

# ACTUALIZACIÓN SOBRE NEURODEGENERACIÓN

Laboratorio de Fisiología de la Conducta  
Febrero-Abril 2005

repeticiones de  
trinucleótidos

sistema motor

médula espinal

Inclusiones  
intracelulares

motoneuronas



Demencia

Corea

SOD1

corteza

parálisis

Ganglios  
basales

huntingtin

# SERIES

I. INTRODUCCIÓN

II. PATOGENIA MOLECULAR

III. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

2da. parte Enf. Huntington y ALS

IV. FUTURO EN PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO  
Y TERAPÉUTICA

## BIBLIOGRAFÍA:

- \* Series Neurodegeneration  
*J. Clinical Investigation* 111, Jan-Mar 2003
- \* Special Section: Brain Disease  
*Science* 302, 31 Oct 2003
- \* Neurodegeneration  
*Nature Medicine* 10, Jul 2004
- \* Genomic Medicine. Mechanisms of Disease  
*NEJM* 348, 3 April 2003
- \* *Encyclopedia Life Sciences* 2000

# III

## ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

2da. parte: HUNTINGTON- ALS

# PROTEÍNAS ANORMALES

**$\beta$ -amiloide**

- Alzheimer

**Tau**

- Alzheimer

- Enfermedad de Pick / Demencia Frontotemporal
- Degeneración Corticobasal
- Parálisis supranuclear progresiva
- Demencia frontotemporal asociada al cromosoma 17 (FTDP-17)

**Synuclein**

- Parkinson

- Multiple system atrophy
- Striatonigral degeneration
- Olivopontocerebellary atrophy
- Shy-Drager syndrome

**Repeticiones**

- **HUNTINGTON**

**Trinucleótidos**

- Ataxias espinocerebelares
- Ataxia de Friedreich

ALZHEIMER      proteinopatias A $\beta$   
tauopatía

PARKINSON      synucleinopatías

HUNTINGTON      repeticiones de  
trinucleótidos

ALS      proteinopatía

# ENFERMEDAD DE HUNTINGTON



- \* **Lectura**
- \* **Historia**
- \* **Epidemiología**
- \* **Clínica**
- \* **Patología**
- \* **Etiopatogenia**
- \* **Modelos animales**
- \* **Futuro**

# \* Lectura



Nancy S. Waxler

# Enfermedad de Huntington

Enfermedad heredada **autosómica dominante** que comienza en la edad madura y progresa hasta la muerte 10 a 15 años después

Caracterizada por **movimientos coreiformes** y **deterioro mental** que lleva a la demencia

Acompañada de atrofia del **cuerpo estriado** y pérdida de ciertas neuronas con disminución de neurotransmisores

## \* Historia

George **Huntington**, en **1872** describió por primera vez la enfermedad en pacientes de Long Island, NY, que su abuelo y su padre médicos también, habían seguido por **generaciones**.

Huntington tenía 22 años de edad cuando hizo esta publicación al año de graduarse en Columbia University !!

\* Algunos investigadores han seguido hacia atrás **líneas de familias** hasta los “infames” juicios del siglo XVII en **Salem** en New England.

Se ha especulado que las mujeres coreicas afligidas de movimientos espásticos y alteraciones mentales incontrolables fueron juzgadas y algunas ejecutadas por considerarlas **BRUJAS!**

# Los juicios de Salem





En 1692, la hija y la sobrina del Rev. Samuel Parris de la aldea de Salem enfermaron. El médico diagnosticó que estaban **embruadas**. Esto terminó en la ejecución y otras formas de muerte de varias decenas de los habitantes de Salem.

# Las brujas de Salem!!



Giles Corey de 80 años fue un granjero próspero a quien las muchachas acusaron de brujería, él no aceptó ir a juicio y fue condenado a morir aplastado!!!



