



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

El nucleolo y la patología nucleolar

The nucleolus and nucleolar pathology

AUTOR: Don Ignacio José Martos Soto

DIRECTORA: Dña. Ana Palanca Cuñado

Santander, junio 2022

ÍNDICE

Abreviaturas	4
Resumen	7
Palabras clave:	7
Abstract	7
Keywords:.....	7
Introducción	8
Biología celular del nucleolo	9
La organización nucleolar	10
La cromatina perinucleolar	11
Subcompartimentos nucleolares	12
Funciones nucleolares	14
El nucleolo y la biogénesis ribosomal	14
El proteoma nucleolar.....	15
El nucleolo como reservorio de proteínas	16
El nucleolo como sensor de estrés celular	17
El nucleolo y la estabilidad genómica	19
El nucleolo y los telómeros en el envejecimiento celular	19
El nucleolo y la envoltura nuclear	21
Patología nucleolar	23
Ribosomopatías	23
Cáncer	24
Enfermedades neurodegenerativas.....	25
Fisiopatología nucleolar en el Alzheimer	26
La proteína tau	26
Silenciamiento epigénético por hipermetilación del promotor de rDNA.....	27
Oxidación del RNA y disfunción ribosomal	28
Expresión reducida de PARP-1 nucleolar	29
Enfermedad de Alzheimer	30
Epidemiología	30
Etiología	30
Fisiopatología	31
Patogénesis	33

Manifestaciones clínicas	34
Criterios diagnósticos.....	35
Tratamiento	36
Discusión y conclusiones	38
Objetivos y metodología	38
Bibliografía.....	39
Agradecimientos	42

Abreviaturas

A β : Proteína β Amiloide

APE1: Endonucleasa 1 apurínica

APOE: Apolipoproteína E

APP: proteína precursora amiloide

CP: Promotor del núcleo

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4'6-dieamino-2-fenilindol

DDB1: "Damage specific DNA binding protein 1"

DFC: Componente denso fibrilar

DNA-PK: "DNA-activated protein kinase"

EA: Enfermedad de Alzheimer

E2F1: "E2F transcription factor 1"

FC: Centro fibrilar

GC: Componente granular

DFC: Componente fibrillar denso

GFC: "Giant fibrillar center"

HR: recombinación homóloga

HSP70: Proteína de choque térmico 70

IWG-2: grupo de trabajo internacional

MDM2: "Murine double minute 2"

mRNA: RNA mensajero

NADs: Dominios asociados a cromatina nucleolar

NIA: instituto nacional del envejecimiento

NCL: Nucleolina

NCS: sistema de canales nucleolares

NHEJ: Unión de extremos de DNA no homólogos

NORs: Regiones organizadoras nucleolares

NPM1: Nucleoplasmina 1

NSP: vía de vigilancia nucleolar

NSR: respuesta nucleolar de estrés

PARP1: "Poly(ADP-ribose) polymerase 1"

PH: Heterocromatina perinucleolar

PIC: complejos de preiniciación

PML: Leucemia promielocítica

PNC: Compartimento perinucleolar

PNKP: "Polynucleotide kinase 3'-phosphatase"

Pol I: RNA polimerasa I

Pol III: RNA polimerasa III

PSEN1: Presenilina 1

PSEN 2: Presenilina 2

RAD50: "RAD50 double strand break repair protein"

RAD51: "RAD51 double strand break repair protein"

RBD1: "RNA binding domain 1"

RBD4: "RNA binding domain 4"

rDNA: DNA ribosómico

RPL11: "ribosomal protein L11"

rRNA: RNA ribosómico

snoRNA: "Small nucleolar RNAs"

TAU: "Tubuline asociated unit"

TERT: "Telomerase reverse transcriptase"

UBF: "Upstream binding factor"

UCE: Upstream control element

WRN: "WRN RecQ like helicase"

XRCC1: "X-ray repair cross complementing 1"

XRCC5: "X-ray repair cross complementing 5"

Resumen

El nucleolo es un subcompartimento nuclear conocido principalmente por su función altamente especializada en la biogénesis ribosomal, pero a esta función clásica se le han añadido otras gracias a la investigación y los avances tecnológicos de las últimas décadas. Este orgánulo multifuncional también se considera un reservorio de proteínas y regulador de su actividad ya que puede controlar su exportación; actúa como sensor de estrés celular a través de la vía NSP (del inglés *nucleolar surveillance pathway*); favorece la estabilidad genómica, actuando sobre heterocromatina perinucleolar, y juega un rol importante en el envejecimiento celular a través de la regulación de la síntesis de la telomerasa. La alteración de alguna de estas funciones nucleolares puede dar lugar a la aparición de patologías como son las ribosomopatías, el cáncer y trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, sobre la que se centrará la última parte de esta revisión dada su relevancia en términos de prevalencia y coste socioeconómico.

Palabras clave: nucleolo, biología nucleolar, fisiopatología nucleolar, Alzheimer.

Abstract

The nucleolus is a nuclear subcompartment known mainly for its highly specialized role in the ribosomal biogenesis. Nevertheless, the nucleolus is not restricted to this canonical function and other roles have been described thanks to the research and technological advances in recent decades. This multifunctional organelle works as protein reservoir that regulates its exportation and hence controls the activity of those proteins; it is also known as a cellular stress sensor due to its response through the NSP pathway (*nucleolar surveillance pathway*); favors genomic stability through perinucleolar heterochromatin modulation and plays an important role in cellular aging via telomerase synthesis regulation. The alteration of any of the nucleolar functions might cause the appearance of pathologies such as ribosomopathies, cancer and neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease. Finally, last part of this revision is focused on the pathophysiology of the Alzheimer's disease for its relevance in terms of prevalence and socioeconomic cost.

Keywords: nucleolus, nucleolar biology, nucleolar pathophysiology, Alzheimer.

Introducción

Históricamente, los primeros estudios documentados sobre el nucleolo datan de 1835 y de 1836-39 y se obtuvieron de forma independiente por Wagner y Valentin respectivamente. (2,3)

No obstante, aparte de descripciones someras dentro de trabajos sobre citología general, no hubo literatura significativa sobre este subcompartimento nuclear hasta que Montgomery (1898) publica una monografía muy detallada del nucleolo.(1) Figura 1. Aun así, hasta Heitz (1931) y McClintock (1934), no se consideró su relación con los genes y hubo que esperar hasta el descubrimiento del ADN en 1953 para que posteriormente se definiera como un compartimento cromatínico específico. Este gran descubrimiento sentó las bases sobre las que estudiar el nucleolo no sólo como una curiosidad dentro de la citología nuclear, sino como una entidad con relevancia propia, sobre la que aún hoy se siguen descubriendo y describiendo nuevas funciones fisiológicas y patológicas.(4)

El nucleolo es un compartimento dinámico, sin membranas, que se localiza en el interior del núcleo celular. Es una organela multifuncional altamente especializada, es el centro de control y síntesis para el RNA ribosómico (rRNA) y las proteínas ribosomales con las que se fusiona el rRNA recién creado para formar las subunidades ribosomales. (5). Además, el nucleolo lleva a cabo funciones extra que están estrechamente relacionadas con la homeostasis y la salud del cuerpo humano que se comentarán en esta revisión.

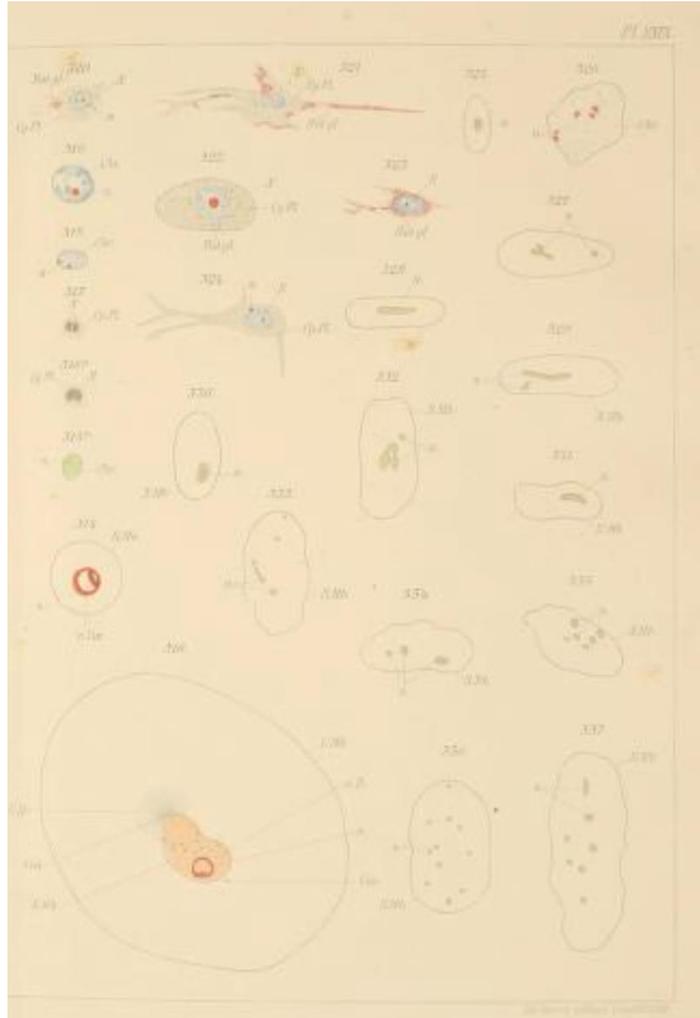


Figura 1. Fragmento de *Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus*, Montgomery, 1898. Se muestran como curiosidad una página con las ilustraciones manuscritas de las muchas que se incluyen en esta monografía. *Extraído de la Biodiversity Heritage Library.*(1)

Biología celular del nucleolo

El nucleolo se forma al principio de la fase G1 del ciclo celular. Esta organela se forma a partir de grupos de 200-400 genes de rDNA que se encuentran organizados en repeticiones en tándem (7,8). Figura 2.

La formación del nucleolo comienza con la organización de una serie de pequeñas subunidades que terminan uniéndose en 1 o 2 nucleolos funcionales más grandes que contienen múltiples regiones organizadoras nucleolares (NORs).

El nucleolo puede estar organizado tanto en torno a un solo NOR o en torno a varios que se disponen en torno al nucleolo cuando comienza la síntesis de rRNA. Figura 2.

El número de cromosomas que poseen regiones NOR varía en función de la especie. En las células humanas estos genes se localizan en los brazos cortos de cinco cromosomas acrocéntricos (13,14,15,21,22). Figura 3.

En los cromosomas en fase de mitosis se pueden detectar los NORs activos a través de una técnica de tinción de plata reflejando así la continua asociación de los NORs con las proteínas de la maquinaria de transcripción de rDNA.(5)

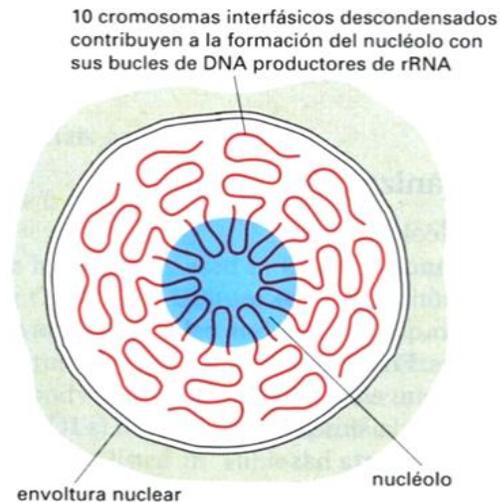


Figura 2: Esquema del núcleo celular delimitado por la envoltura nuclear, en el nucleoplasma se observan 10 cromosomas descondensados en los que los bucles correspondientes a las regiones organizadoras nucleolares se encuentran dispuestas de tal forma que se concentran en el interior del nucleolo (representado en azul). (6)

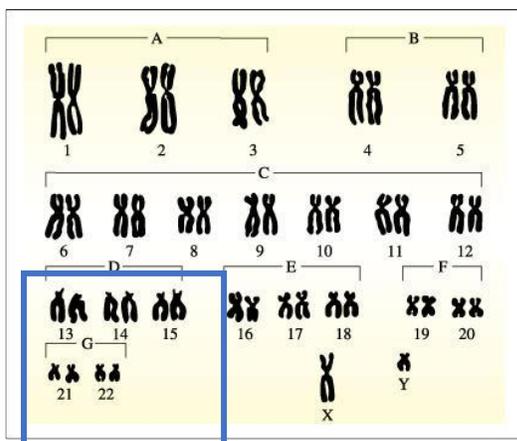


Figura 3: Cariotipo humano con los cromosomas acrocéntricos que forman los NORs encuadrados en azul. (6)

La organización nucleolar

La complejidad de la organización nucleolar se ha ido descifrando a lo largo de los últimos 50 años gracias a la gran evolución de las técnicas de biología celular y molecular debidas al estallido en la innovación tecnológica de las últimas décadas como la hibridación *in situ*, la resolución tridimensional, y la mejora en los métodos de aislamiento de elementos celulares específicos como el nucleolo.(5)

Estos avances han mostrado la gran variabilidad en la organización nucleolar; la cual ha sido objeto de extenso estudio en diferentes contextos como la proliferación, desarrollo o la diferenciación celular. Además, la comparación de la organización nucleolar a lo largo de la evolución reveló que, aunque las células eucariotas mantienen los “elementos de construcción” más básicos, sí que han desarrollado una complejidad mayor en cuanto a su organización. Por ello, el nucleolo constituye un modelo para entender los principios de organización de los dominios nucleares, el movimiento de las proteínas dentro de la célula y la función de los cuerpos nucleares como los cuerpos de Cajal, los cuerpos de la leucemia promielocítica (cuerpos PML) y los factores de *splicing*.(5,9)

Asimismo, aunque hay un consenso en cuanto a que a mayor tamaño de nucleolo mayor es la velocidad a la que se divide la célula y esto se debe a mayores velocidades de biogénesis de ribosomas y crecimiento celular, el tamaño y número de nucleolos por célula pueden variar bastante. También se ha observado gran variabilidad nucleolar en patologías como el cáncer, donde, dado que el tamaño del nucleolo está directamente relacionado con el grado de síntesis proteica y producción ribosomal, es correcto pensar que las células cancerígenas tengan nucleolos más grandes, lo cual puede usarse como criterio diagnóstico para diferenciar células malignas de las que no lo son. Por todo esto, el estudio de la fisiología normal y la patología nucleolar en el cáncer es fundamental para poder evitar neoplasias, apoptosis, formación de telómeros o mutaciones por RNAs modificados entre otros.(5)

Como se ha comentado anteriormente, el nucleolo es una organela que no se encuentra encapsulada por una membrana, está rodeado por heterocromatina perinucleolar y, observada a través del microscopio electrónico, esta organela se muestra compuesta principalmente por regiones granulares y fibrilares con una disposición muy variable, en la que se pueden definir tres regiones: 1) centro fibrilar 2) componente denso fibrilar 3) el componente granular. (5,10).

