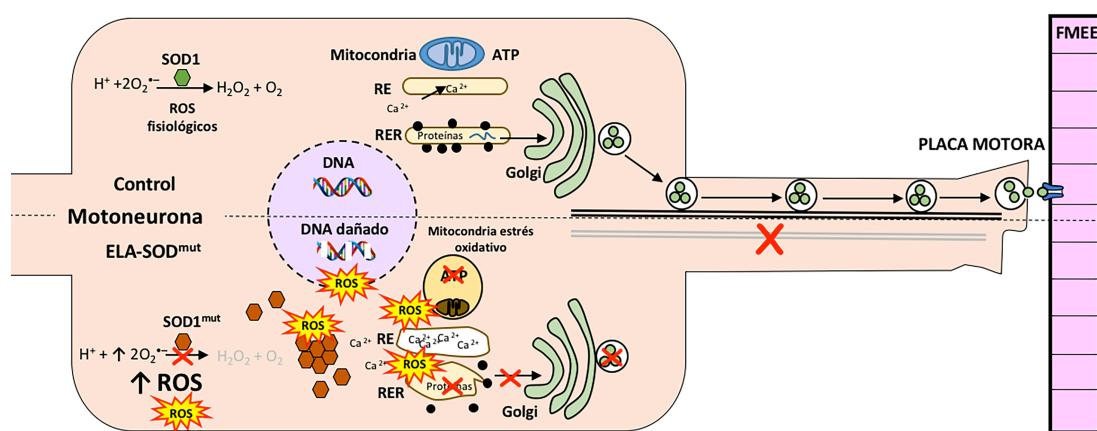


Figura 16. Excitotoxicidad en Las MNs en el ELA inducida por el estrés oxidativo. En el esquema se muestra de manera comparativa, una MN sana (control; parte superior del esquema) y una MN enferma (MN-ELA; parte inferior). En condiciones normales la vía reductora SOD1 controla los niveles de ROS, el RER-Golgi produce vesículas sinápticas con el neurotransmisor y su transporte anterógrado a través de los microtúbulos hasta la placa motora; las mitocondrias producen ATP y el RE recluta Ca^{2+} . En la parte de abajo del esquema se muestra la disfunción de SOD1 en la ELA conllevando un incremento de ROS, la agregación de SOD1^{mut} y la formación de macroagregados oxidados (factorías de oxidación). Como consecuencia se produce la alteración del RER-Golgi, de las mitocondrias, RE y del transporte axonal. En el núcleo daño en el DNA.

5.5.2. Patogenia de las MNs-SOD^{mut} inducida por la glia circundante

Una de las teorías más recientes postula que la degeneración de las MN en la ELA inducida por el déficit de SOD1 surge de los efectos tóxicos de las células gliales circundantes, tales como los astrocitos, la microglía y la oligodendroglia.

El neurotransmisor excitatorio principal en el SNC es el glutamato (Glu). Consecuentemente, su desregulación por su liberación excesiva a nivel del elemento presináptico o la insuficiente eliminación de la hendidura sináptica, resulta en una activación sostenida de los receptores postsinápticos que puede conllevar a la hiperpolarización de la membrana y, consecuentemente a la **exocitotoxicidad**. Las MNs poseen muchos receptores AMPAR para el Glu calcio-dependiente razón por la que los niveles extracelulares de Glu deben de estar estrictamente regulados por los

elementos de la **astroglia** circundante a las MNs cuya función es crucial para la neuromodulación neuronal. En condiciones fisiológicas, los astrocitos mediante co-transportadores del Glu (GLU1) reciclan el neurotransmisor perisináptico permitiendo así que las MNs, mantengan un ciclo de despolarización/repolarización permanente (Fig. 17). Sin embargo, en situaciones fisiopatológicas, como es estrés oxidativo inducido por la mutación de SOD1 los, astrocitos pierden esta capacidad por su propio estrés oxidativo y los niveles de Glu extracelular se incrementan lo que puede conducir a la hiperpolarización persistente de la membrana de las MNs. Esto conlleva no solo la exocitotoxicidad mediada por el Glu sino también, al incremento de los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma de las MNs que tiene deletéreas consecuencias pues activa a la enzima óxido-nítrico sintetasa neuronal (nNOS) que, en presencia de O_2 , convierte el aminoácido L-arginina en NO cuyo producto final oxidado es peroxinitrito (ONOO^-) (Hayashi y cols., 2016). Como ya hemos comentado anteriormente, el peroxinitrito es un agente extremadamente oxidante, nitrante y muy tóxico para las células pues tiene como dianas las mitocondrias, los lisosomas, al RER y el DNA (Gamper y Ooi, 2015). Además, de nuevo hay que recordar el papel de la astroglia en la transferencia de priones de SOD1^{mut} a las MNs para su propia desintoxicación (Fig. 17).