**Historia reciente  
Enf. de  
Huntington**

**“corea” de  
Huntington**

**“mal de San  
Vito”**

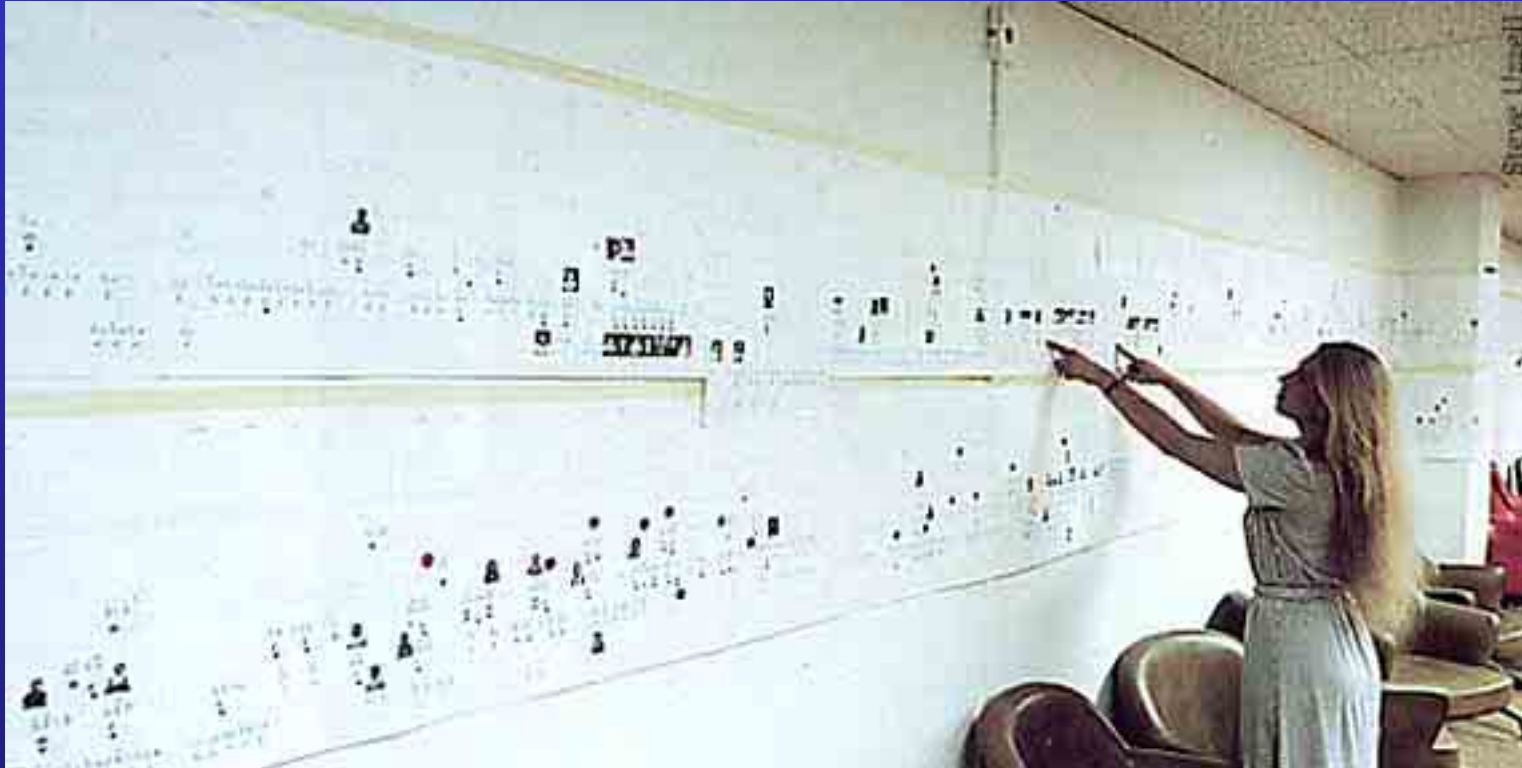


**Nancy S. Wexler**

**Neuropsicología, Columbia University, NY**



**Estudio de familias con Enf. Huntington,  
vecindad del Lago de Maracaibo (Barranquitas)  
a partir de 1979...**



Nancy Wexler examina sobre una pared en NIH una sección del árbol de la familia venezolana con Huntington, que ocupa cerca de 30 metros

# Nancy y los enfermos zulianos...

**The U.S. -Venezuela  
Collaborative Research  
Project.  
Iniciado en los años 80**

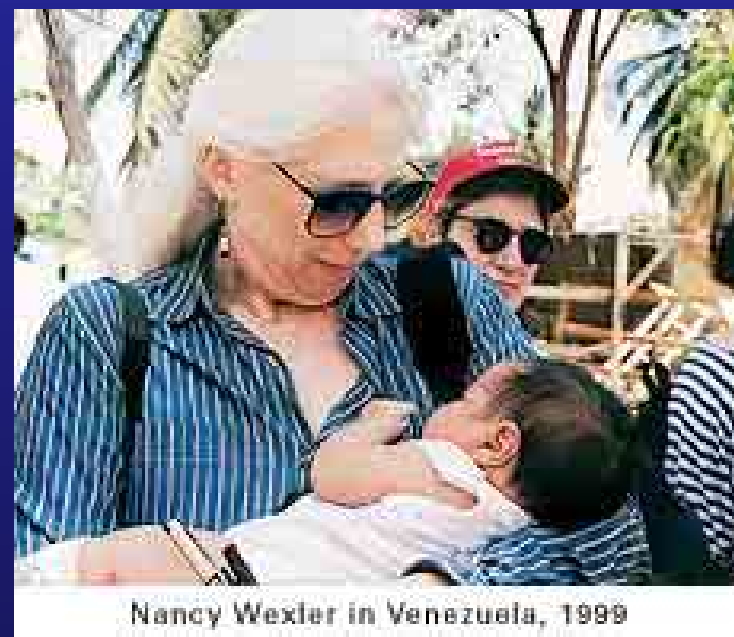
**Nancy Wexler  
James Gusella  
Ernesto Bonilla, LUZ  
Armando Negrette LUZ**





# Nancy Wexler en Venezuela

los últimos 25 años!!!



Nancy Wexler in Venezuela, 1999

**Mama Can't Remember Anymore**  
Care Management of Aging Parents  
and Loved Ones

1996, 1998, 2000, 2004



Dra. Wexler motivada por al **presencia** de Huntington en su familia condujo los estudios que llevaron finalmente a la **identificación** del gen que causa la enfermedad!!

# **Historia en Huntington a partir de los años 80**

**Proyecto US. Venezuela fundado por Nancy Waxler (Participación de científicos americanos, venezolanos Harvard-Columbia-LUZ y otras universidades )  
1979-2005...**

**Estudio de 18 mil descendientes o familiares de una mujer enferma que vivió en una aldea del Lago de Maracaibo a comienzos del siglo XIX. La mutación cromosómica fue pasada a 10 generaciones!  
Actualmente es la familia más grande y mejor estudiada del mundo!!!**

**1955** Armando Negrette

(Fundador de *Investigación Clínica LUZ*,  
fallecido en 2003)

**describió esta familia por primera vez!**

*Corea de Huntington. Estudio de una sola familia  
a través de varias generaciones.*

Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, 1955



**1983** Descubrimiento de un **marcador genético** en el cromosoma 4, mediante análisis de polimorfismos de ADN

*A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*

Nature 306: 234-238 James Gusella, Nancy Wexler et al.

Fue la **primera enfermedad humana** en la que se logró mapear el gen enfermo en el cromosoma!!!