La cromatina perinucleolar

Alrededor del nucleolo se puede observar una capa de heterocromatina adherida a él. Esta heterocromatina es visible en microscopía óptica utilizando la tinción DAPI (4'6-dieamino-2-fenilindol) lo que demuestra que tiene un contenido alto de DNA periférico en comparación con el contenido en el nucleolo y en microscopía electrónica, la propia electrodensidad de la heterocromatina permite su visualización. Figura 4. No obstante, los primeros protocolos establecidos para aislar el nucleolo estaban basados en la utilización de ADNasas que eliminan esta capa de cromatina, lo que dificultaba su visualización. (5)

Alrededor del nucleolo de células humanas el movimiento de cromatina está restringido de la misma manera que alrededor de la cromatina perinuclear. Es importante caracterizar los genes y las secuencias localizadas en la capa de cromatina perinucleolar para entender la complejidad de las interacciones del dominio nucleolar en el núcleo. Los dominios asociados a cromatina nucleolar (NADs) han sido aislados, secuenciados y caracterizados y en ellos se han identificado diferentes familias de genes y ciertas repeticiones satélite como bloques principales de NADs, todos estos elementos sumados se corresponden con no menos que el 4% del total de secuencias genómicas. En la periferia del nucleolo hay un dominio específico, el compartimento perinucleolar (PNC), el cual se asocia con un locus específico de DNA y está altamente enriquecido en proteínas de unión a RNA y transcritos de Pol III.(5)

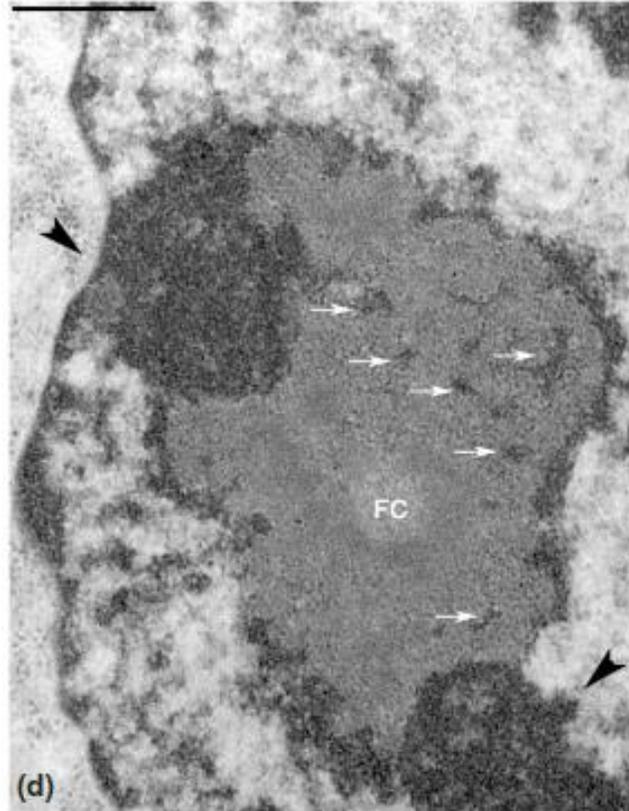


Figura 4. Imagen obtenida por microscopía electrónica usando un protocolo que permite visualizar ácidos nucleicos. Los DNAs y RNAs se contrastaron con uranilo después de acetilar y metilar sus grupos carboxilo. En la imagen (d) se pueden observar dos grandes acumulos de cromatina (flechas negras) además de la cromatina perinucleolar rodeando todo el nucleolo. Las flechas blancas señalan pequeños acumulos de cromatina nucleolar imbuidas en el GC. Un FC es visible en el medio del nucleolo. (barra de escala = 0,5 μ m).(5)

Subcompartimentos nucleolares

En el nucleolo, la microscopía electrónica de transmisión muestra que este orgánulo no tiene una electrodensidad homogénea. Es por ello, que a nivel ultraestructural podemos distinguir tres regiones en el nucleolo (figura 5a): el centro fibrilar, componente denso fibrilar y el componente granular, cuyos nombres atienden a esta diferencia en la morfología y que más tarde se relacionó con las distintas funciones que cumplen estos subcompartimentos. (5,10).

En general, morfológicamente los centros fibrilares (FCs) son áreas fibrilares despejadas de tamaños que varían de 0.1 a 1 μm . Se encuentran parcialmente rodeados por el componente fibrilar denso (DFC), con el que contrastan bastante. Tanto los FC como el DFC se encuentran imbuidos en el componente granular (GC), que se denomina así porque consta principalmente de gránulos de 15-20 nm de diámetro en una distribución poco organizada. Figura 5a.

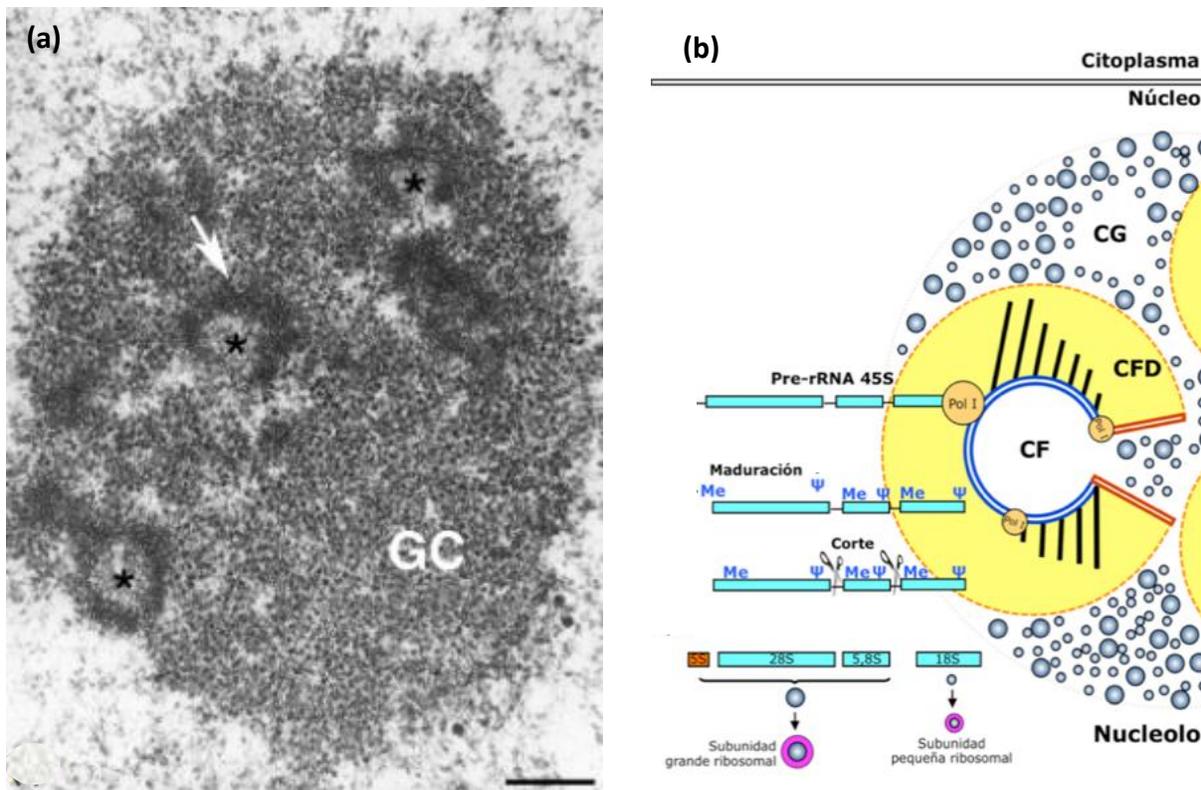


Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra la ultraestructura general del nucleolo (a) y esquema de las funciones de los compartimentos nucleolares(b). En (a) y (b) son visibles los tres componentes nucleolares: los centros fibrilares (FC) se señalan con un asterisco; los componentes fibrilares densos (DFC) se caracterizan por un anillo muy electrodenso que rodea los FC (flecha blanca). El componente granular (GC) se encuentra disperso por el nucleolo. (b) Desde un punto de vista funcional, los FCs son los organizadores estructurales del rDNA. Por su parte, el DFC está constituido por fibrillas densamente empaquetadas en las que se disponen buena parte de los genes ribosomales activos. El GC está formado por subunidades prerribosomales. A partir de estos rRNAs nucleolares y el rRNA 5s (de origen extranucleolar) se formarán las subunidades grande y pequeña (60S y 40S) del ribosoma. Barra de escala (a)= 0,5 μm ..(5).

Funcionalmente, en los CFs se organizan numerosas copias de genes ribosomales activados o inhibidos transcripcionalmente(8,11). Preferentemente, los genes de rDNA silentes se sitúan en la zona más central del CF, mientras que el rDNA activo se dispone en la periferia y se extiende en el CFD, donde se produce la transcripción (12). Cada CF, junto con la cápsula del CFD que lo rodea, constituye la unidad estructural y funcional del nucleolo y es donde se produce la biogénesis y procesamiento inicial de los rRNAs (figura 5). El componente granular, que rodea a los otros dos, tiene una morfología de menor electrodensidad y en él se generan las subunidades pequeñas y grandes prerribosomales que serán exportadas para formar el ribosoma, el cual es clave en la traducción de proteínas que se produce en el citoplasma. Figura 5b.

Se ha relacionado la variabilidad en volumen y número de los FCs con la actividad transcripcional del rDNA. Por ejemplo, en linfocitos humanos maduros con poca actividad solo se distingue un único FC en el nucleolo de los mismos. Bajo estimulación estos linfocitos entran en el ciclo celular, se estimula biogénesis de ribosomas y el nucleolo entonces cambia, se hace de un tamaño mayor al mismo tiempo que se forman numerosos FCs más pequeños. (5)

En el CF se almacenan moléculas implicadas en la transcripción como son el factor de transcripción UBF (*“Upstream binding factor”*, que puede verse en la figura 6), la RNA polimerasa I, la TBP (*“TATA binding protein”*), la DNA topoisomerasa I y algunos transcritos de los propios preRNAs (13). Está establecido que la Pol I activa se localiza en la interfase entre el FC y el DFC, mientras que el procesamiento temprano de el pre-rRNA ocurre en el DFC y el procesado tardío en el GC. Tanto la parte no transcrita del rDNA, como los complejos pol I, la maquinaria de transcripción (como el UBF) y la topoisomerasa I están localizados en el FC. Por ello se propuso que el FC era la contraparte interfásica de los NORs mitóticos porque el nucleolo se reforma alrededor de los FCs al final de la mitosis.(5)

La organización estructural y la proporción de estos componentes está directamente relacionada con la actividad metabólica celular, razón por la que, de forma fisiológica, las células con gran actividad metabólica, como las neuronas de la figura 6, son un modelo excelente para correlacionar estructura y función del nucleolo.

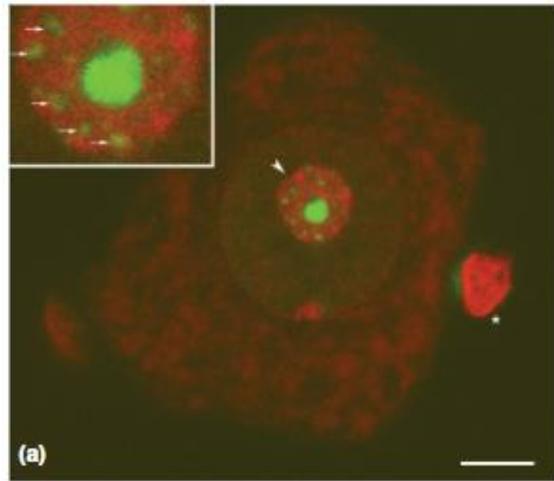


Figura 6. Imagen de microscopía confocal de una neurona del ganglio trigémino. El yoduro de propidio (rojo) permite ver los ácidos nucleicos y se concentra especialmente en el nucleolo (cabeza de flecha). El inmunomarcaje específico de la proteína UBF (verde) muestra un GFC prominente y otros más numerosos de tamaño normal (flechas). Barra de escala = 5 μm .(11)

Funciones nucleolares

El nucleolo es principalmente conocido por su función más básica que es la de biogénesis ribosomal, sin embargo, tiene otras funciones adicionales cuyos mecanismos aún se siguen estudiando en la actualidad.