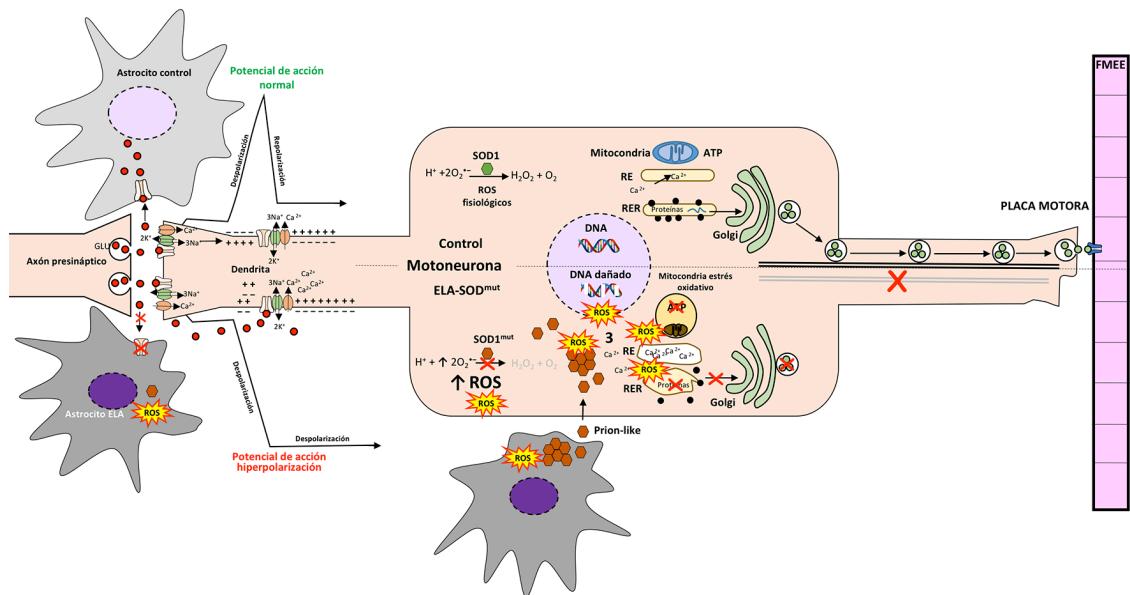


Figura 17. Excitotoxicidad en una MNi potenciada por el estrés oxidativo de los astrocitos. En la parte superior del esquema se muestran un contacto pre-sináptico liberando el neurotransmisor Glu. En el elemento postsináptico de la MN se muestran el receptor Glu acoplado a los canales de Ca^{2+} y Na^+/K^+ dependientes que regulan la despolarización de la membrana neuronal (entrada de 3Na^+ y salida 2K^+) y el potencial de acción. Posteriormente, la membrana se repolariza debido a la entrada de iones K y a la captura de Glu por la astroglía. En la parte del esquema se muestra como el estrés oxidativo el Glu se acumula en la hendidura sináptica debido al bloqueo de los receptores en la astroglia lo que provoca hiperpolarización sostenida en la MNi. Además, en estado de estrés oxidativo la astroglia transfiere priones de $\text{hSOD}^{\text{G93A}}$ a las MNs incrementando su estrés oxidativo.

Las células **de la microglia** se localizan en todo el SNC, el cerebro y la médula espinal. Se las considera macrófagos residentes habituales y, como los macrófagos del sistema fagocítico de mononucleares del medio interno, constituyen la primera barrera defensiva activa del sistema inmunitario. En condiciones fisiológicas, su capacidad fagocítica es clave para la eliminación del neuropilo de moléculas y células

redundantes o dañadas así como de agentes infecciosos impidiendo el daño patológico en el SNC. Sin embargo, es muy vulnerable y mínimos cambios patológicos, principalmente de etiología inflamatoria, la activan desmesuradamente. En estas condiciones, las células microgliales liberan gran cantidad citocinas pro-inflamatorias, principalmente el factor de necrosis tumoral (TNFa) y factores que potencian el estrés oxidativo como el NO (Hayashi y cols., 2016; Zhao y cols., 2017). En consecuencia, es comprensible que, aunque en la fase inicial de la ELA su función sea muy necesaria su activación permanente contribuya en la histopatología de la enfermedad.