**1993** Descubrimiento del **gen** mutado en brazo corto del cromosoma 4 (**4p 16.3**) y de la **naturaleza** de la **mutación** (extensión de repeticiones de trinucleótidos **CAG**)

*A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington Disease Collaborative Research Group.*

Cell 72: 971-983, 1993. No hay autores listados

**2004** The U.S. -Venezuela Collaborative Research Project. Nancy S. Wexler\*

*Venezuela kindreds reveal that genetic and enviromental factors modulate Huntington's disease age of onset*

*Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3498-3503 March 9 2004



La edad típica de comienzo es entre 30-40 años, pero puede ocurrir entre 2 y 69 años

El **inicio** se ha relacionado con el **número de repeticiones** en la mayoría de casos. Sin embargo hay pacientes con el mismo número de repeticiones con inicio a edades diferentes!

Esto indica que debe haber **muchos otros genes modificadores** que pueden **influir** la edad de comienzo!!

Un 40% de la variabilidad del comienzo de la enfermedad se cree se debe a **genes modificadores** y 60% a **factores ambientales!!!**

Si se **identifica** esos modificadores  
(otros genes y factores ambientales)  
independientes de la mutación que causa  
la enfermedad

se podría encontrar una forma  
de

**RETARDAR**

**EL COMIENZO de la ENFERMEDAD!!!**

**Futuro en Huntington:**

**Retardar comienzo  
con drogas????**

# \* Epidemiología

Prevalencia de 1:10000 en caucásicos

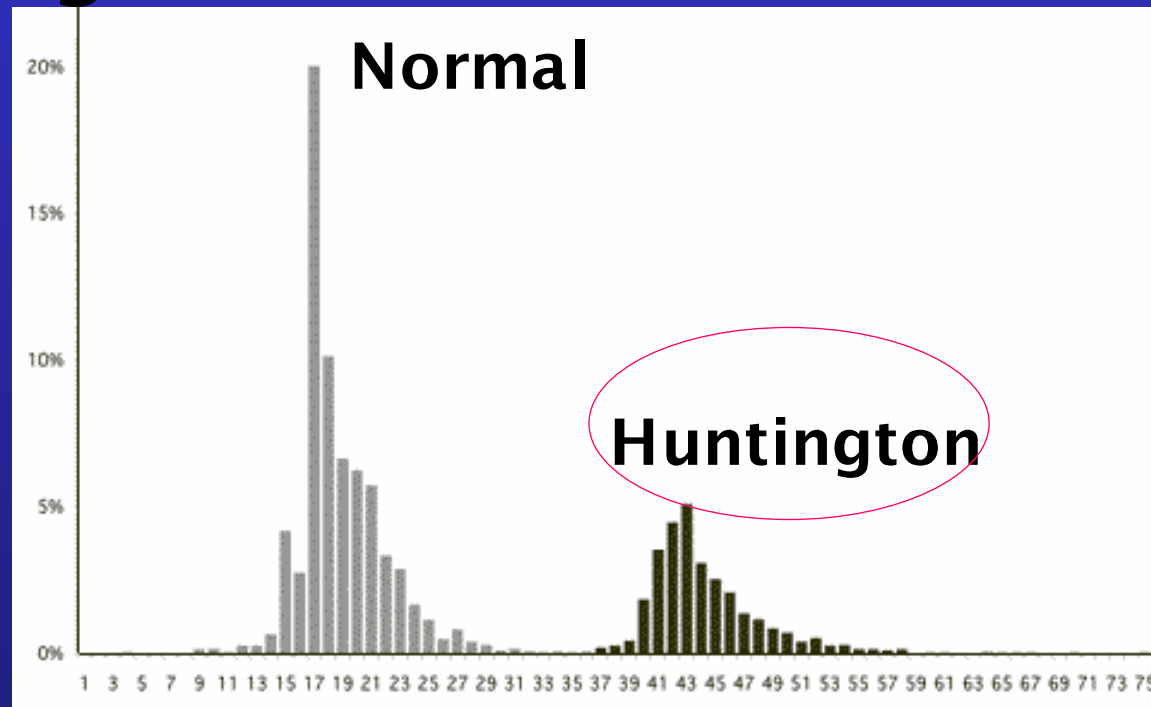
En USA: 30 mil enfermos

150 mil con riesgo de llevar el gen

Los que tienen padres con HD tienen 50% probabilidad de sufrir la enfermedad y mostrarán signos en la 3era o 4ta década de la vida

Los que tienen el gen esperarán la aparición de la enfermedad!!!