El nucleolo y la biogénesis ribosomal

La biogénesis ribosomal es un proceso complejo y secuencial que se inicia por la transcripción del rDNA nucleolar por la polimerasa I (Pol I, en la figura 7), que genera el precursor de la subunidad 47S rRNA. Este suceso se produce con la formación regulada de complejos de preiniciación (PIC) en el promotor y reclutamiento de RRN3, topoisomerasa II α y el complejo Pol I. A su vez la formación del PIC es regulada a múltiples niveles, por unión competitiva de otras células y/o modificaciones epigenéticas. (10)

Mientras que el ritmo de transcripción es regulado de manera dinámica existe controversia respecto a que paso es el que limita la velocidad, tradicionalmente se consideró que el paso limitante era el de la iniciación, sin embargo, evidencias recientes apoyan que el paso limitante es la elongación y/o el procesamiento del precursor rRNA (10). Lo más probable es que todos los pasos requieran modulación al unísono para conseguir la modulación de la síntesis tan dinámica que se observa en las células en proceso de crecimiento. Si bien existen reguladores maestros de la transcripción

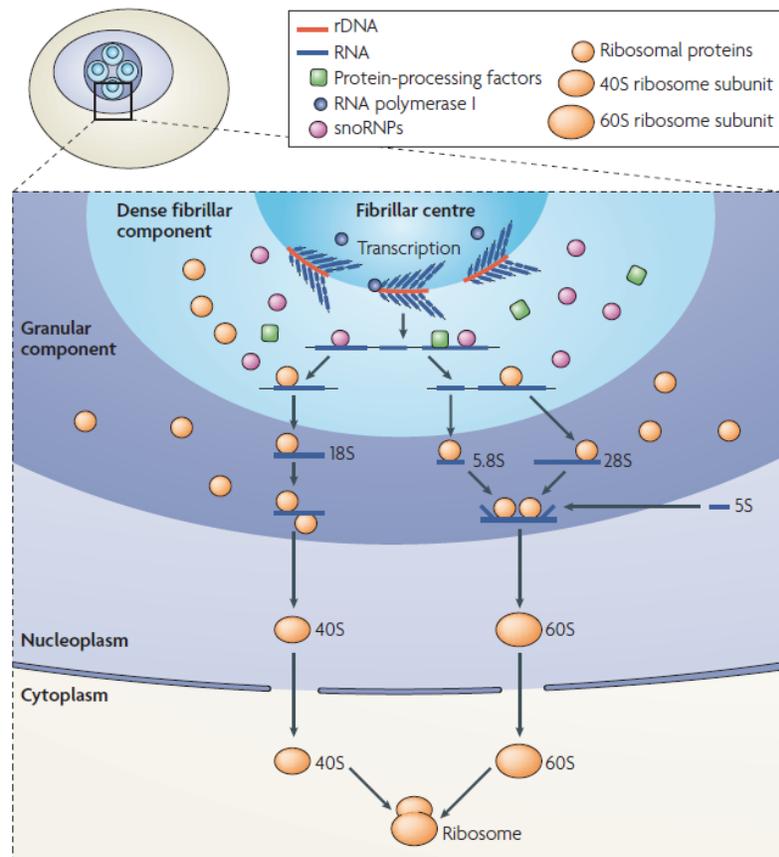


Figura 7. Modelo de biogénesis ribosomal. La transcripción de rDNA por la RNA pol I se da entre los FC y el DFC. El transcrito de RNA pre-ribosómico es modificado por acción de las snoRNPs en el DFC. La maduración final de las ribonucleoproteínas pre-ribosomales y su unión con las proteínas ribosomales ocurre principalmente en el GC. Es en el GC donde las subunidades 5.8S y 28S de rRNAs se unen con la subunidad extranucleolar 5S para formar la subunidad ribosomal 60S, mientras que la subunidad 18S rRNA forma por sí sola la subunidad 40S. Finalmente, las subunidades 40S y 60S son exportadas al citoplasma celular donde se unen a mRNA para formar ribosomas completamente funcionales (12).

como la oncoproteína y factor de transcripción MYC que puede regular directa e indirectamente las tres Pol, asegurando así una transcripción y biosíntesis de ribosomas coordinada.(10)

El rRNA también requiere un extenso procesamiento (figura 7) seguido de cambios conformacionales para permitir un plegamiento cooperativo de las ribonucleoproteínas. Hay factores como snoRNPs y complejos de montaje que facilitan el ensamblaje y la maduración de los pre-40S y pre-60S antes de ser exportados al citoplasma para la maduración final a un ribosoma funcional. (10).

El proteoma nucleolar

En 2002 se publicaron dos estudios que mostraron una fuerte e inesperada evidencia de que el nucleolo no era solo el lugar para síntesis de ribosomas, también es el reservorio de proteínas no ribosomales(14). En el estudio de Andersen se identificaron 271 proteínas de las cuales 11 en el nucleolo cuando se usaba el inhibidor de la transcripción actinomicina D que bloqueaba la acción de las tres polimerasas. en el estudio de Scherl se identificaron 213 proteínas. (14,15)

Más allá de lo sorprendente que es haber detectado tal número de proteínas en el nucleolo, lo más importante fue lo diversas que eran las funciones de estas proteínas detectadas. Un 30% de ellas no tenían relación con la función de biogénesis de ribosomas. Se organizaron las funciones de las proteínas detectadas en 6 categorías (estructura cromatínica, metabolismo de mRNA, translación, chaperonas, proteínas fibrosas y otras) y gracias a estudios posteriores a estas funciones se les sumaron: control del ciclo y la proliferación celular, muerte celular, metabolismo de los telómeros, modificación post-traducciona de RNA, producción de energía, replicación recombinación o reparación del DNA.(10)

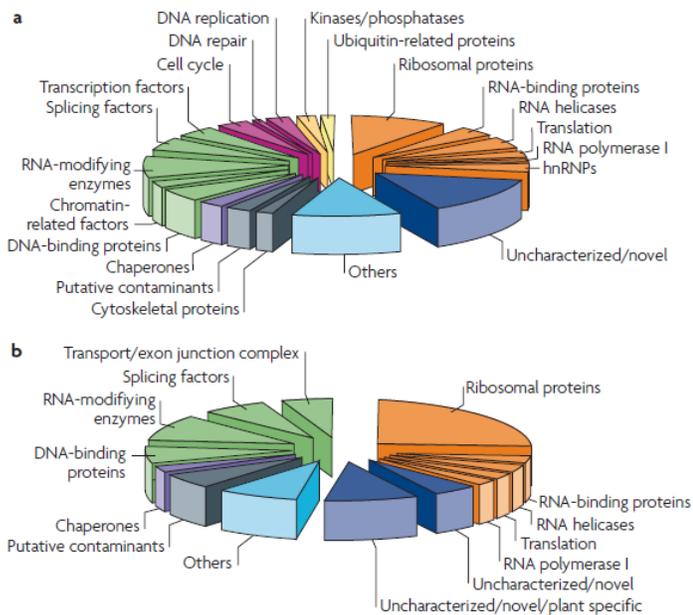


Figura 8. Imagen (a) Proteínas nucleolares humanas identificadas mediante espectrometría de masas. Imagen (b) Proteínas nucleolares detectadas en la planta *Arabidopsis thaliana* para su comparación. En naranja las proteínas que intervienen en diferentes aspectos de la biogénesis ribosomal. En verde proteínas que intervienen en la transcripción de la RNA polimerasa II. En rosa las proteínas que intervienen en el ciclo celular o la reparación de DNA. En gris proteínas que son contaminantes. En azul claro proteínas que no se ha conseguido determinar si son nucleares o nucleolares. En azul oscuro proteínas que todavía no se habían descrito. (12)

La detección de todas estas proteínas no relacionadas con la biosíntesis de ribosomas abre un gran abanico de posibilidades. Es posible que se encuentren en el nucleolo porque es ahí donde se modifican o almacenan hasta ser liberadas, por tanto el nucleolo ejercería de barrera permeable regulada que modularía las funciones en las que intervengan estas proteínas. (10).
Figura 8.

El nucleolo como reservorio de proteínas

El flujo de las proteínas varía hacia dentro o hacia afuera del nucleolo como respuesta a diversos estresores como son la radiación UV, la hipoxia, la deshidratación, infecciones virales o tratamientos médicos como el etopósido y la actinomycina D. Por lo general se ha reportado que el estrés celular agudo favorece una pérdida de proteínas independientemente de su función. (10,16)

En cuanto a cuáles son los mecanismos que median el movimiento de las proteínas en el nucleolo, se ha propuesto que las proteínas se pueden acumular de forma pasiva en el nucleolo, mientras que su liberación desde el nucleolo es un proceso activo regulado. (10)

Existen notables excepciones entre estas RelA y el supresor tumoral de la leucemia promielocítica (PML), que son acumulados a través de mecanismos activos en el nucleolo durante periodos de estrés y apoptosis. Otro ejemplo es la proteína de choque térmico 70 (HSP70) que entra en el nucleolo en respuesta a estrés quizás para facilitar la restauración de la función nucleolar correcta. (10)

Otras proteínas como la nucleolina (NCL) y la nucleoplasmina (NPM1) se describen como andamiaje y centros de anclaje para facilitar el almacenaje de proteínas en el nucleolo. A modo de ejemplo, NPM1 interactúa y actúa como lanzadera de proteínas entre los compartimentos celulares, pero también actúa uniendo ácidos nucleicos con predilección por las secuencias G-cuadruplex que son comunes en el rDNA. Por tanto, se puede decir que NPM1 tiene un rol doble en el nucleolo como chaperona y como proteína de anclaje. (10)

La localización nucleolar de proteínas puede ser regulada por cambios en el ambiente celular, cambios de pH celular favorecen la acumulación de proteína de Von Hippel-Lindau. (10)

La acumulación y liberación nucleolar de proteínas provee a la célula de un mecanismo para regular procesos celulares. A modo de ejemplo, la retención en el nucleolo de moléculas críticas para el ciclo celular como cdc12 o MDM2 permite la regulación directa del ciclo celular y controlar espaciotemporalmente el ritmo de división celular para coordinarlo con el de crecimiento celular. (10)

De la misma forma, la retención nucleolar de proteínas de reparación de DNA (DDB1, PARP1, PNKP, XRCC1) permite su liberación de forma masiva y coordinada ante un estímulo de estrés exógeno. También se ha detectado la endonucleasa 1 apurínica (APE1), la cual actúa dentro del nucleolo favoreciendo la estabilidad rDNA dañado y, por tanto, ejercer un control de calidad del rRNA. Así, APE1 puede ser un nexo de unión que modula los procesos de reparación de DNA y el metabolismo del RNA. (10)

También se localizan en el nucleolo otras proteínas relacionadas con los procesos de reparación del DNA, como RAD50 y 51, WRN, XRCC5, DNA-PK, PARP1, PNKP y XRCC1. Actualmente, todavía se sigue discutiendo en la literatura el mecanismo por el que se repara el rDNA y éste podría implicar tanto la recombinación homóloga (HR) como la unión de extremos de DNA no homólogos (NHEJ, del inglés *non homologous end joining*). Lo que está claro es que el daño o perturbación al medio celular favorece el acúmulo o liberación de proteínas al nucleolo o citoplasma respectivamente. Se propone que este es el mecanismo que siguen ciertos inhibidores de la Pol I en el tratamiento del cáncer. (10)

El nucleolo como sensor de estrés celular

Otra de las funciones del nucleolo es la de actuar como sensor de estrés celular. El nucleolo responde a la detección de estrés celular favoreciendo la acumulación de la proteína supresora tumoral p53. A esta respuesta se la conoce como respuesta nucleolar de estrés (NSR) o también como la vía de vigilancia nucleolar (NSP) ya que parece que funciona monitorizando la producción y fidelidad ribosomal y manteniendo niveles de p53.

La activación de la vía NSP conlleva la activación de p53 (figura 9), que actúa deteniendo el ciclo celular o en casos extremos llevando a la célula a su muerte por apoptosis. Los elementos estresantes que actúan activando la vía NSP son: mutaciones en riboproteínas u otros componentes de la biogénesis ribosomal, mutaciones en componentes de Pol II, daño de DNA, condiciones ambientales extremas, señales de hiperproliferación, estrés oxidativo, privación de nutrientes, hipoxia, estrés osmótico, infecciones virales, privación de energía y estrés oncogénico. Esta respuesta no es una reacción rápida y aguda frente al estrés, es más bien un mecanismo regulatorio que actúa manteniendo en equilibrio los niveles de p53 con el ritmo de proliferación celular y de biosíntesis de ribosomas.(10)

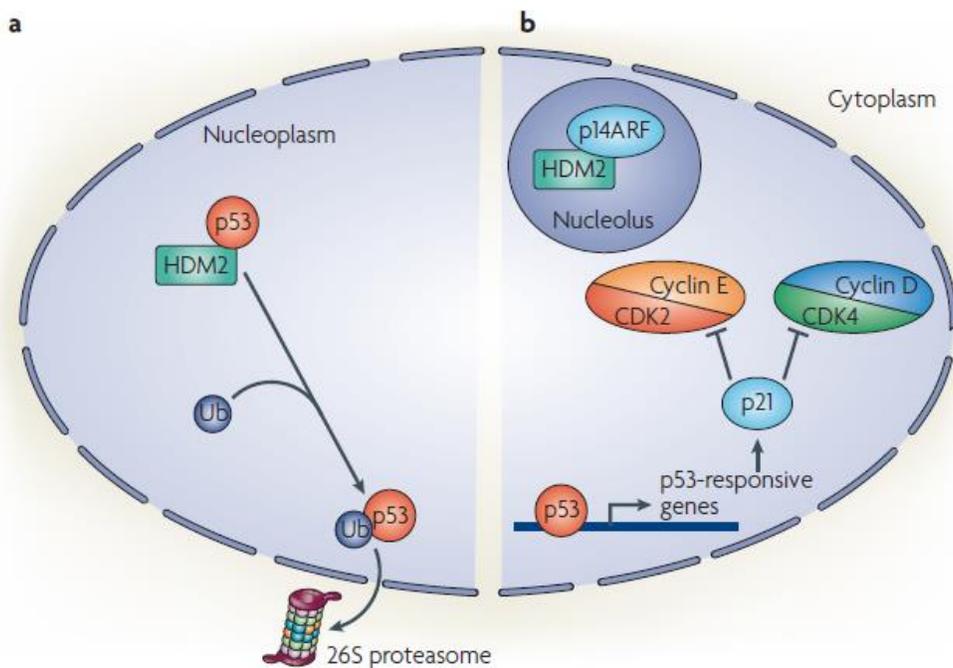


Figura 9. Imagen (a) En condiciones normales la proteína p53 es una proteína de vida corta que se encuentra en niveles casi indetectables por su rápida degradación intracelular. La molécula HDM2 y E3 ubiquitina actúan como ligandos que favorecen la rápida degradación de p53 vía proteosoma 26S. Imagen (b) En respuesta a un estímulo estresante para la célula como es la activación de un oncogen o el daño de DNA la molécula p14ARF actúa activando la vía de la p53. P14ARF es nucleolar predominantemente e interviene en diversas mediaciones de proteínas nucleolares, mientras que p53 es nucleoplásmico. Una vez dada la activación por señales oncogénicas p14ARF se asocia con HDM2 y la retiene dentro del nucleolo. Esta retención nucleolar de HDM2 previene su unión con p53, evitándose así la degradación de p53, favoreciéndose así la vía NSP.(12)

También existen mecanismos de respuesta a estrés celular mediados por el nucleolo independientes de p53. Esto se realiza a través de la unión de RPL11 libre con MDM2, lo cual actúa deteniendo el ciclo celular a través de la degradación en el proteosoma de E2F1.(10)

Por todo esto, se puede considerar al nucleolo como una diana terapéutica y bajo esta perspectiva, diseñar fármacos que tengan como objetivo específicamente la actividad de la RNA Pol I; de hecho, los compuestos CX-3543 y CX-5461 son muy prometedores en este aspecto. Se ha conseguido demostrar la destrucción selectiva de células de linfoma B in vivo por CX-5461 manteniendo viables las células B sanas. Las células malignas del linfoma B requieren una transcripción de rRNA y biogénesis de ribosomas muy activos para su supervivencia. En este estudio se vió que en los ratones tratados con CX-5461 se activaba muy rápido la proteína p53 llevando las células malignas a la muerte por apoptosis, esto se dió a través de la activación de la vía NSP.(17) El fármaco en cuestión no afectó a ninguna célula normal ni hizo disminuir el número de células B. Este estudio sugiere que se puede utilizar como diana terapéutica la dependencia que tienen ciertas células tumorales por la transcripción hiper activada de rDNA. (17)

Por último, una elevación ligera de los niveles de p53 truncada en ratones con mutaciones de un alelo del gen p53 mostró una disminución de un 20% de la duración de vida, atrofia muscular generalizada y osteoporosis además de disminución de la tolerancia al estrés, una menor respuesta regenerativa frente a diversos estímulos estresantes y mayor resistencia a desarrollar tumores de manera espontánea.