Por otra parte, los **oligodendrocitos**, responsables de la mielinización axonal en el SNC, también son muy proclives al estrés oxidativo. De hecho, recientemente en el modelo murino de ELA SOD^{mut} se ha demostrado que degeneran antes de la aparición clínica de la enfermedad (Hayashi y cols., 2016; Zhao y cols., 2017). Aunque en la fase inicial se produce un intento de remielinización, los oligodendrocitos degenerados son reemplazados por células progenitoras estos no se diferencian completamente ya que no expresan determinadas proteínas de la mielina (por ej. la proteína básica de mielina) y, consecuentemente, se mantiene el estado desmielinizado de los axones de las MNs. Evidentemente se pierde la transmisión saltatoria del potencial de acción y el estado bioeléctrico axonal. Además, concomitantemente con el propio estrés oxidativo de las MNs provocan defectos en el transporte axonal anterógrado, como por ejemplo ATP y organelas incluyendo las vesículas sinápticas, comprometiendo la función neuromuscular. Dado que también se han descrito alteraciones el transporte retrógrado la disfunción axonal es muy severa lo que justifica que muy tempranamente se produzca la denervación, disrupción de la placa motriz y la parálisis muscular (Fig. 18).

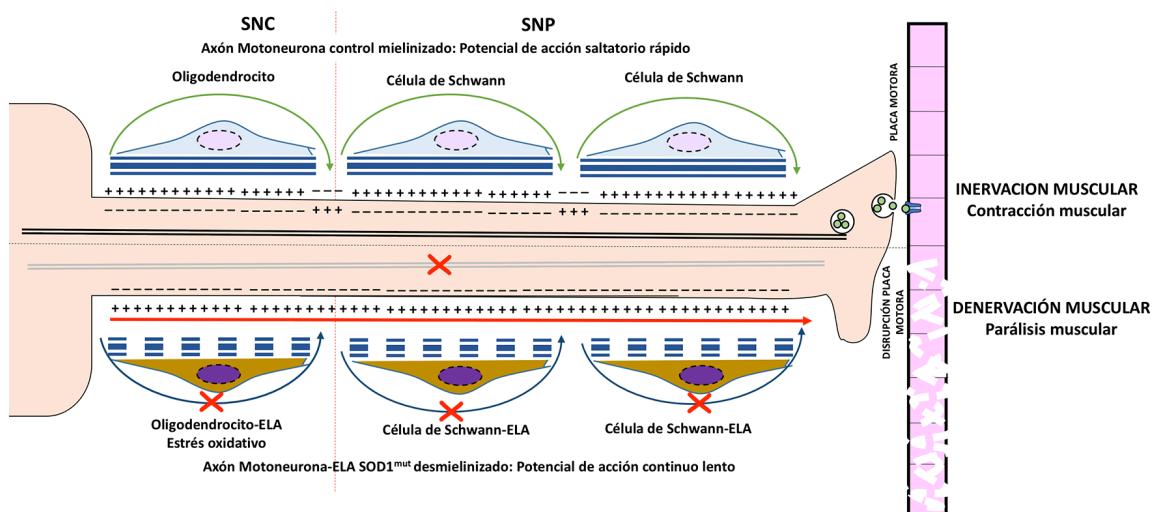


Figura 18. Excitotoxicidad en las MMs inducida por el estrés oxidativo de los oligodendrocitos (SNC) y células de Schwann (SNP). En la parte superior del panel se representa un oligodendrocito y dos células de Schwann normales que mielinizan el axón de la MNi. Las flechas curvas indican el potencial de acción saltatorio que permite una velocidad de conducción rápida. En la sinapsis neuromuscular la liberación del neurotransmisor de acetilcolina y en el sarcolema, el receptor unido al neurotransmisor que provoca la contracción muscular. En la parte inferior el estrés oxidativo de las células mielinizadoras provoca la desmielinización axonal y la transmisión impulso nervioso continua y lenta. Como consecuencia se produce la disrupción de la sinapsis, la denervación, degeneración de la FMEE y parálisis muscular.