# Diagnóstico de la enfermedad

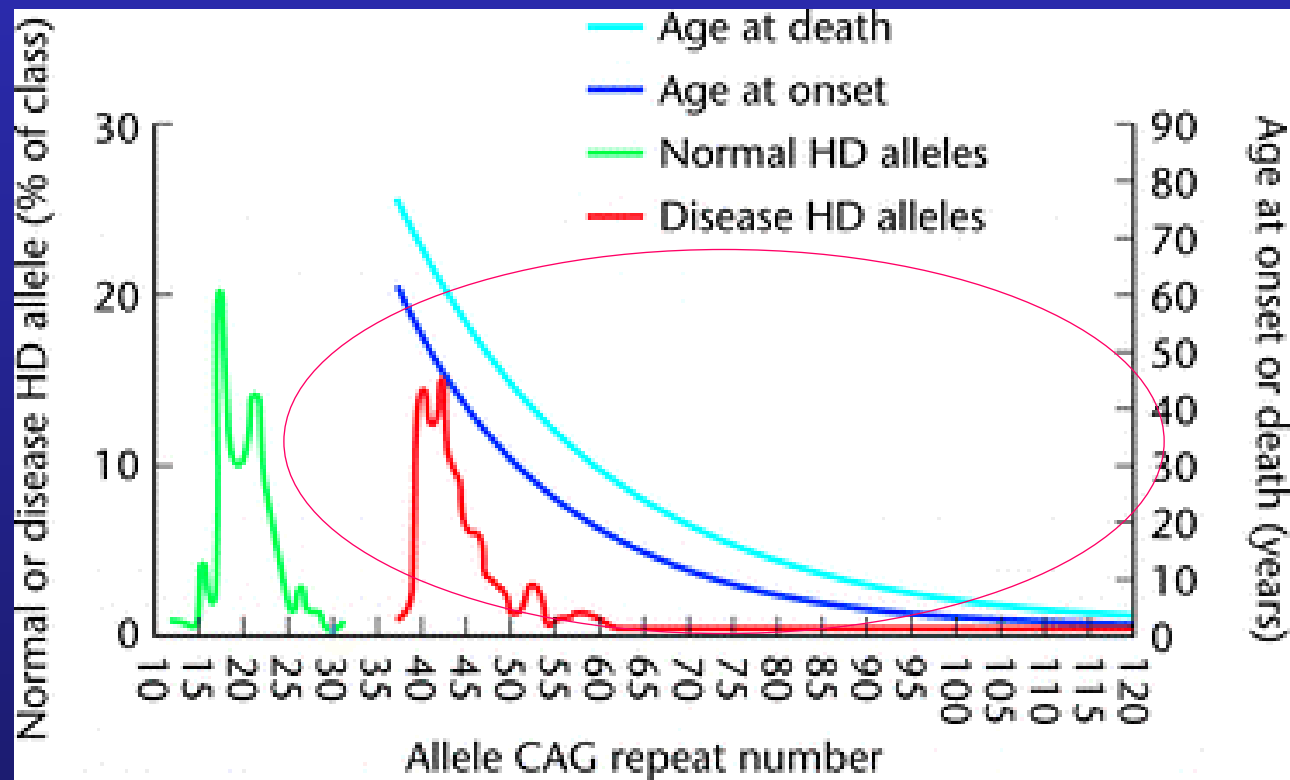


Número de CAG repeticiones

**HD:** > 40 a más de 150 CAG  
(promedio 40-50)

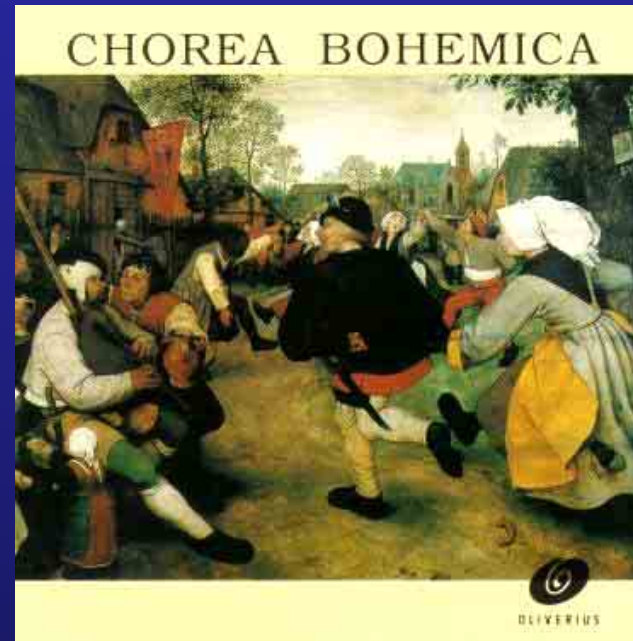


# HD: $> 40$ repeticiones de CAG



## \* Clínica

- Inicio a mediana edad 35-45 años
- Primeros **signos motores** son sutiles hasta progresar a movimientos descontrolados de todos el cuerpo: la **COREA**



# COREA

Lat.: danza, que viene del  
Gr. *Choreia*: coros

Movimientos  
espasmódicos de  
miembros y músculos  
faciales como de danza

Incoordinación motora.

Estos movimientos  
despertaron en una época  
temor y superstición!





## Enfermos de Huntington

Alteraciones motoras  
postura, marcha y  
movimientos anormales

Pérdida de peso por  
fallas en deglución





Javier Telléz  
**Choreutics** (Estudio de movimiento), 2001  
49 Bienal de Venecia



◦ No sólo es una enfermedad motora, el paciente pierde capacidad para comunicarse y muere en 10-15 años

Hay síntomas **psiquiátricos**

depresión,

cambios de personalidad,

suicidio,

disminución de capacidad intelectual

## Huntington juvenil

• cause	HD allele with large number of repeats, usually inherited from father
• age of onset	before 20 years
• # of CAG repeats	usually above 55, sometimes over 100
• signs of onset	decline in school performance, behavioral problems, movement difficulties, personality changes
• symptoms	rigidity, seizures, dementia, speech and swallowing problems
• treatments	anticonvulsant (seizure) drugs, physiotherapy
• affected brain areas	caudate and putamen, globus pallidus, cerebellum
• length of disease	less than 10 years
• inheritance	50/50 chance of passing HD allele on to children

En Huntington juvenil hay más de 55 repeticiones de CAG!!

Mientras más repeticiones **Más pronto el inicio** de los síntomas

Ahora se puede diagnosticar  
QUIÉN lleva el gen mutado,

Pero,

No se sabe CUÁNDO se iniciará  
la enfermedad



# Pruebas genéticas diagnósticas

## 1. Diagnóstico presintomático de individuos a riesgo en familias con Huntington,

A partir del descubrimiento en **1983** de un marcador genético (*linkage test*)

### “linkage”

relación entre genes en el mismo cromosoma que hace que se hereden juntos, porque están ubicados cerca

## Análisis de “linkage”

Estudio dedicado a establecer “linkage” entre genes

Propósito:

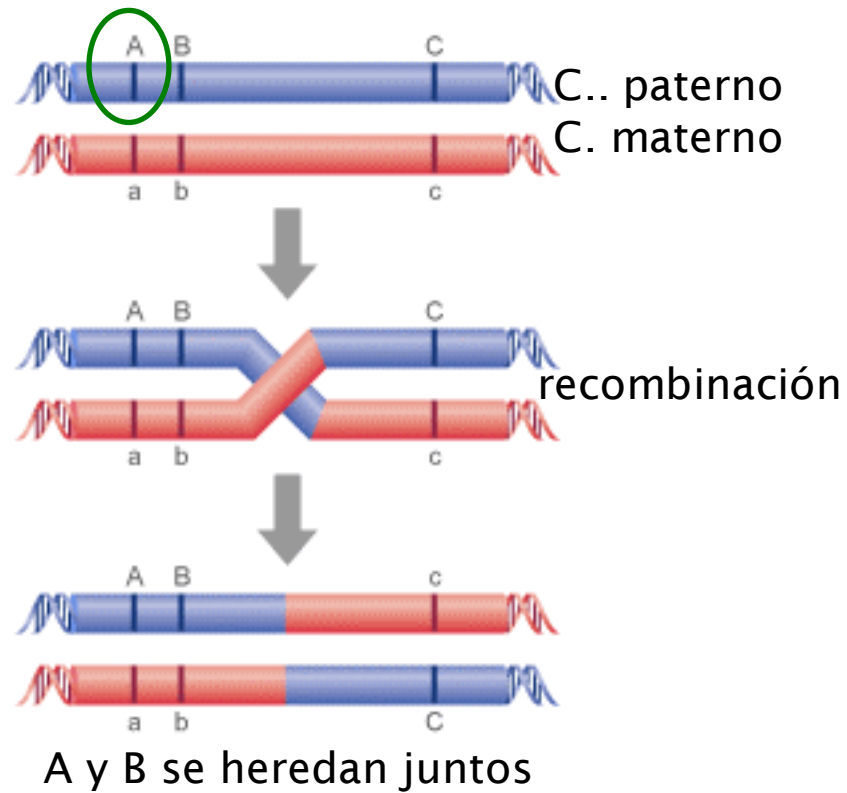
Encontrar **ubicación** grosera entre el gen de enfermedad y un marcador genético conocido

Marcadores genéticos:

Secuencias de ADN que muestran **polimorfismos** (variación en tamaño o secuencia) en la población

Secuencias de ADN cercanas no tienden a recombinarse y por tanto se heredan juntos

# Análisis de “linkage”



## 2. Identificación del gen MUTADO

**Prueba directa de la longitud de la expansión CAG**

Es más barato, rápido y más exacto que el anterior y no se necesita el ADN de miembros de la familia

A partir de **1993** se puede identificar el gen Htt y la longitud de la extensión CAG

**Dilemas éticos???**

No hay enfermedad

< 30 repeticiones CAG

**Huntington**

> 40 repeticiones CAG  
(claramente positivo)

Actualmente,  
se puede saber si el individuo lleva el  
gen de la enfermedad o no,

Pero no hay manera de  
**evitar** la presentación de la  
enfermedad ni de saber cuándo  
comenzará!