Todas estas evidencias indican que p53 puede tener también relación con la regulación de la longevidad. (18)

El nucleolo y la estabilidad genómica

El nucleolo interviene en la estabilidad genómica de diversas formas, el rDNA es altamente repetitivo y esto lo hace sensible a que se pueda dar una recombinación homóloga lo cual afectaría negativamente en la estabilidad genómica. (10)

La heterocromatina perinucleolar está muy empaquetada y actúa como una barrera contra la recombinación homóloga. Las alteraciones en la heterocromatina perinucleolar están asociadas con inestabilidad genómica, envejecimiento prematuro y enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. La heterocromatina perinuclear también contribuye a la preservación de la arquitectura nucleolar. Es por esto por lo que, dado que el rDNA se encuentra en los 5 cromosomas anteriores, la heterocromatina perinucleolar puede funcionar mediando interacciones entre genes específicos, regulando su acceso y transcripción.(10)

El nucleolo y los telómeros en el envejecimiento celular

La hipótesis del telómero es una de las teorías más aceptadas sobre el envejecimiento, en ella se expone que es la longitud de los extremos cromosómicos los que determinan la duración de la vida de la célula. Es por esto por lo que un acortamiento telomérico es visto como causa de envejecimiento de la célula y pérdida de actividad replicativa, mientras que el hecho contrario, el alargamiento telomérico favorece la prolongación de la vida de la célula o también la malignización celular. (18,19). Figura 10.

La ribonucleoproteína telomerasa tiene actividad transcriptasa inversa y actúa sintetizando las secuencias de ADN repetitivas que son características de los telómeros. Estabiliza su longitud y mantiene su integridad. En eucariotas superiores como los seres humanos, la ribonucleoproteína telomerasa en cuestión está formada por tres componentes: una subunidad con actividad catalítica, una subunidad de RNA esencial y una proteína que se encuentra asociada a la Telomerasa. Se ha demostrado la implicación del nucleolo en la maduración de la Telomerasa y que tanto su subunidad catalítica, como la subunidad de RNA esencial se encuentran localizadas en esta organela, por lo que se ha propuesto que el ensamblaje de la telomerasa se da en el nucleolo. (18,21).

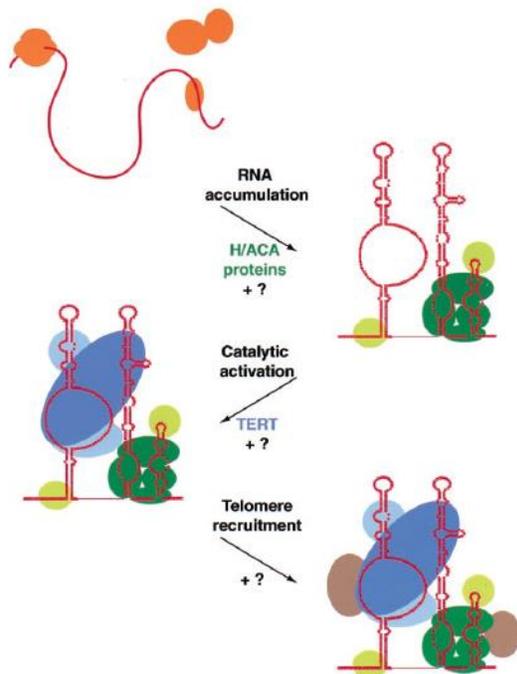


Figura 10. En la imagen se detalla el proceso de biogénesis de la telomerasa y la activación y maduración de sus subunidades. Paso 1: Para que se de correctamente este proceso de maduración y acúmulo de RNA se requiere la participación de numerosos factores celulares. Algunos de estos elementos madurativos (naranja) se asociarán solo transitoriamente con el RNA de la telomerasa (rojo). Las proteínas H/ACA (verde oscuro) y otras proteínas de unión hTR (verde claro) quedarán unidas permanentemente al complejo de RNA de la telomerasa, favoreciendo de este modo la estabilidad de su RNA. Paso 2: En este momento se llevará a cabo la activación catalítica de la enzima, para que se de este proceso se requiere la asociación de la ribonucleoproteína telomerasa con la molécula TERT (azul oscuro) y posiblemente otras proteínas (azul claro). La unión de TERT al RNA de la telomerasa se da en al menos dos regiones separadas. Paso 3: La enzima una vez activada se transporta al telómero. El transporte de la telomerasa al telómero se ve regulado por proteínas que interactúan con ella (marrón). Quedando de este modo una telomerasa funcional con todos los dominios descritos. (20)

El estudio del RNA que conforma la telomerasa indicó que tiene un dominio H/ACA que es característico de RNAs nucleolares. Se usó una inyección de RNA telomerasa en ovocitos de *Xenopus* y se vió que el transporte del RNA inyectado se realiza por la misma vía que el de los RNAs pequeños nucleolares. Además, se vió que la distribución y retención del ARN de la telomerasa en el nucleolo es dependiente del dominio H/ACA. (18)

También se pudo ver que las proteínas hSTAU y L22 que se encuentran en el nucleolo y en el citoplasma interactúan con el ARN de la telomerasa. Usando fibroblastos humanos en condiciones normales se demostró que la nucleolina se une al complejo telomerasa usando dos interacciones proteína-ARN y proteína-proteína. Son dos regiones distintas de la nucleolina las responsables de esa interacción: la región carboxilo terminal en la que están los dominios de unión al RNA (RBD4) y RGG y la región del centro que es en la que está el dominio de unión al RNA (RBD1). Estas son las regiones que interactúan con la subunidad de la telomerasa que muestra actividad transcriptasa inversa. Queda demostrado por los autores que la nucleolina es un elemento necesario para la localización nucleolar y el mecanismo en el interior de la célula

del complejo de la telomerasa, pero sin modular la actividad enzimática de la telomerasa humana.(18)

En consecuencia, con estas evidencias, se observó posteriormente el movimiento dentro de la célula de dos de los principales componentes de complejo telomerasa en células de carcinoma cervical HeLa durante las fases del ciclo celular (22). En G1 el ARN de la telomerasa se sitúa en los Cuerpos de Cajal; mientras que la subunidad con actividad catalítica se sitúa en distintos cuerpos nucleares en el nucleoplasma, por tanto, ambos componentes están repartidos en elementos intranucleares separados. Al principio de la fase S estos dos elementos se asocian al nucleolo, distribuyéndose de la siguiente manera, la subunidad con actividad catalítica se localiza en el interior del nucleolo y el RNA de la telomerasa se sitúa en torno al núcleo, en los Cuerpos de Cajal. En torno a la mitad de la fase S se puede ver la co-localización de las subunidades en los telómeros y en el complejo telomerasa. Es por esto por lo que se sugiere que el proceso de ensamblado de la telomerasa humana se da más específicamente durante la fase S, momento en el que se da la síntesis de los telómeros y se destruye la subunidad con actividad de transcriptasa inversa. Por tanto, parece que existe una relación directa entre la actividad, biogénesis y el tráfico intranuclear del complejo telomerasa y el nucleolo, participando ambos en la actividad replicativa y el envejecimiento celular.(18)

Si bien es cierto que el estudio del control del envejecimiento ha avanzado bastante últimamente, hay que llevar a cabo estudios a un nivel básico a cerca de todos los mecanismos moleculares intracelulares que intervienen en este proceso. Es necesario saber si es la desregulación de la transcripción del ADN que codifica para el rRNA es proceso básico que guía el envejecimiento celular, y estudiar cuidadosamente como el nucleolo controla la biosíntesis y el reclutamiento de las moléculas involucradas en la regulación del ciclo celular. Además, los avances en el estudio del nucleolo como regulador del envejecimiento celular abren nuevas líneas de desarrollo para terapias que alarguen o mejoren la vida de los individuos.(18)

El nucleolo y la envoltura nuclear

Hay una íntima relación entre el nucleolo y la envoltura nuclear. Todavía no se conoce cuál es el motivo exacto al que obedece esta relación, pero una posibilidad es que sea para favorecer el tráfico de ribosomas del nucleolo al citoplasma. (5)

En células de crecimiento rápido se exportan no menos de 2000 ribosomas por minuto y una posibilidad es que bajo estas circunstancias tan exigentes una fracción de preribosomas en maduración pasen directamente del nucleolo al citoplasma aprovechando esta relación espacial que existe entre en nucleolo y la envoltura nuclear. (5)

La unión a la membrana nuclear puede tener también una función reguladora bajo situaciones desfavorables para el crecimiento en las que no se cuente con suficientes nutrientes favoreciendo la transferencia de material nucleolar al sistema de degradación vacuolar reciclando material mediante microautofagia del nucleolo. Se han descrito casos en eucariotas

superiores de nucleolos directamente conectados con el citoplasma a través de invaginaciones de la membrana nuclear también llamadas “canales nucleolares” (figura 11). La formación de estos “canales nucleolares” depende estrictamente de la presencia de transcritos de rDNA y NOR activos y se relaciona con la función de exportar ribosomas.(5)

Además, se han detectado canales nucleares dinámicos con invaginaciones de la envoltura nuclear asociada. Estos canales que son fenestrados por poros terminan cerca del nucleolo. Siendo en cualquier caso una estructura coherente con la función de exportación ribosomal que se les presume. El número de canales y su complejidad varía mucho, pero permanece característico para cada tipo celular estudiado en cuestión.

No obstante, aun hoy en día se desconoce si el número de canales y la complejidad de estos se relaciona con índices de proliferación mayores o si incrementa en situaciones de enfermedad.(5)

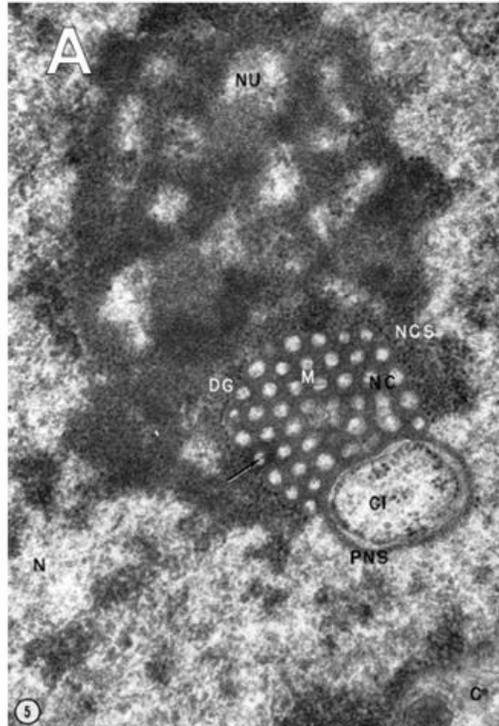


Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión en la que se puede ver parte del núcleo celular de una célula secretora endometrial humana. En ella se distinguen el núcleo (N) nucleolo (NU), y parte del citoplasma (C) en la esquina inferior derecha. Nótese que el sistema de canales nucleolares (NCS), se encuentra localizado en la periferia del núcleo y parte del citoplasma (CI) se ha proyectado hacia el núcleo.

El corte transversal del sistema de canales nucleolares permite la observación de una gran cantidad de canales (NC) de unos 500-600 Å de diámetro en cuyo interior existe un material amorfo y electrolúcido flanqueado por un material electrodenso (M) con forma de anillo. Toda esta estructura tan característica está rodeada por unos gránulos electrodensos de 150 Å (DG) claramente diferenciados de la ultraestructura nuclear. (23)

Patología nucleolar

clásicamente los patólogos han utilizado cambios en la morfología y número del tamaño de los nucleolos como marcadores de enfermedad. Las anomalías nucleares y el aumento de la transcripción de rDNA se consideran marcadores de varios tipos de cáncer. Además, las mutaciones en los componentes ribosómicos que conducen a la biogénesis de los ribosomas o anomalías nucleolares han sido atribuidas a los trastornos genéticos conocidos colectivamente como trastornos ribosómicos o ribosomopatías. Aunque se han considerado alteraciones en la biogénesis de los ribosomas para comprender la fisiopatología de estas enfermedades, actualmente se están investigando alteraciones en las funciones nucleolares "no ribosómicas" como causas de estas enfermedades. Estos estudios podrían ser el origen de nuevas terapias y tratamientos en el futuro.