5.6. Tratamiento

En la actualidad no existe ningún tratamiento modificador del curso de la enfermedad de la ELA. Actualmente, el único fármaco aprobado por la Agencia Europea del Medicamento y por la Asociación Estadounidense de Alimentos y Medicamentos (FDA) es el riluzol. El riluzol, es un fármaco con efecto antiglutamatérgico, dirigido a disminuir la excitotoxicidad de las MN que como ya hemos comentado se incrementa en la enfermedad. No obstante, tiene un efecto limitado en términos de supervivencia: aunque varía de unos pacientes a otros. De hecho, sólo prolonga la supervivencia unos dos ó tres meses desde el inicio de los síntomas clínicos. En los últimos años, se han llevado a cabo cientos de estudios animales intentando encontrar algún fármaco curativo, sin éxito. En el año 2015, el neurólogo Javier Riancho, del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla(HUMV), ha propuesto un tratamiento alternativo con el fármaco Bexaroteno, una molécula perteneciente a la familia al grupo de los retinoides (Riancho y cols., 2015).

El bexaroteno es un análogo de los receptores RXR. Las vías celulares de los retinoides son muy complejas y están implicadas con numerosas respuestas a nivel celular. Existen evidencias de que el tratamiento con retinoides es capaz de modular la proteostasis celular, actuando tanto a nivel del SUP como en el sistema autofágico-lisosomal. Además, las vías de señalización de los retinoides parecen estar implicadas en la patogenia de la ELA. Por otra parte, tanto los astrocitos como las MN expresan receptores nucleares de RXR. Las conclusiones a las que llegaron consisten en un efecto neuroprotector del bexaroteno; enlentece la pérdida de peso, preserva durante más tiempo la función neuromuscular, retrasa la aparición de signos celulares de neurodegeneración, disminuye la pérdida de MN. El fármaco administrado a los en ratones transgénicos hSOD1^{G93A} prolonga su supervivencia unos diez días si se compara con los ratones hSOD1^{G93A} no tratados (Riancho y cols., 2015).

5.7. Estudio histopatológico en el ratón hSOD1^{G93A}

Para llevar a cabo la parte práctica del TFG, he tenido acceso al material histológico de astas anteriores de la médula espinal de animales de experimentación controles y de ratones con ELA experimental que expresaban hSOD1^{G93A}. Este material ha sido cedido por cortesía del laboratorio de los profesores Berciano y Lafarga y, para llevar a cabo mi estudio, he utilizado los siguientes métodos histológicos:

- Estudio con microscopia confocal en disociados de motoneuronas marcadas con Ioduro de Propidio (IP). Este marcador se une a los ácidos nucleicos y, por lo tanto, permite identificar a nivel nuclear la cromatina y nucléolo y, a nivel citoplasmático, la maquinaria para síntesis de proteínas que en las neuronas de proyección son las MNs espinales se organiza formando los denominados grupos de Nissls.
- Estudio con microscopía óptica en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina
- Secciones ultrafinas contrastadas con acetato de uranilo para el estudio de microscopía electrónica convencional.

En el estudio con microscopía confocal, las MNs control marcadas con IP tienen la actividad proteostática normal. La maquinaria para la síntesis de proteínas es muy abundante por lo que se organiza formando numerosos dominios citoplasmáticos o grumos de Nissls. Éstos se distribuyen por todo el citoplasma y se componen de polirribosomas libres y asociados al RE (RER) (Fig. 19A). En el núcleo, el nucléolo es de gran tamaño debido a que la síntesis de pre-ribosomas debe ajustarse a las necesidades traduccionales de proteínas, que es muy importante en las MNs. Sin embargo, cuando nos fijamos en las MNs pertenecientes a animales de 100d de edad afectas de ELA, el IP nos muestra cambios histopatológicos muy relevantes, incluso en la fase temprana de 100 días del periodo postnatal. Así, como se ilustra en la figura 19B, los grumos de Nissls desaparecen de la zona citoplasmática central y la maquinaria para la síntesis de proteínas es escasa, indicando el inicio de cromatolisis central. Asimismo, es muy llamativa la presencia de enormes vacuolas citoplasmáticas negativas al IP. Este patrón indica la existencia de un proceso neurodegenerativo vacuolar temprano y está de acuerdo con lo descrito previamente por Riancho y cols., (2014). A pesar de que el nucléolo puede mantener su tamaño, su actividad transcripcional disminuye en las MNs enfermas.