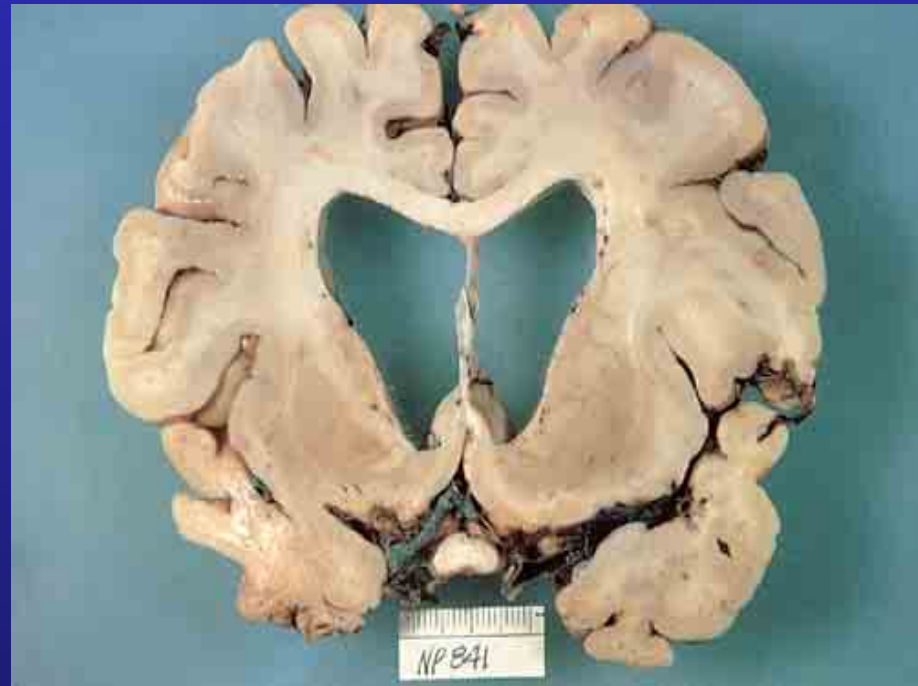
## \* Patogenia

Pérdida de neuronas  
**estriado** y **corteza**

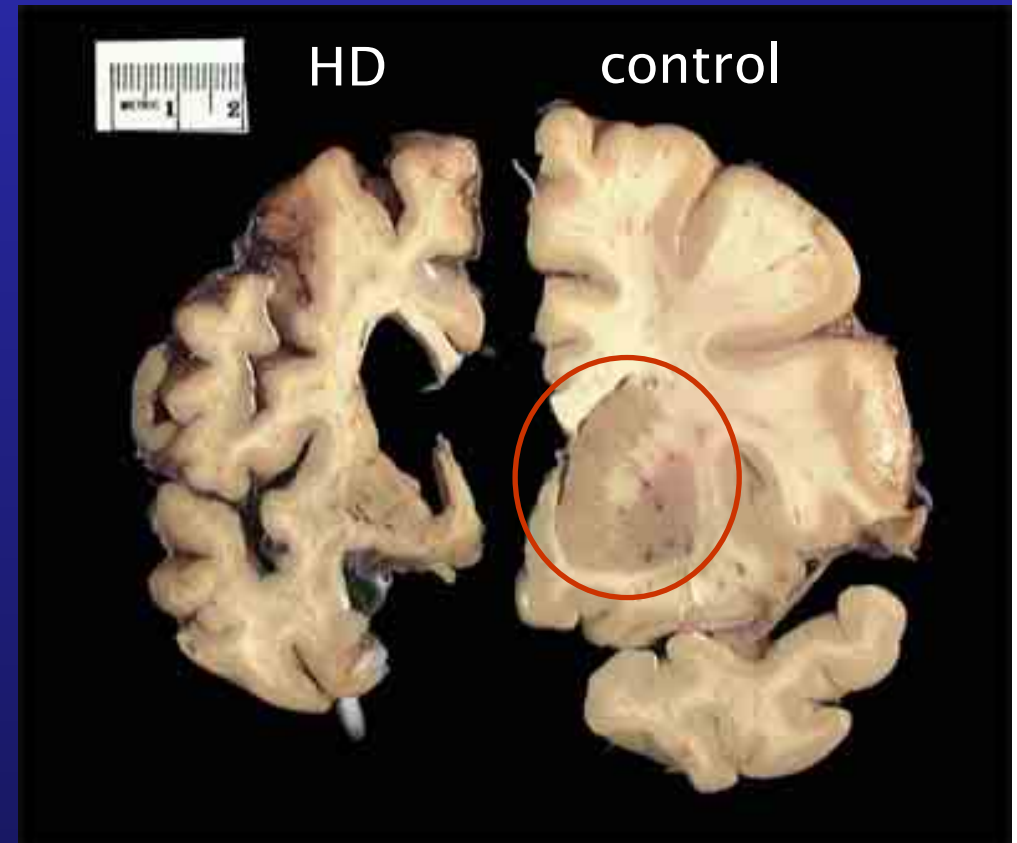
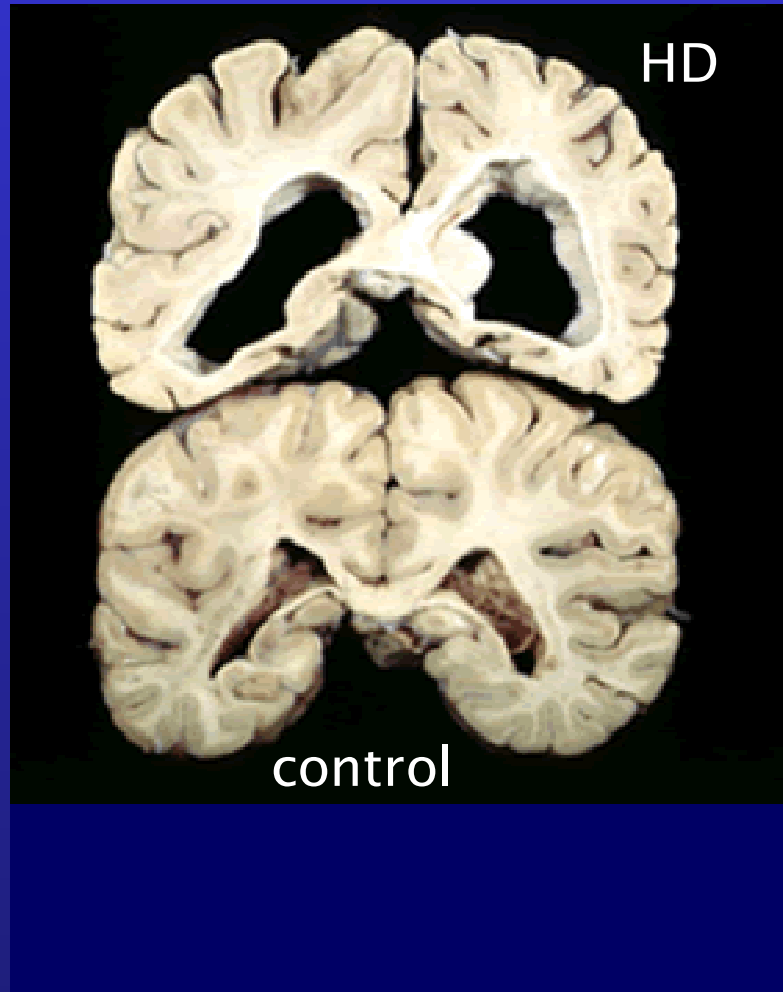
Atrofia bilateral del  
caudado