Aunque las principales enfermedades causadas por alteración nucleolar son las ribosomopatías y el cancer, en esta revisión se hará hincapié en el estudio de las alteraciones nucleolares que se dan en enfermedades neurodegenerativas como es el alzheimer, aun así se citarán y comentarán brevemente los procesos de ribosomopatías y cáncer causados por la patología nucleolar.(10)

Ribosomopatías

Las ribosomopatías son enfermedades caracterizadas principalmente por la presencia de mutaciones o deleciones genéticas asociadas con la biogénesis de los ribosomas. Estos cambios pueden ocurrir de la siguiente manera:(24)

- 1) En genes que codifiquen riboproteínas, entre ellas se encuentran la anemia de Diamond Blackfan y el síndrome 5q que son congénita y somáticas respectivamente.(10,24,25)
- 2) En genes asociados con la síntesis y modificación del rRNA, como es el caso del síndrome de Treachers-Collins, la disqueratosis congénita y la hipoplasia pilocartilaginosa, siendo las tres congénitas.(10,24,25)
- 3) En genes que codifican proteínas asociadas con los ribosomas pero que no son riboproteínas, este es el caso del síndrome de Shwachman-Diamond, la cual es una ribosomopatía congénita.(10,24,25). Figura 12.

Curiosamente, aunque son enfermedades que afectan a elementos de la biología celular sistémica, en la mayoría de las enfermedades ribosómicas, la afectación fenotípica de la enfermedad favorece a un determinado tipo de tejido en cada caso. Una explicación para esto podría ser la diferente dependencia que tiene cada tipo de tejido por sus ribosomas.(10)

A modo de ejemplo la pérdida de un gen que codifique para el alelo de una riboproteína puede reducir su expresión por debajo de un nivel crítico que haría imposible mantener la biogénesis ribosomal exigida por un tipo de célula con un metabolismo más activo, pero no por otro tipo de célula que no tenga ese nivel de metabolismo tan elevado, lo que desembocaría en fenotipo y patologías distintas. En definitiva, las ribosomopatías constituyen un grupo de enfermedades “raras” para las que en la mayoría de los casos solo existen tratamientos paliativos y no curativos.(10)

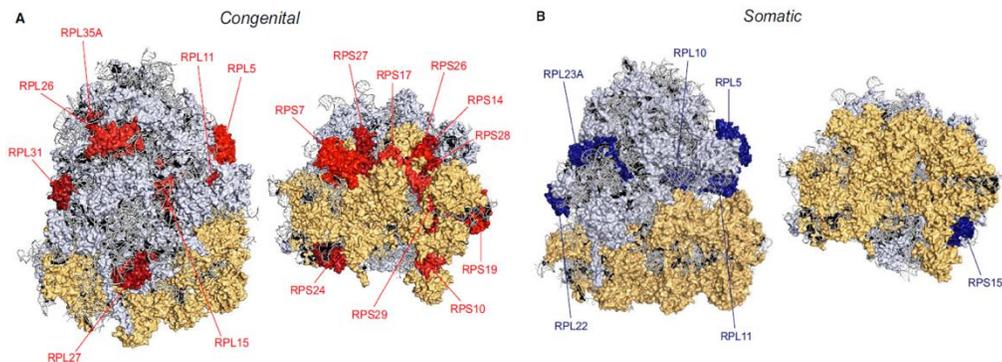


Figura 12. Estas imágenes han sido generadas utilizando el programa PyMOL. En ellas está representado un modelo estructural del ribosoma 80S humano. En el que se puede ver la subunidad 60S grande marcada en amarillo, la subunidad 40S pequeña marcada en azul claro y el RNA ribosómico marcado en gris.

En la imagen (a) Se marcan en rojo las riboproteínas con defectos congénitos.

En la imagen (b) se marcan en azul las riboproteínas con mutaciones y/o deleciones somáticas.(25)

Cáncer

Existe una correlación directa conocida entre la hiperactivación de la biogénesis ribosómica y una actividad nucleolar anómala y el cancer. Aunque todavía no está claro cuál es el mecanismo exacto por el que una elevada biogénesis ribosomal contribuye al desarrollo de cáncer. (26)

Las células cancerígenas son altamente proliferativas y como tal requieren de una maquinaria ribosomal que esté activa en la misma medida, con un alto número de ribosomas y con un alto nivel de funcionamiento de los mismos. Estos requerimientos los consiguen a través de la activación de oncogenes o a través de la pérdida del funcionamiento de las vías de señalización antioncogénicas, que terminan por aumentar el rendimiento ribosomal.(26)

Una de las razones por las que las células cancerígenas desarrollan mecanismos para favorecer la biogénesis ribosomal y la formación nucleolar es para suprimir la vía NSP que como se ha explicado en la parte de funciones nucleolares, es la vía encargada de detectar alteraciones celulares y activar a la proteína p53 que actúa deteniendo el ciclo celular o induciendo la muerte de la célula por apoptosis. Con la hiperactivación de la biogénesis ribosomal se inhiben tanto esta vía de defensa frente al cáncer como las vías independientes de la p53. De hecho, este conocido

mecanismo es usado como diana terapéutica para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (17) a través de la utilización de moléculas que inhiben la transcripción de la Pol I y la síntesis de rRNA.(26)

Enfermedades neurodegenerativas

Los cambios en el nucleolo son comunes en multitud de trastornos neurológicos relacionados con la edad, entre ellos destacan la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer. Existe evidencia de que la desregulación transcripcional del rDNA, la disfunción nucleolar y la inducción de p53NSP favorecen el desarrollo de estas enfermedades, así como el proceso normal de envejecimiento. La posible contribución de otras funciones atípicas del nucleolo en las enfermedades neurodegenerativas sigue siendo desconocida, pero merece llevar a cabo más investigación. En esta revisión, se prestará especial atención a los procesos moleculares nucleolares que contribuyen al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. (10) La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad crónica progresiva caracterizada por alteraciones de la proteína tau (del inglés *tubulin associated unit*), acúmulo placas β -amiloide, muerte celular neuronal y respuesta inflamatoria alterada. (10)

Fisiopatología nucleolar en el Alzheimer

La proteína tau

La proteína tau se puede encontrar en tanto células neuronales como no neuronales, principalmente en el núcleo y nucleolo de células sanas. Aunque clásicamente se le ha asignado la función de aportar estabilidad a los microtúbulos, datos obtenidos de diversos estudios realizados con tejido cerebral humano y de ratones sugiere que esta proteína puede ser esencial para la defensa genómica frente al estrés celular nuclear. Además, la relación tan intrincada que tiene la proteína tau con el DNA y otras proteínas nucleares indica fuertemente que puede tener múltiples roles adicionales en el núcleo y nucleolo.(27,28). Figura 13.

En la enfermedad de Alzheimer la proteína tau forma conglomerados patológicos de sí misma con la ubiquitina debido a un proceso de hiperfosforilación, estos conglomerados se agregan en el núcleo, nucleolo y también en el citoplasma celular. Esto produce destrucción de los neurofilamentos y microtúbulos lo que se traduce en daño y posterior muerte celular.(27,28)

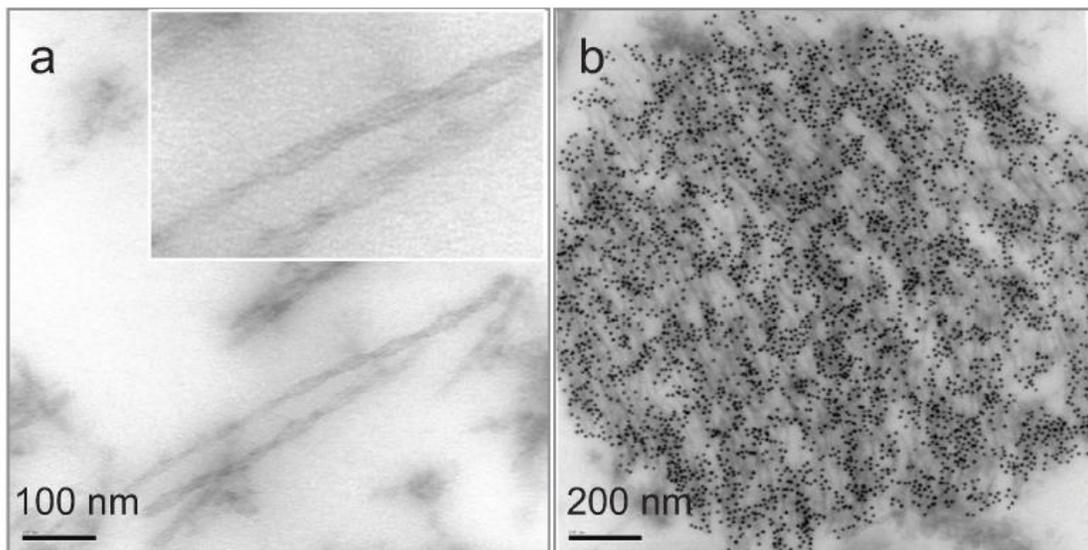


Figura 13. Microfotografía de una muestra de tejido encefálico de un paciente con enfermedad de Alzheimer. En esta imagen de microscopía electrónica de transmisión observamos en la imagen (a) la gran concentración de filamentos helicoidales en este paciente y que estos filamentos contienen la proteína tau ya que en la imagen (b) se ha hecho un inmunomarcaje específico con el anticuerpo anti-tau y partículas de oro coloidal que le dan esa forma tan regular y característica.(27)

La proteína tau se localiza en el nucleolo, más concretamente en el DFC y en los ribosomas. Y aunque no tenga un rol directo en el proceso de ensamblaje nucleolar sí que se cree que interviene en la transcripción del rDNA y en el procesado del rRNA. La síntesis de los ribosomas comienza en el nucleolo y lleva a cabo su maduración final en el citoplasma, por tanto, su localización ubicua por estos compartimentos probablemente esté indicando que tiene una función en el proceso de maduración ribosomal.(27)

Además, tau puede tener como función la heterocromatinización del rDNA. La mayor parte del rDNA se mantienen en un estado transcripcionalmente inactivo mediante mecanismos de silenciamiento epigenéticos. Los genes de rRNA silenciados forman la heterocromatina perinucleolar que se sitúa adyacente al nucleolo. Tau interactúa con la heterocromatina perinucleolar y la región pericentromérica α -satellite del DNA. De esta forma se ha propuesto que tau puede servir como nexo entre las repeticiones de rDNA y la heterocromatina pericentromérica, sirviendo así como un mecanismo de silenciamiento de genes de rRNA.(27) por lo que una proteína tau disfuncionante favorecería la alteración de todos estos procesos inestabilizando el nucleolo y la producción de ribosomas.

Silenciamiento epigenético por hipermetilación del promotor de rDNA

El ribosoma es crítico para los procesos celulares y su afectación es uno de los principales factores que intervienen en el desarrollo y progresión de la enfermedad de Alzheimer. Estudios recientes han relacionado la enfermedad de Alzheimer con desregulación de la biogénesis ribosomal y la disfunción nucleolar. Los defectos ribosómicos se pueden ver tanto en las etapas tempranas como tardías de la enfermedad de Alzheimer. La transcripción de genes de rRNA (rDNA) es fundamental para la biogénesis de los ribosomas, este es un proceso regulado por el silenciamiento epigenético, como es la metilación del promotor CpG. Lo que conlleva una disminución de la producción de rRNA. Esto se puede ver desde las primeras etapas de la enfermedad.(29,30).

Con el objetivo de dilucidar este proceso en un estudio del 2011 de Pietrzak y cols analizaron muestras de tejido cerebral de pacientes con deterioro cognitivo leve, enfermedad de Alzheimer y de un grupo control usando el método de secuenciación por bisulfito que puede verse en la figura 14. (29)

Este estudio tuvo como resultado que el promotor de rDNA se encontraba hipermetilado, y consecuentemente silenciado, en las muestras de corteza cerebral de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y en pacientes con deterioro cognitivo leve respecto al grupo control. En las muestras de tejido de corteza parietal se encontró una mayor hipermetilación en las muestras de deterioro cognitivo leve que en las de enfermedad de Alzheimer. Además, en las muestras cerebrales de paciente con enfermedad de Alzheimer se observó depleción ribosomal y disminución del volumen nuclear de las neuronas hipocampales.(29)

Por tanto, la hipermetilación del promotor de rDNA se puede asociar a una disminución de la biogénesis ribosomal y en consecuencia a una reducción de la síntesis proteica. Se sugiere que puede utilizarse la hipermetilación del promotor de rDNA como método diagnóstico precoz de la enfermedad.(29)