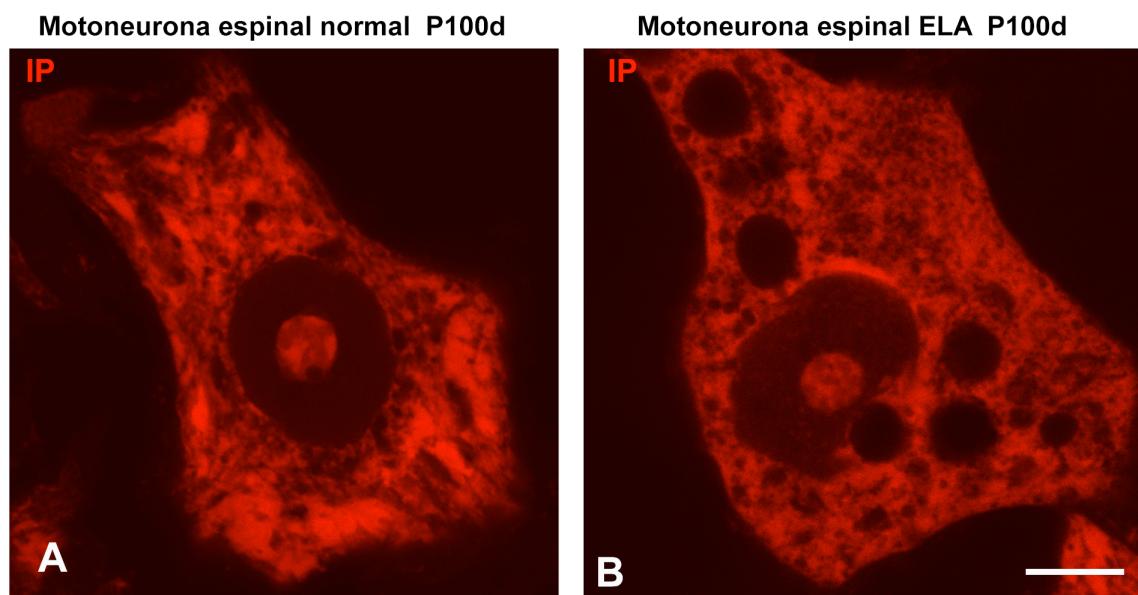


Figura 19. A. En la MN control En la MN se observa la maquinaria para síntesis de proteínas formando los grumos de Nissls y el nucléolo prominente y de gran tamaño, para ajustarse a las necesidades celulares. B. MN EL del ratón *hSOD1*^{G93A} transgénico. Como puede observarse con el estrés oxidativo han desaparecido los grumos de Nissls de la zona central del citoplasma y contiene numerosas vacuolas citoplasmáticas negativas al IP.

A continuación, analizaremos los cambios estructurales a nivel de microscopía óptica y electrónica. Para el análisis de microscopía óptica utilizamos secciones semifinas de 1 μ m de espesor teñidas con azul de toluidina que permite evidenciar la distribución y morfología de las MNs en la asta anterior de la médula espinal. Este colorante es básico y, por lo tanto, permite identificar componentes ácidos de las células como son, los ácidos nucleicos del núcleo y del citoplasma y la distribución de los lisosomas. Como se ilustra en la figura 20A las MNs control formaban grupos de células de gran tamaño, con citoplasma basófilo y parcheado formando los grumos de Nissls. El núcleo es eucromatínico y el nucléolo, intensamente basófilo, es de gran tamaño. En cambio,

en las secciones correspondientes a médulas espinales de ratones con ELA-hSOD1^{G93A}, objetivamos como los somas de la MNs muestran intensa perdida de la basofilia citoplasmática y la degeneración vacuolar de las organelas citoplasmáticas, constituyendo el inicio de la degeneración vacuolar características de la ELA inducida por el estrés oxidativo. Asimismo, el proceso de alteración vacuolar también alcanza a otros componentes del neuropilo, indicando que el proceso histopatológico es invasivo (Fig. 20B). Además, los núcleos son más pequeños que en las neuronas control, más heterocromáticos y están plegados. Estas características son indicativas de alteración nuclear y, consecuentemente, de la degeneración inducida en la ELA.