Crecimiento de los  
ventrículos

Reducción del peso  
del cerebro



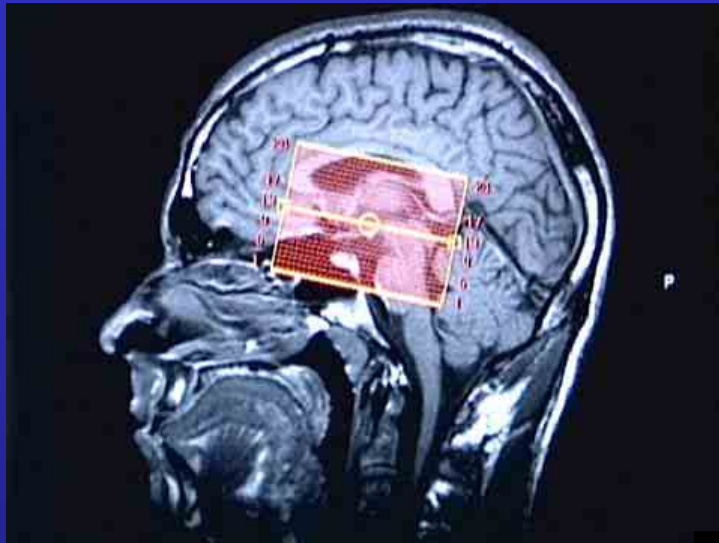
# Huntington vs. Control





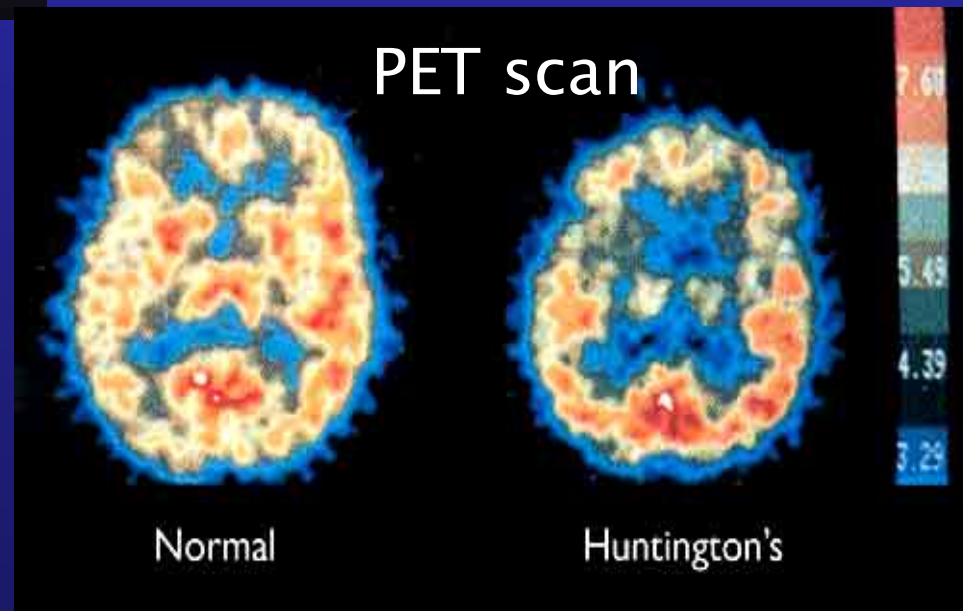
# Destrucción del estriado Dilatación ventricular





## Estriado en Huntington

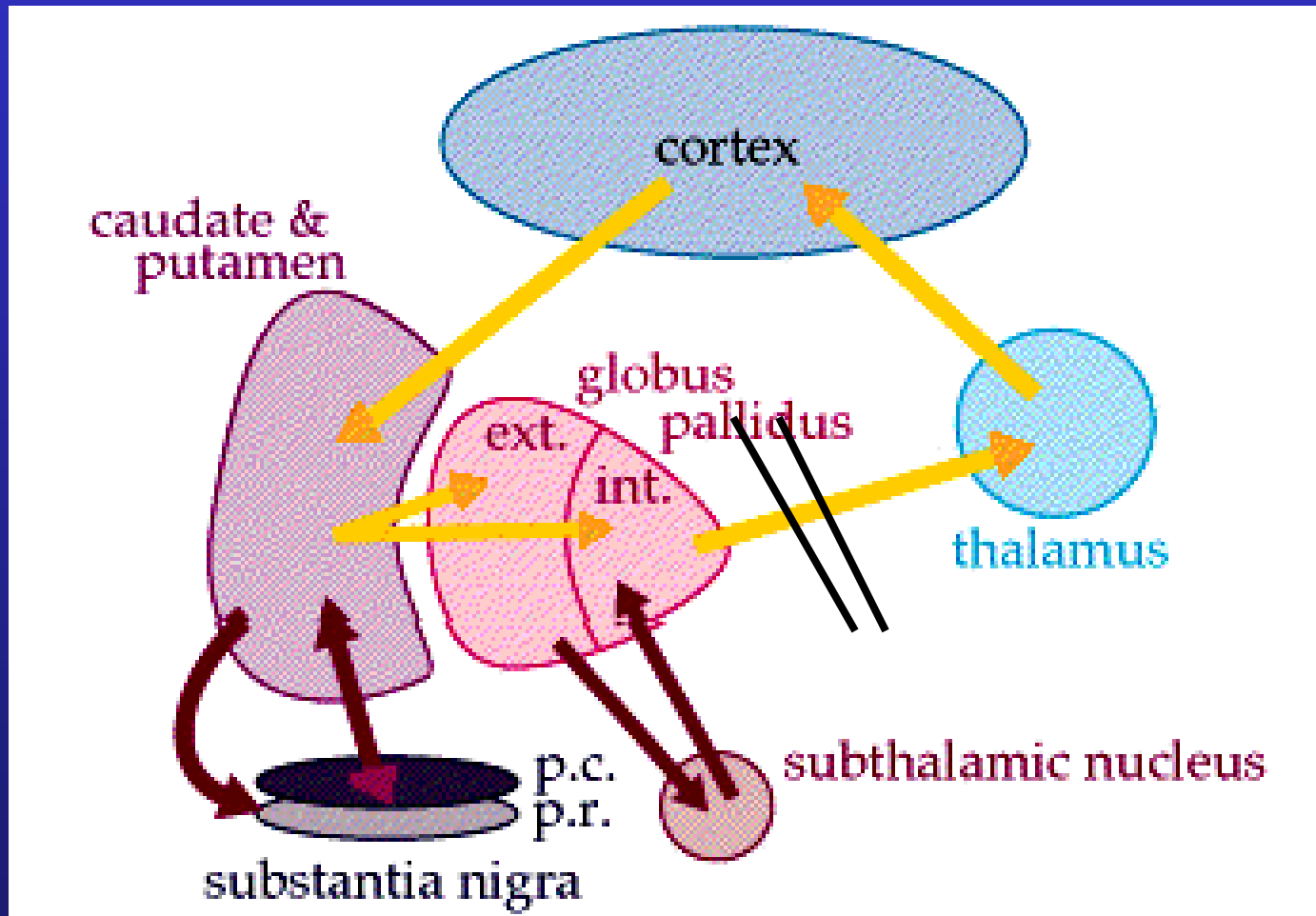
Hipometabolismo  
(fluorodeoxiglucosa)



## PÉRDIDA DE NEURONAS GABA EN ESTRIADO

En el caudado las neuronas más afectadas son las *spiny medium size* que son **GABAÉRGICAS inhibitoras** y se cree que esta pérdida de inhibición produce los movimientos descontrolados

En cierta forma es como un modelo opuesto al Parkinson



Conexiones de los G.B.