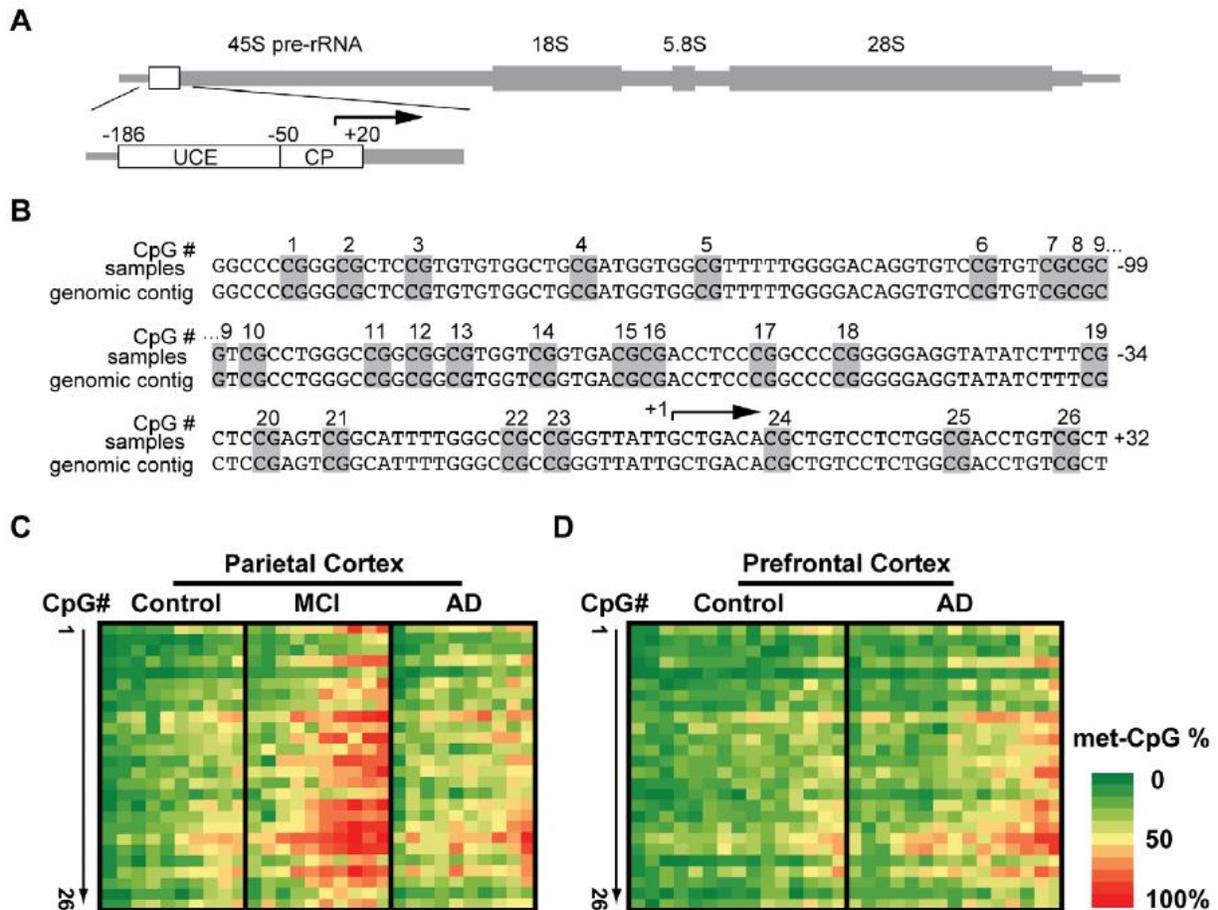


Figura 14. Imagen obtenida a través del mapeado de la citosina metilada de la región promotora del rDNA. Imagen (a). Unidad genética de rDNA. Se marca con un cuadro la localización de la región promotora que fue seleccionada para la secuenciación por bisulfito. Esta región analizada incluye un Upstream control element (UCE) y el promotor del núcleo (CP) que contiene 26 lugares CpG sensibles a la metilación que son críticos para la regulación epigenética de la transcripción nucleolar. En la imagen (b) se puede apreciar la secuencia de nucleótidos del promotor de rDNA. Los números a la derecha indican posiciones relativas al lugar de inicio de la transcripción, que se corresponde con la posición +1 (flecha). Los dinucleótidos CpG potencialmente metilados están numerados y marcados en gris. En la imagen (c) se puede apreciar el análisis de la secuenciación por bisulfito de las muestras de corteza parietal de los grupos control, deterioro cognitivo leve (MCI) y enfermedad de Alzheimer (AD) (n=10 para cada grupo). En la imagen (d) se puede observar el análisis de la secuenciación por bisulfito de las muestras de corteza prefrontal de los grupos control y enfermedad de Alzheimer (AD) (n=15 para cada grupo). En las imágenes (c-d), cada columna representa un individuo. Las filas representan cada uno de los 26 lugares CpG potencialmente sensibles a la metilación del promotor de rDNA en orientación 5'-3'(29)

Oxidación del RNA y disfunción ribosomal

Hay cambios marcados en la función ribosomal en la enfermedad de Alzheimer, muchos de los cuales parecen deberse a los altos niveles de oxidación que muestra el ARN de los pacientes con la enfermedad. La oxidación del ARN conduce a roturas de cadenas y modificaciones de pares de bases que desembocan en una disfunción ribosomal. Se han reportado altos niveles de ARNr oxidado en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer, siendo esta presumiblemente

una de las razones de la reducción de la síntesis de proteínas. El ARN es particularmente vulnerable al daño causado por la exposición a los radicales libres. Esto ha sido confirmado en otro estudio que encontró niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y hierro en las neuronas de pacientes con Alzheimer. (6) Se ha sugerido que el ARNr dentro del citoplasma puede ser sensible a la unión del hierro oxidante reactivo, favoreciendo la vulnerabilidad neuronal y contribuyendo a la neurodegeneración. (30,31)

Expresión reducida de PARP-1 nucleolar

La memoria a largo plazo requiere el mantenimiento de ciertos mecanismos moleculares intactos, como son la integridad de nucleolos y nuevos rRNA, que luego son regulados por PARP-1 a través de modificaciones epigenéticas. Se supone que PARP-1 juega un papel particularmente importante en el mantenimiento de la memoria a largo plazo. Se ha demostrado que los déficits crónicos en la función nucleolar afectan la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. Además, también se ha demostrado que PARP-1 regula múltiples dominios de la función nucleolar, como el mantenimiento de la estructura de la cromatina del ADNr, la edición de los precursores del ARNr y la biogénesis de los ribosomas en el nucleolo. (32)

En este estudio se demuestra que hay una pérdida de PARP-1 en las neuronas hipocampales de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, lo cual sugiere que la función nucleolar de PARP-1 se ve comprometida, favoreciéndose así la pérdida de la memoria a largo plazo. Figura 15.

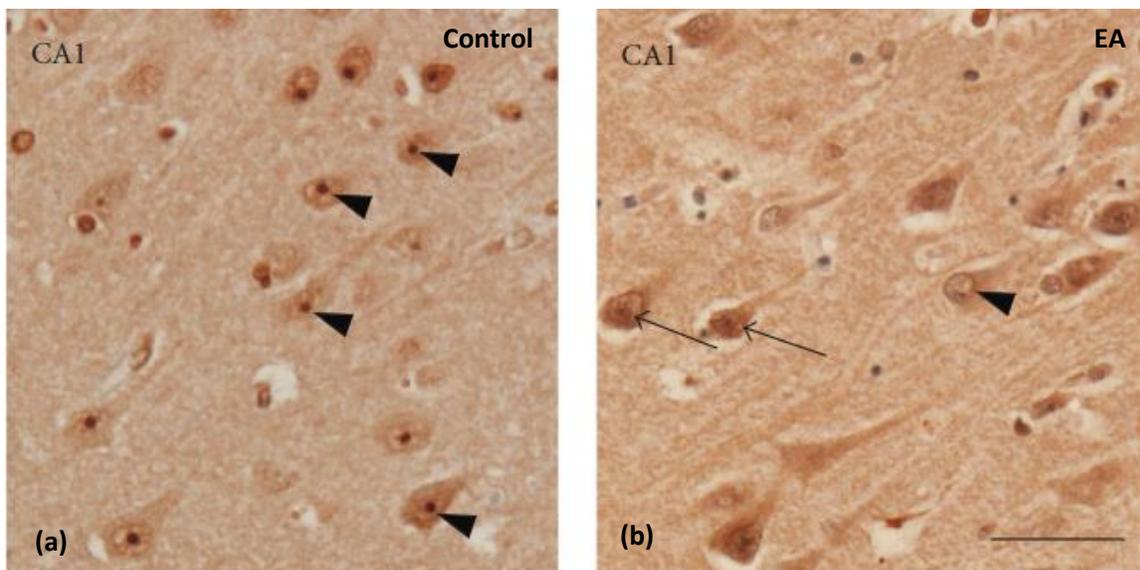


Figura 15. La proteína nucleolar PARP-1 muestra una inmunoreactividad entre disminuida y ausente en el Alzheimer al compararla con grupos control. Las imágenes (a) y (b) se han obtenido tiñendo con diaminobenzidina (DAB) células piramidales de hipocampo humanas. En la imagen (a) se aprecia un nucleolo prominente cargado de proteína PARP-1 señalado con flechas triangulares negras. En la imagen (b) se puede ver como el marcaje de la proteína PARP-1 en nucleolos es entre difusa y ausente.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA de ahora en adelante) es la causa más común de demencia, representa una preocupación creciente desde el punto de vista de la salud pública con grandes implicaciones para los individuos y la sociedad.(33)

Epidemiología

La demencia se describe como el déficit cognitivo adquirido y progresivo con impacto suficiente como para afectar a las actividades de la vida diaria. La demencia constituye una de las principales causas de dependencia, invalidez y mortalidad. Se estima que ahora mismo 44 millones de personas viven con demencia en el mundo y se prevé que estas cifras se tripliquen para 2050 a medida que la población envejece. En cuanto al coste económico excede los 600.000.000.000 \$ estadounidenses anuales.(33,34)

Recientes estudios sugieren que la incidencia de demencia se podría estar reduciendo en los países occidentales, principalmente en hombres. Aunque no está claro cuál es la causa de esta tendencia a la baja de la demencia, se cree que puede ser por el mejor manejo del riesgo cardiovascular que está llevando a cabo la población. En los próximos años se prevé un aumento significativo de la prevalencia de la demencia en países con ingresos medios-bajos partiendo de que ya están mostrando un aumento de incidencia de enfermedad cardiovascular, diabetes e hipertensión.(35) EA es la principal causa de demencia, siendo la responsable de entre el 50-70% de las mismas. Se da en edades avanzadas doblando su prevalencia cada 5 años a partir de los 65.(33,34)

Etiología

Aunque la mayoría de los casos de EA se dan de manera esporádica, si que se han detectado mutaciones en tres genes:

Proteína precursora amiloide (APP)

Presenilina 1 (PSEN1)

Presenilina 2 (PSEN 2)

Estas mutaciones son causa de una forma rara de Alzheimer familiar cuyos síntomas se desarrollan antes que en la forma esporádica de AD, típicamente entre los 30 y 50 años.(33)

La forma típica de Alzheimer probablemente se dé por un acúmulo de causas genéticas y ambientales. Actualmente se cree que el 70% del riesgo de padecer EA es atribuible a factores genéticos. Figura 16. Siendo el gen APOE el mayor factor de riesgo genético para padecer la enfermedad. Además, se han encontrado otros 20 factores de riesgo genéticos que implican la

alteración de vías de señalización que controlan distintos procesos como son: inflamación, el metabolismo del colesterol y las vías de reciclado de las vesículas endosómicas. En concreto, se cree que la vía que controla la activación de las células de la microglía en respuesta al acúmulo de amiloide cumple un rol crítico en la patogenia del Alzheimer. (33,36)

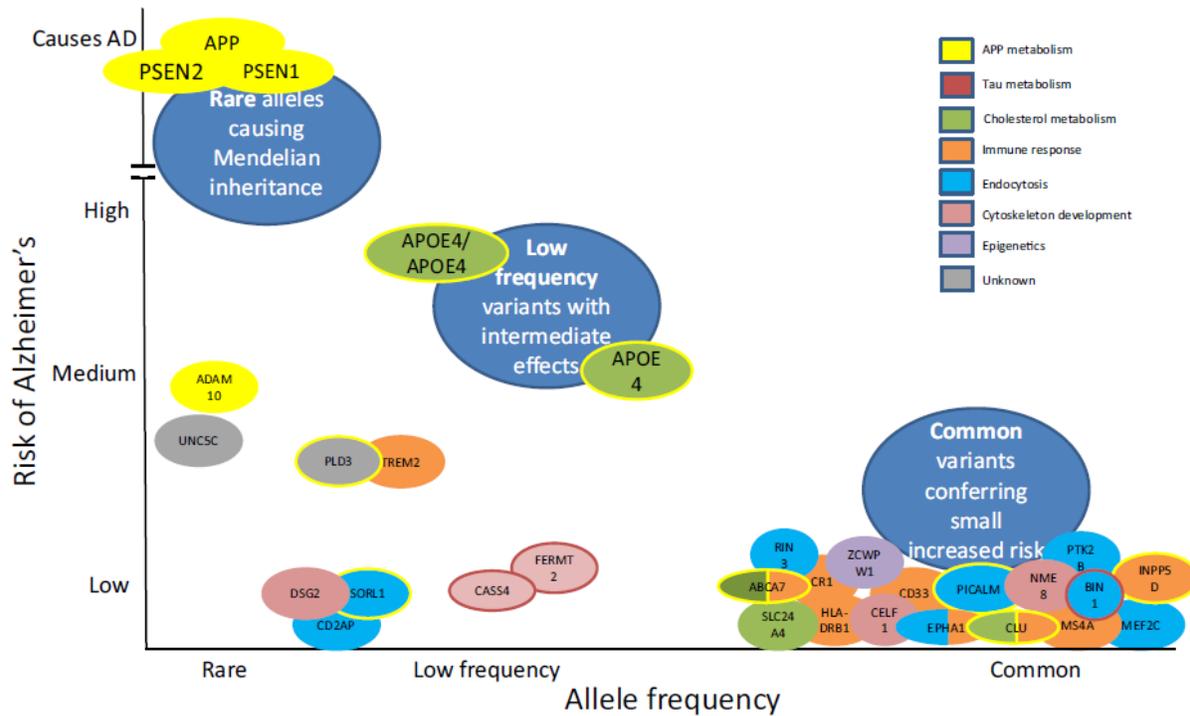


Figura 16. En la imagen se puede ver la relación entre la frecuencia de los distintos genes y el riesgo que suponen cada uno para el desarrollo de Alzheimer. Los colores de los alelos se corresponden con la función supuesta para cada uno de los genes que codifican. Hay algunos con dos colores, esto representa que están implicados en más de una función. Los genes rodeados en amarillo se cree que influyen en el metabolismo del precursor de la proteína amiloide. Los genes rodeados en rojo se cree que influyen en el metabolismo de tau. (37)

Existe evidencia epidemiológica que respalda que el nivel educativo y el ejercicio físico podrían ser factores protectores frente a la EA. Mientras que como se ha mencionado antes los factores de riesgo cardiovasculares en la mediana edad como la hipertensión y la diabetes actúan como factores de riesgo para el Alzheimer. Hasta hace poco se consideraba que la obesidad también era un factor de riesgo para el desarrollo de EA, pero esto se ha puesto en entredicho. (36,38)

Fisiopatología

Los elementos más determinantes del Alzheimer son los ovillos neurofibrilares de proteína tau y las placas amiloides. Aunque también se ven otros fenómenos patológicos asociados como las neuritis distróficas, los hilos de neuropilo, astrogliosis, activación de la microglía y angiopatía

amiloidea. La sumación de los efectos de todos estos procesos desemboca en la neurodegeneración y atrofia neuronal.(33,39). Figura 17.