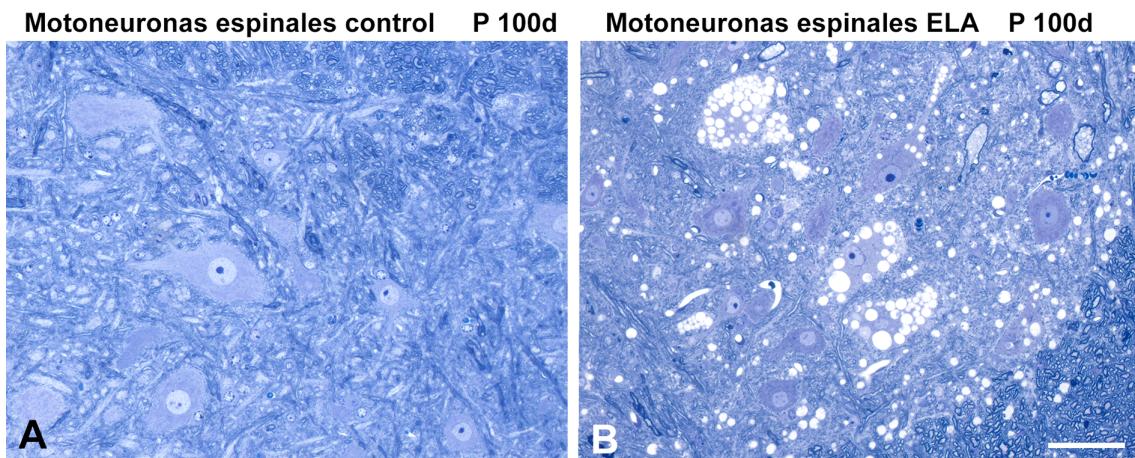


Figura 20. Estudio con microscopía óptica en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina. En la figura de la izquierda (**A**) se muestran varias MN control, con citoplasma básfilo y parcheado, que representan los grumos de Nissls. El núcleo también es básfilo y de gran tamaño. A la derecha (**20B**) las MN afectas de ELA muestran en sus citoplasmas acúmulo de vacuolas producto de su degeneración. Nótese como en el neuropilo también se observa vacuolización. Esta posiblemente se deba a la degeneración axonal y dendrítica de las MNs o a otros elementos del neuropilo.

El análisis ultraestructural es fundamental para conocer la evolución histopatológica de la neurodegeneración vacuolar de las MNs en la ELA. Las MNs control mostraban citoplasmas con numerosos grumos de Nissls distribuidos en el citoplasma, compuestos por RER y polirribosomas (Fig. 21A). A mayor resolución podemos observar como del RER asocia dictiosomas de Golgi, que nos indica una tasa de síntesis de proteínas elevada, fundamental para el empaquetamiento intracelular, procesamiento y distribución en la sinapsis (Fig. 21B). Puesto que para llevar a cabo estos procesos celulares se requiere energía, también se asocian varias mitocondrias. Debido a su alta actividad transcripcional, los núcleos son eucromáticos y los nucléolos muy reticulados (Fig. 21A-B).

Por el contrario, en las MNs en la fase inicial de la enfermedad habían disminuido el número de grumos de Nissls, las mitocondrias eran de gran tamaño y exhibían diferente grado de vacuolización (Fig. 21C). En MNs con mayor grado de afectación histopatológica, el proceso degenerativo vacuolar era muy prominente mostrando vacuolas pequeñas que pueden corresponder a la vacuolización del RE y grandes vacuolas, con restos mitocondriales en su interior que refleja la característica degeneración de esta organela tal y como previamente había demostrado Riandcho y cols., 2014 (Fig. 21D). Estos resultados demuestran como el estrés oxidativo inducido por la mutación de SOD1 (hSOD1^{G93A}) afecta específicamente a estas organelas

comprometiendo desde las fases tempranas la proteostasis y la síntesis de ATP general de las MNs espinales.