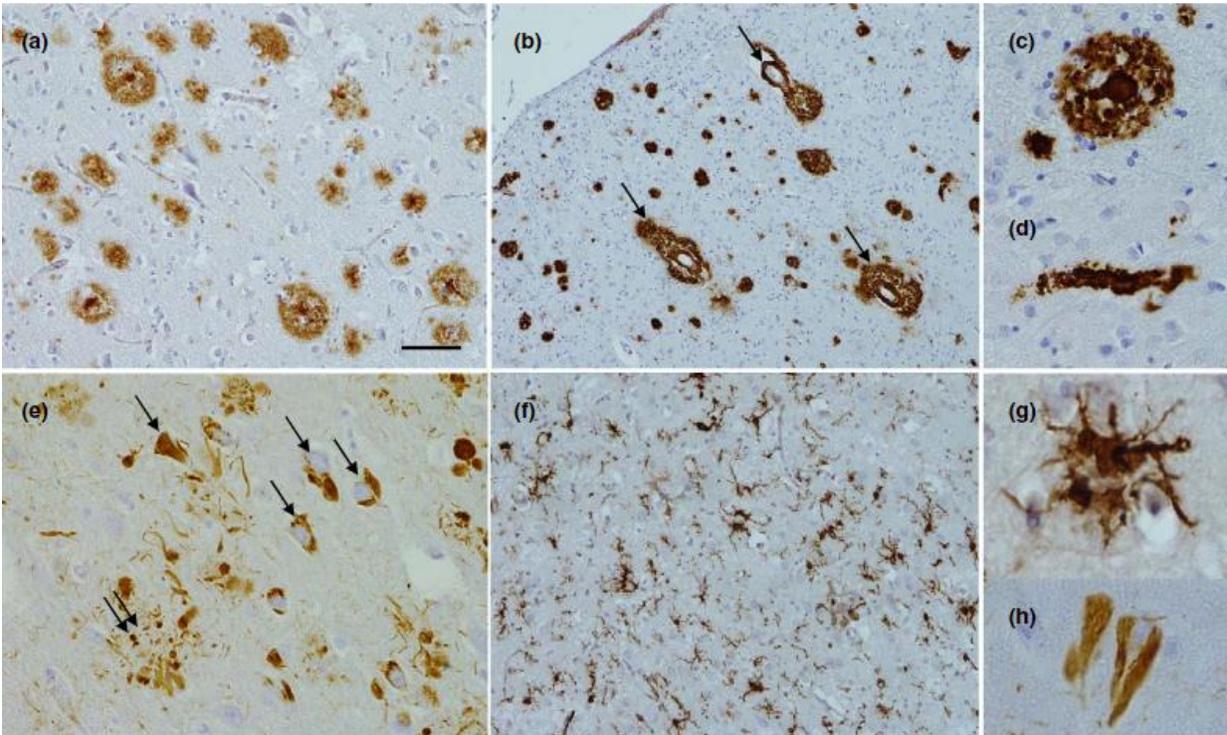


Figura 17. Imágenes de los distintos procesos patológicos de la enfermedad de Alzheimer obtenidas por técnicas inmunohistoquímicas. En la imagen (a) se observan placas de proteína A β en una muestra de corteza frontal. En la imagen (b) se dispone la afectación vascular cerebral por acumulos de A β . En la imagen (c) se puede ver una placa de proteína A β con un núcleo central. En la imagen (d) se puede ver acumulos de A β en el interior de capilares. En la imagen (e) se pueden apreciar placas neuríticas (marcadas por la doble flecha) y ovillos neurofibrilares (marcados con las flechas individuales) que se pueden ver con mayor detalle en la imagen (h) a más aumentos. En la imagen (f) se puede apreciar un infiltrado evidente de células de microglía que se pueden ver en la imagen (g) a más aumentos. (33)

Las placas amiloideas son acumulos extracelulares de proteína A β con un plegamiento patológico con 40 o 42 aminoácidos (A β 40 and A β 42), siendo ambos productos del metabolismo de la proteína precursora amiloide (APP). Esta proteína amiloide comienza acumulándose en el isocortex o corteza más externa de manera difusa y no es hasta estadios avanzados que pasa a afectar a estructuras subcorticales.(33). Figura 17.

Los ovillos neurofibrilares fueron descritos estructuralmente en el capítulo de patología nucleolar de la proteína tau, en este capítulo se describirán desde el punto de vista fisiopatológico. Los ovillos neurofibrilares están formados principalmente por filamentos helicoidales apareados de proteína tau sometida a un proceso de hiperfosforilación. Comienza afectando al allocortex o corteza más interna del lóbulo temporal, más concretamente al hipocampo y área entorrinal para pasar posteriormente a afectar las zonas de corteza asociativa del isocortex. Por lo general se respetan las áreas funcionales motoras, sensoriales y visuales.(33,40). Figura 17.

Normalmente los procesos de pérdida neuronal y sináptica se correlacionan con el de acúmulo progresivo de ovillos neurofibrilares mientras que la patogénesis por proteína β amiloide alcanza una fase de meseta estable al principio de los síntomas. (33)

Patogénesis

La teoría más aceptada es la hipótesis amiloidea, la cual indica que las causas de la enfermedad son el acúmulo de las proteínas $A\beta$ patológicas producidas por la escisión de la APP por las enzimas β - y γ - secretasas. Además de una disregulación de los procesos de síntesis y eliminación de la $A\beta$. (33,36)

En cuanto a la formación de ovillos neurofibrilares y la consecuente disfunción neuronal y neurodegeneración se cree que es mediada por la activación de la vía inflamatoria por hiperactivación de la microglía, ambos efectos de un primer acúmulo de $A\beta$ patológica.(33) Figura 18.

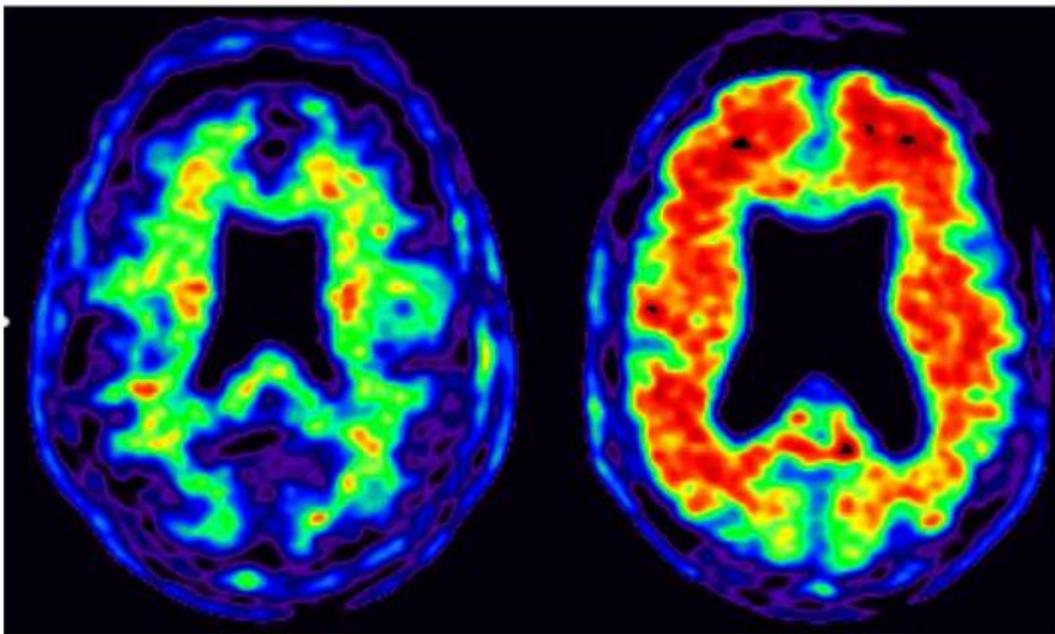


Figura 18. Imagen obtenida por tomografía por emisión de positrones. En la imagen se puede observar a la izquierda la captación fisiológica del cerebro de una persona sana. A la derecha se puede ver la captación patológica de un paciente con Alzheimer. El código de colores de traduce de la siguiente manera: colores fríos (azul-morado) indican poca acumulación de amiloide. Colores más calientes (rojo-amarillo) indican acumulación amiloidea aumentada. (33)

Manifestaciones clínicas

La forma de presentación más común de EA es en un paciente de edad avanzada que consulta por problemas de memoria que conforme pasa el tiempo se van agravando. A medida que progresa la enfermedad suelen aparecer dificultades para desenvolverse en el medio conocido al mismo tiempo que aparece dificultad para realizar tareas que requieran múltiples procesos simultáneos, como cocinar, por ejemplo.(33,41)

Posteriormente, la progresión de los cambios cognitivos se vuelve cada vez más determinante hasta interferir con las actividades básicas de la vida diaria. En este punto, el paciente puede ser diagnosticado con demencia por enfermedad de Alzheimer. La dependencia gradual es la norma, y eventualmente pueden aparecer cambios de comportamiento, movilidad reducida, alucinaciones y convulsiones. La muerte ocurre de media pasados 8,5 años de la presentación.(33,41)

También se han reconocido varios síndromes no relacionados con la memoria, estos se observan especialmente en pacientes que debutan con la enfermedad más jóvenes. Entre estos síndromes se incluyen la atrofia cortical posterior, la afasia logopénica y variantes de EA del lóbulo frontal.(33,41)

En la atrofia cortical posterior, las placas de amiloide están ampliamente distribuidas de forma difusa, mientras que la afectación por proteína tau y la atrofia neuronal se concentran en el lóbulo parietooccipital, como se puede observar en la figura 19. Además, los pacientes suelen presentar problemas de percepción visoespacial y visual, así como deficiencias motoras como dispraxia con la memoria relativamente bien conservada. (33,41)

En la afasia logopénica los pacientes muestran anomia y pausas largas durante el discurso para buscar palabras además de alteraciones en la memoria de trabajo.(33,41)

La EA frontal es rara y tiende a tener afectación de la memoria a una edad mucho más temprana. Existe una variante caracterizada por mutaciones en PSEN1 que se asocia a manifestaciones clínicas como mioclonías prominentes, convulsiones y paraparesia espástica.(33,41)

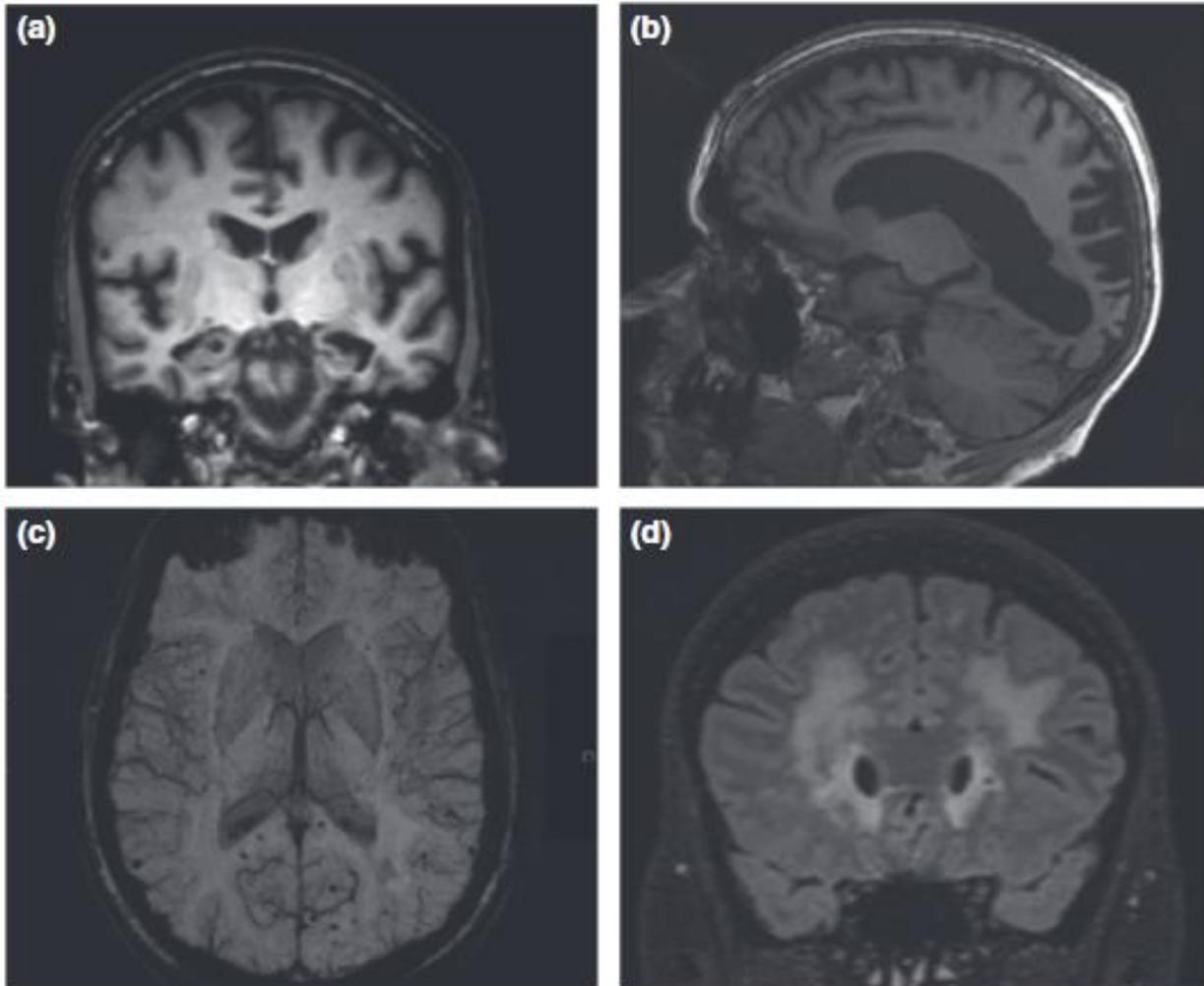


Figura 19. Imágenes obtenidas por RMN. En la imagen (a) se muestra un plano coronal de una secuencia T1 en la que se puede apreciar atrofia hipocámpal. En la imagen (b) se observa un plano sagital en la secuencia T1. En él se puede apreciar un caso de atrofia parieto-occipital posterior. En la imagen (c) se pueden observar microhemorragias predominantemente en el lóbulo occipital, típicas de la angiopatía amiloidea. En la imagen (d) se puede ver un plano coronal con secuencia FLAIR. En él se puede apreciar hipercaptación de la materia blanca a nivel subcortical y periventricular. (33)

Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos han evolucionado para permitir que el diagnóstico sea temprano y con mayor precisión. Todo esto ha sido gracias al descubrimiento de que los cambios histopatológicos ocurren años antes del comienzo de la clínica sumado a la llegada de los biomarcadores de β -amiloide y tau patológicos y a las medidas de atrofia cortical a través del uso de RMN. (33)

Los criterios diagnósticos más recientes son del instituto nacional del envejecimiento (NIA) (Tabla 1) y del grupo de trabajo internacional (IWG-2) que han añadido fases preclínicas a la EA. En esta fase preclínica lo que ocurre es que hay marcadores positivos, pero con ausencia de síntomas. Para el diagnóstico definitivo de EA hace falta una confirmación anatomopatológica. Los criterios

de NIA permiten dilucidar si la demencia o el deterioro cognitivo leve se debe a una enfermedad de Alzheimer subyacente con una probabilidad alta, intermedia o baja en función del grado de cumplimiento de los criterios diagnósticos.(33,42). Figura 20.