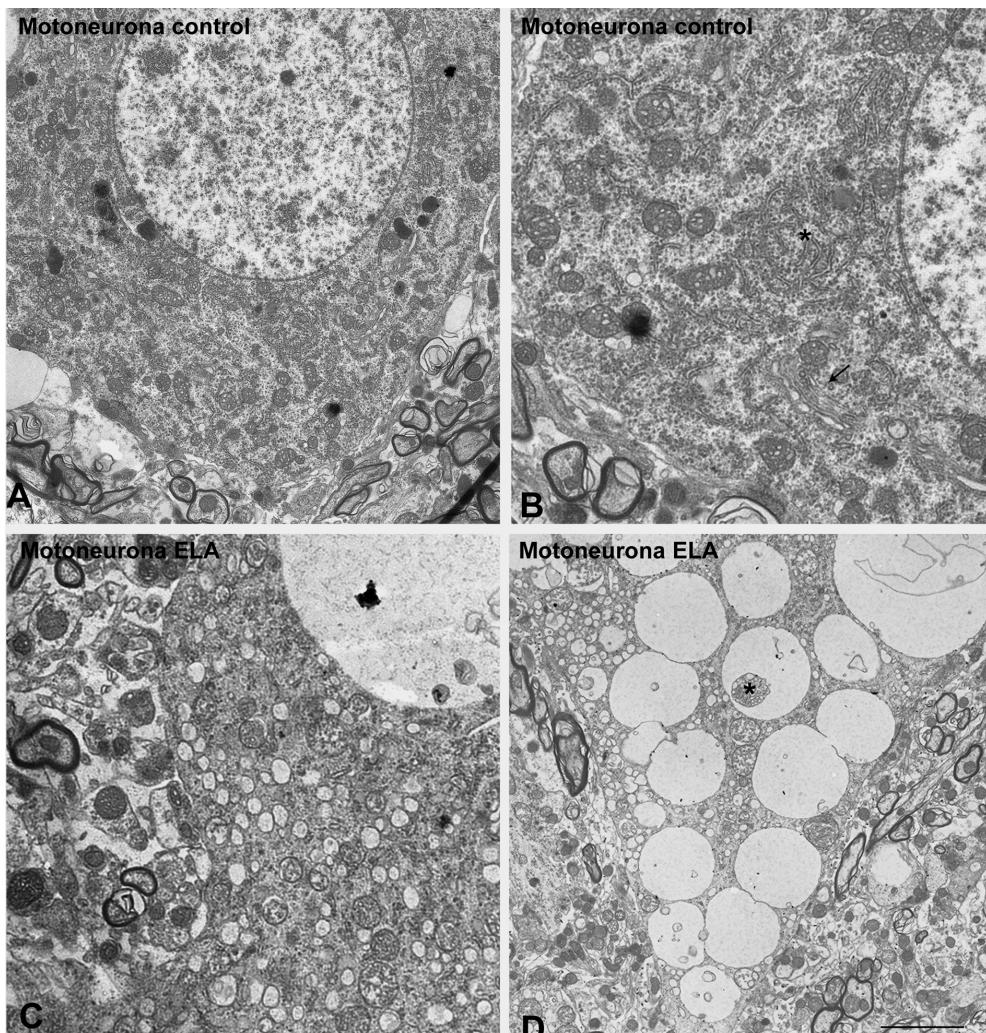


Figura 21. Análisis ultraestructural de la asta anterior de la médula espinal. A. Distribución en una MN control de los grumos de Nissls y dictiosomas de Golgi, mitocondrias y lisosomas. B. Detalle de un grupo de grumos Nissls (asteriscos) y un dictiosoma de Golgi (flecha). También se observan numerosos mitocondrias y lisosomas. Sin embargo, en las MN afectas de ELA con 100 días de edad (C) vemos como han desaparecido los grumos de Nissls y aparecen numerosas vesículas citoplasmáticas. D. Cuando la afectación histopatológica es mayor, el grado de vacuolización es más prominente, mostrando como las vacuolas corresponden a mitocondrias (asterisco) en proceso de degeneración característica del estrés oxidativo tal y como previamente ha sido descrito por Riancho y cols., 2014.

6. CONCLUSIONES

- 1) La ELA es una enfermedad poco prevalente, pero letal para los pacientes. Además, actualmente, no existe ningún fármaco comercializado para la misma, si bien existe proyectos esperanzadores.
- 2) El SNC se compone, no solo de una estructura anatómica muy compleja, si no de una biología celular y molecular acorde a dicha complejidad, con mecanismos reguladores muy estrictos.
- 3) Una de las causas más importantes inductoras de la degeneración específica por apoptosis de las MNs en la ELA es el estrés oxidativo.
- 4) Con los estudios que disponemos hasta la fecha, podemos concluir que el estrés oxidativo generado por la mutación de metaloproteasa SOD1^{mut} juega un papel crucial en la patogénesis de la ELA, con múltiples consecuencias a nivel citoplasmático y nuclear.
- 5) El estrés oxidativo generado por el déficit funcional de SOD1^{mut} también afecta a los elementos de la glia, astrocitos, microglia y oligodendroglia circundantes a las MNs pero no induce su degeneración masiva. Se propone que esto es debido a su capacidad de aclaramiento de la SOD1^{mut} transfiriéndola a las MNs de la vecindad.
- 6) El estudio histológico demuestra que las MNs degeneran por vacuolización citoplasmática de organelas vitales para la célula, incluyendo el RE, RER y las mitocondrias.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen PM and Al Chalabi A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature Rev. Neurol.* 7 (11): 603-615
- Andersen JK (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med.* 10 Suppl: S18-25
- Andersen PM (2006). Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 6: 37-46
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I. (2004). A docking approach to the study of copper trafficking proteins; interaction between metallochaperones and soluble domains of copper ATPases. *Structure.* 12 (4): 669-676
- Bendotti, C., Marino, M., Cheroni, C., Fontana, E., and cols (2012). Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* 97 (2): 101-26.
- Brites, D., Vaz, AR. (2014). Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Front Cell Neurosci.* 8: 117
- Bunton-Stasyshyn, RK., Saccon, RA., Fratta P., Fisher, EM. (2015). SOD1 Function and its implications for amyotrophic lateral sclerosis pathology: new and renascent themes. *Neuroscientist.* 21 (5): 519-29.
- Che, M., Wang, R., Wang, HY., and Zheng S. (2016). Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cáncer. *Drug Discov Today;* 21 (1): 143-149.
- Chen, S., Zhang, X., Song, L., Le, W. (2012). Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* 22 (1): 110-6.
- Farreras y Rozman. (2012). Medicina Interna. Volumen I. Elsevier.
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson ,AJ., Sendtner, M., and Shaw, PJ. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 7 (11): 616-30.
- Gamper, N., Ooi, L. (2015). Redox and nitric oxide-mediated regulation of sensory neuron ion channel function. *Antioxid Redox Signal.* 22 (6): 486-504.
- García-Porrero JA and Hurlé JM (2015). Neuroanatomía humana. Panamericana.
- Hayashi, Y., Homma, K., Ichijo, H. (2016). SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Adv Biol Regul.* 60: 95-104.