	NIA-AA criteria
Asymptomatic individuals	
Evidence of Ab pathology only	Stage 1 preclinical AD
Evidence of tau pathology only	-
Evidence of both Ab and tau pathology	Stage 2 preclinical AD Stage 3 preclinical AD (when additional subtle cognitive changes exist which do not meet criteria for mild cognitive impairment)
Symptomatic individuals	
Symptoms that do not meet criteria for dementia	Mild cognitive impairment due to AD <ul style="list-style-type: none"> • High likelihood (requires positive Ab and neuronal injury biomarkers) • Intermediate likelihood (requires either positive Ab or neuronal injury biomarker, where other biomarker not tested or unavailable) • Unlikely (negative Ab and neuronal injury biomarkers) • Uninformative (biomarkers ambiguous or conflict with each other)
Symptoms that meet criteria for dementia (both typical and atypical phenotypes)	Dementia due to AD <ul style="list-style-type: none"> • Probable (no biomarker evidence required, based on clinical picture) • Possible (no biomarker evidence required, based on clinical picture) • Probable or possible with evidence of AD pathophysiological process (Ab and/or neuronal injury biomarker evidence – high likelihood, intermediate likelihood, unlikely and uninformative)

Figura 20. En la tabla se pueden apreciar los distintos criterios diagnósticos para la EA establecidos por el instituto nacional del envejecimiento.(43) (<https://www.nia.nih.gov>)

Tratamiento

Los tratamientos modificadores de la enfermedad son aquellos que cambian la patogenia causante de la enfermedad. A día de hoy solo se dispone de un fármaco con estas características aprobado para su uso en España, el Aducanumab. (44)

El Aducanumab es un anticuerpo monoclonal humano, más concretamente una inmunoglobulina gamma 1 capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Funciona uniéndose a los aminoácidos 3-7 del epítipo lineal de Aβ. Este fármaco tiene capacidad para interactuar con el dominio N-terminal de la Aβ y tiene afinidad diferencial para la forma monomérica, oligomérica y fibrilar de Aβ. Con especial afinidad para agregados fibrilares de amiloide lo que lleva a la reducción de la placa amiloidea evitando su depósito en el tejido neuronal mejorando así la clínica por depósito amiloide. (44)

Además del tratamiento modificador de la enfermedad se debe hacer un seguimiento y aproximación personalizados a las circunstancias de cada paciente, incluyéndose en este un enfoque multidisciplinar en el que intervengan médicos, enfermeras y servicios sociales. Una consideración al diagnóstico de EA es si se puede seguir conduciendo. Mientras que los síntomas

sean leves y el paciente no vea comprometida su función ejecutiva se podrá seguir conduciendo. También se deberá evaluar progresivamente si el paciente es capaz de seguir haciendo las tareas del hogar y gestionar sus finanzas. (33)

Hay tratamiento sintomático, este tratamiento está basado en la utilización de inhibidores de la acetilcolinesterasa. Su funcionamiento se da a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa, una enzima que actúa liberando las moléculas de acetilcolina de su lugar de acción en la sinapsis. Esta inhibición potencia el efecto de la acetilcolina favoreciendo de este modo la sinapsis y el mejor funcionamiento cognitivo en general. Estos inhibidores de la acetilcolina han demostrado efectos beneficiosos en pacientes con EA de entre media y moderada severidad. Sin embargo, el beneficio clínico observado es leve.(33)

Existen otras alternativas para el tratamiento sintomático como la Memantina, indicada en la EA moderada. La memantina es una antagonista del receptor N-metil-D-aspartato. Actúa evitando la neurotoxicidad causada por el glutamato sin interferir en sus funciones normales fisiológicas. La Memantina ha mostrado poco beneficio clínico pero una mejoría de todos modos de los procesos cognitivos y menor pérdida funcional.(33)

Se han hecho metaanálisis para evaluar la terapia dual que incluye un inhibidor de la acetilcolinesterasa, (más concretamente Donezepilo) y la Memantina y se concluyó esta terapia combinada mejoraba los síntomas relacionados con la alteración del comportamiento. Aunque no presentaba una gran evidencia de beneficio respecto a la monoterapia en cuanto a los síntomas cognitivos.(33)

Se debe llevar a cabo el tratamiento de la patología psiquiátrica concomitante. Es común que lo pacientes con EA padezcan depresión y ansiedad. Aunque hay evidencia limitada en cuanto al tratamiento para estas condiciones, sí que se ha visto que el tratamiento psicológico mejora los síntomas depresivos y de ansiedad. Hay que destacar que en el tratamiento farmacológico de la depresión se debe evitar el uso de antidepresivos tricíclicos, ya que se ha visto que empeora la confusión. También es importante comentar que se debe tener en cuenta la salud mental de los cuidadores del paciente que suelen verse sobrecargados por las tareas de cuidado.(33)

En fases más avanzadas de la enfermedad pueden aparecer síntomas psiquiátricos como agitación, agresividad y psicosis. La evidencia indica que es mejor el uso de antipsicóticos atípicos, pero aun así no hay tratamientos establecidos en el protocolo para estas alteraciones. Además, estos fármacos tienen efectos secundarios que pueden afectar especialmente a personas de edad avanzada como riesgo aumentado de infección o ictus, por lo que deben ser evitados.(33)

Discusión y conclusiones

El nucleolo es una estructura multifuncional de naturaleza dinámica cuya composición varía con el cambio del medio celular. En los últimos años se han descrito diferentes funciones nucleolares previamente desconocidas que requieren de más estudio para comprenderlas en su totalidad. Además, debido a la tasa acelerada de descubrimiento y progreso en la investigación de las funciones nucleolares, es probable que incluso nuevas funciones se descubran a lo largo de los próximos años.

La patología molecular a nivel nucleolar explica el fenotipo clínico de diversas enfermedades, como las ribosomopatías, el cáncer y algunas enfermedades neurodegenerativas. En cuanto a las enfermedades neurodegenerativas, el estudio de la patología nucleolar en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer cobra especial importancia debido a que hasta hace poco tiempo no existían tratamientos modificadores de la enfermedad.

Actualmente, el nucleolo es objeto de estudio activo debido a su uso potencial como marcador diagnóstico y diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades que tienen al nucleolo como base fundamental.

Objetivos y metodología

Este trabajo se basa en una revisión bibliográfica cuyo objetivo principal es conocer la relevancia biológica del nucleolo para así entender su fisiopatología general y especialmente en la enfermedad del Alzheimer.

Para la realización de esta revisión, se ha hecho una búsqueda informática de revisiones y artículos científicos revisados por pares (*peer-review*) consultados en distintas bases de datos (PubMed, Google Académico y la *Biodiversity Heritage Library*). En dichas bases de datos se llevó a cabo una búsqueda específica con palabras clave como: *nucleolus*, *nucleolar functions*, *nucleolar pathology*, *nucleolus AND Alzheimer*. Tras recopilar una gran cantidad de artículos, se desearon los *pre-prints* (por no haber sido revisados por pares), trabajos que no estuvieran publicados en inglés, alemán o español. La antigüedad de los artículos fue también un criterio y por eso sólo se han tenido en cuenta aquellos artículos de más de 25 años que siguen vigentes actualmente. Tampoco se consideraron aquellos artículos que no guardaban relación con el tema tratado o no fueron considerados relevantes por el autor de esta revisión.

Bibliografía

1. Montgomery TH. Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus. *Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus*. 1898. 265–582 p.
2. Valentin G. *Repertorium für Anatomie und Physiologie* [Internet]. 4th ed. Berlin: Verlag von Veit und Comp. ; 1839. 1–275 p.
3. Wagner R. Einige bemerkungen und fragen über das keimbläschen (vesicular germinativa). . *Müller's Archiv Anat Physiol Wissenschaft Med* 268. 1835;373–7.
4. Pederson T. The nucleolus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011;3(3):1–15.
5. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. Vol. 1, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2010. p. 415–31.
6. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts PW. *Biología molecular de la célula*. 6º edición. Allie Bochicchio, editor. *Biología molecular de la Célula*. Omega; 2016.
7. Sogo JM, Ness PJ, Widmer RM, Parish RW, Koller T. Psoralen-crosslinking of DNA as a probe for the structure of active nucleolar chromatin. *J Mol Biol*. 1984 Oct 5;178(4):897–919.
8. Hadjiolov AA. *The nucleolus and ribosome biogenesis* /. Wien ; Springer-Verlag; 1985.
9. Pena E, Berciano MT, Fernandez R, Crespo P, Lafarga M. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *Experimental Cell Research*. 2000 Apr 10;256(1):179–91.
10. Núñez Villacís L, Wong MS, Ferguson LL, Hein N, George AJ, Hannan KM. *New Roles for the Nucleolus in Health and Disease*. Vol. 40, *BioEssays*. John Wiley and Sons Inc.; 2018.
11. Casafont I, Bengoechea R, Navascués J, Pena E, Berciano MT, Lafarga M. The giant fibrillar center: A nucleolar structure enriched in upstream binding factor (UBF) that appears in transcriptionally more active sensory ganglia neurons. *Journal of Structural Biology*. 2007 Sep 1;159(3):451–61.
12. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. p. 574–85.
13. McKeown PC, Shaw PJ. Chromatin: Linking structure and function in the nucleolus. *Chromosoma*. 2009;118(1):11–23.
14. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H, et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Current Biology*. 2002 Jan 8;12(1):1–11.
15. Scherl A, Couté Y, Déon C, Callé A, Kindbeiter K, Sanchez JC, et al. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell*. 2002 Nov 1;13(11):4100–9.

16. Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G. The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol 18, Page 1411. 2017 Jul 1;18(7):1411.
17. Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, Hein N, Peck A, Cullinane C, et al. Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell*. 2012 Jul 10;22(1):51–65.
18. Rosete M, Padros MR, Vindrola O. EL NUCLEOLO COMO UN REGULADOR DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR. *MEDICINA (Buenos aires)*. 2007;67:183–94.
19. Blasco MA. LOS TELÓMEROS Y EL ORIGEN DE LA ENFERMEDAD (*). 2016;
20. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. Vol. 21, *Oncogene*. 2002. p. 564–79.
21. Etheridge KT, Banik SSR, Armbruster BN, Zhu Y, Terns RM, Terns MP, et al. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24764–70.
22. Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell*. 2006 Feb;17(2):955–65.
23. Rusu MC, Vrapciu AD, Nicolescu MI, Stoenescu MD, Jianu AM, Lighezan R, et al. Extruded Nucleoli of Human Dental Pulp Cells. *Medicina (Lithuania)*. 2022 Feb 1;58(2).
24. Danilova N, Gazda HT. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Disease Models & Mechanisms*. 2015 Sep 1;8(9):1013.
25. Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, de Keersmaecker K. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Research*. 2020 Feb 20;48(3):1013–28.
26. Woods SJ, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD. The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2015 Jul 1;1849(7):821–9.
27. Maina MB, Al-Hilaly YK, Serpell LC. Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer’s Disease. *Biomolecules*. 2016 Jan 7;6(1):2–20.
28. Federico C, Bruno F, Sturiale V, Grazia D’amico A, Maugeri G, D’agata V, et al. Human nuclear tau and aging. 2021.
29. Pietrzak M, Rempala G, Nelson PT, Zheng JJ, Hetman M. Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer’s disease. *PLoS ONE*. 2011;6(7).
30. Nyhus C, Pihl M, Hyttel P, Hall VJ. Evidence for nucleolar dysfunction in Alzheimer’s disease. *Reviews in the Neurosciences*. 2019;
31. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, et al. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer’s disease. *J Neurosci*. 1999 Mar 15;19(6):1959–64.

32. Zeng J, Libien J, Shaik F, Wolk J, Hernández AI. Nucleolar PARP-1 expression is decreased in Alzheimer's disease: Consequences for epigenetic regulation of rDNA and cognition. *Neural Plasticity*. 2016;2016.
33. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018 Jan 1;25(1):59–70.
34. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Dialogues in Clinical Neuroscience Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Clinical Neuroscience*. 2009;11(2):111–28.
35. Prince M, Albanese E, Pender R, Ferri C, Mazzotti DR, Piovezan RD, et al. World Alzheimer Report 2014 Dementia and Risk Reduction AN ANALYSIS OF PROTECTIVE AND MODIFIABLE FACTORS SUPPORTED BY Dr Maëlenn Guerchet Dr Matthew Prina. 2014.
36. Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 1210. 2022 Feb 11;27(4):1210.
37. Karch CM, Goate AM. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*. 2015 Jan 1;77(1):43–51.
38. Qizilbash N, Gregson J, Johnson ME, Pearce N, Douglas I, Wing K, et al. BMI and risk of dementia in two million people over two decades: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015 Jun 1;3(6):431–6.
39. Maina MB, Al-Hilaly YK, Serpell LC. Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 2016, Vol 6, Page 9. 2016 Jan 7;6(1):9.
40. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 2019 Jul 13;705:183–94.
41. Bird TD. Alzheimer Disease Overview. *GeneReviews*®. 2018 Dec 20.
42. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2018 Apr 1;14(4):535–62.
43. Español | National Institute on Aging [Internet]. Disponible en: <https://www.nia.nih.gov>
44. Behl T, Kaur I, Sehgal A, Singh S, Sharma N, Makeen HA, et al. "Aducanumab" making a comeback in Alzheimer's disease: An old wine in a new bottle. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022 Apr;148:112746.

Agradecimientos

Agradezco a Ana Palanca Cuñado por su inestimable guía, apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo de fin de grado.