Iriarte Franco y Artieda González-Granada (2014). Manual de Neurofisiología Clínica. Panamericana.

Kaur, SJ., McKeown, SR., Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*. 577 (2): 109-118

Majouine, E., Renton, AE., Mok, K., Dopper, EG., and cols. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*. 11 (4): 323-30

Maniecka, Z., Polymenidou, M. (2015). From nucleation to widespread propagation: A prion-like concept for ALS. *Virus Res*. 207: 94-105.

Mizoguchi, Y. and Monji, A. (2017). Microglial intracellular Ca²⁺ signaling in synaptic development and its alterations in neurodevelopmental disorders. *Front Cell Neurosci*. 11: 69

Oliveira, AS., Pereira, RD. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): three letters that change the people's life. For ever. *Arq Neuropsiquiatr*. 67 (3A): 750-82.

Ojeda-Sahagún JL and Icardo de la Escalera JM (2005). Neuroanatomía humana. Barcelona: Masson.

Palanca, A., Casafont, I., Berciano, MT., Lafarga, M. (2014). Proteasome inhibition induces DNA damage and reorganizes nuclear architecture and protein synthesis machinery in sensory ganglion neurons. *Cell Mol Life Sci*. 71 (10): 1961-75.

Pasinelli P and Brown RH. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*. 7 (9): 710-23

Picher-Martel , V., Valdmanis, PN., Gould, PV., Julien, JP., and Dupré, N. (2016). From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathol Commun*. 4 (1): 70.

Polymenidou, M., Cleveland, DW. (2011). The seeds of neurodegeneration: prion-like spreading in ALS. *Cell*. 147 (3): 498-508.

Reinheckel, T., Grune, T., Davies, KJ. (2000) The measurement of protein degradation in response to oxidative stress. *Methods Mol Biol*. 99: 49-60.

Riancho J (2015). Bexaroteno como nuevo tratamiento en la ELA: estudio experimental en ratones transgénicos.

Rueggsegger C and Saxena S. (2016). Proteostasis impairment in ALS. *Brain Res*. 1648 (Pt B): 571-579.

Ruiz Soto, M (2016). El estrés oxidativo en la glía satélite de los ganglios raquídeos induce alteraciones sensitivas en el modelo murino hSOD1^{G93A} de esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Tisdale, S. and Pellizzoni, L. (2015). Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. J Neurosci. 35 (23): 8691-700

Valentine, JS., Doucette, PA., and Zittin Potter, S. (2005). Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. Annu Rev Biochem. 74: 563-593

Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., and cols (2015). A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. Surq Neurol Int. 6: 171

Zarranz JJ (2008). Neurología. 4^a ed. Madrid: Elsevier

Agradecimientos

En primer lugar a mi tutora del TFG, la doctora María Teresa Berciano, que con su esfuerzo, sabiduría y dedicación ha conseguido que este trabajo sea una experiencia agradable y muy enriquecedora. Igualmente, mi agradecimiento al doctor Miguel Lafarga, cuyos conocimientos han sido de gran interés para mí.

A los que han creído en mí desde el principio, y me han apoyado hasta el final. A una maravillosa doctora, que ha conseguido que todo merezca la pena. A mi familia, y en especial a mi madre y mi abuelo por ser el espejo en el que quiero mirarme todos los días.