## \* Etiopatogenia

### Cola larga poliQ en la proteína Htt

- Agregación de proteína mutada Htt
- Formación de inclusiones intracelulares
- Interacciones patológicas proteína-proteína
- Excitotoxicidad
- Apoptosis
- Inflamación

# Huntingtin (Htt)

Proteína (3100 aa) de función desconocida  
Se expresa en células neuronales y no neuronales

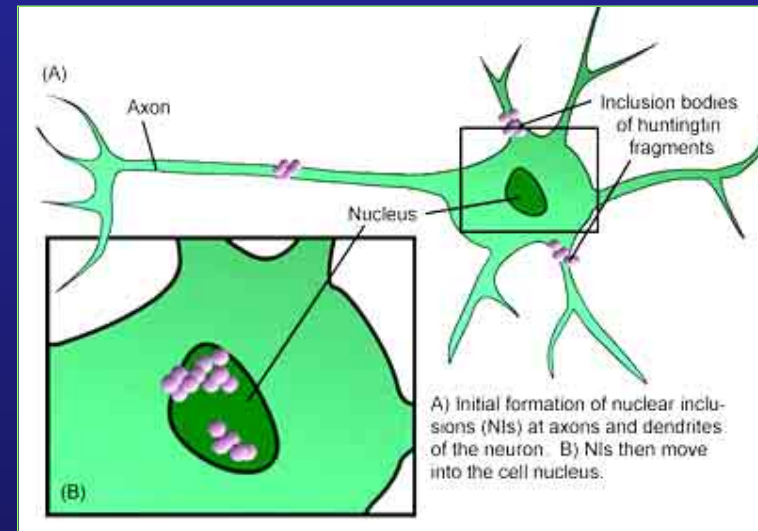
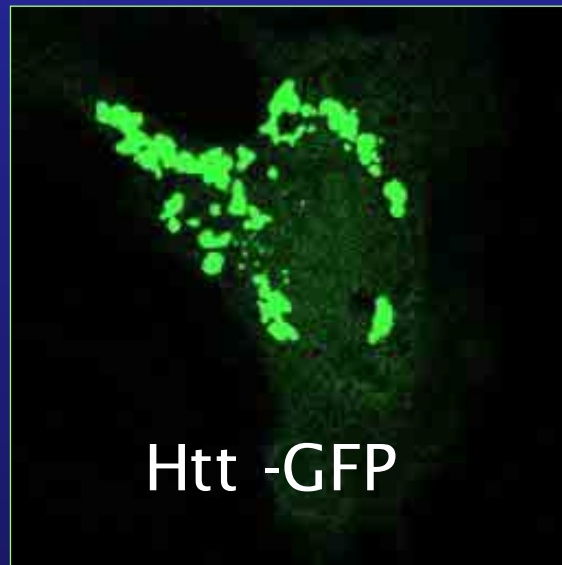
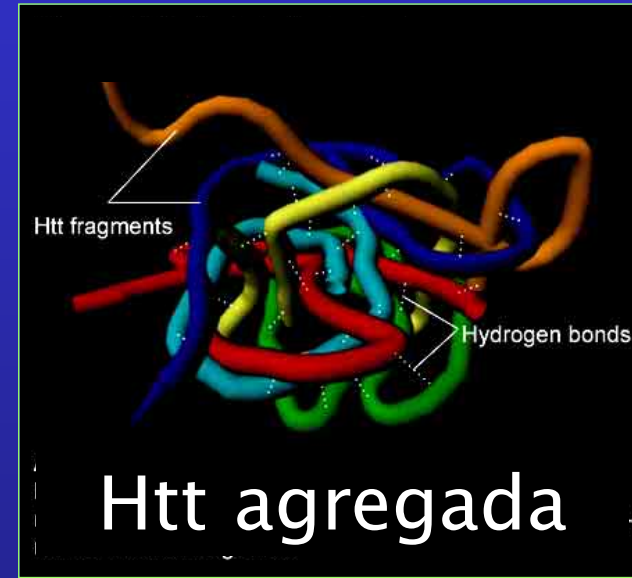
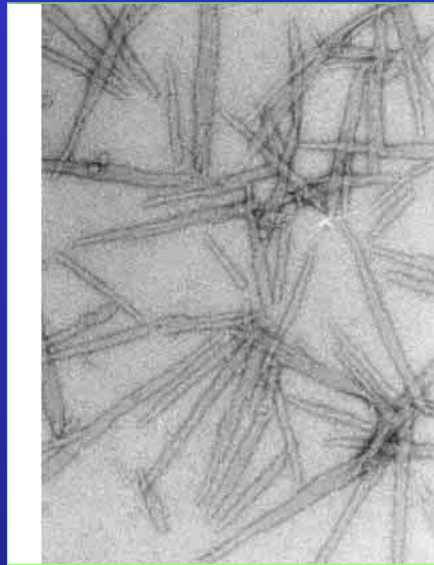
Las repeticiones CAG codifican una cadena larga de residuos de glutamina a partir de la metionina inicial

La proteína mutada es clivada y los fragmentos poliQ (Q poliglutaminas) forman agregados e inclusiones intracelulares

Por lo menos 20 proteínas interactúan con la región N terminal de Htt que tiene que ver con diferentes actividades celulares

# Huntingtin (Htt)

Agregación e  
inclusiones  
intracelulares



## **Htt normal**

Es **esencial para el desarrollo**, mutaciones K-O son letales

## **Htt mutada**

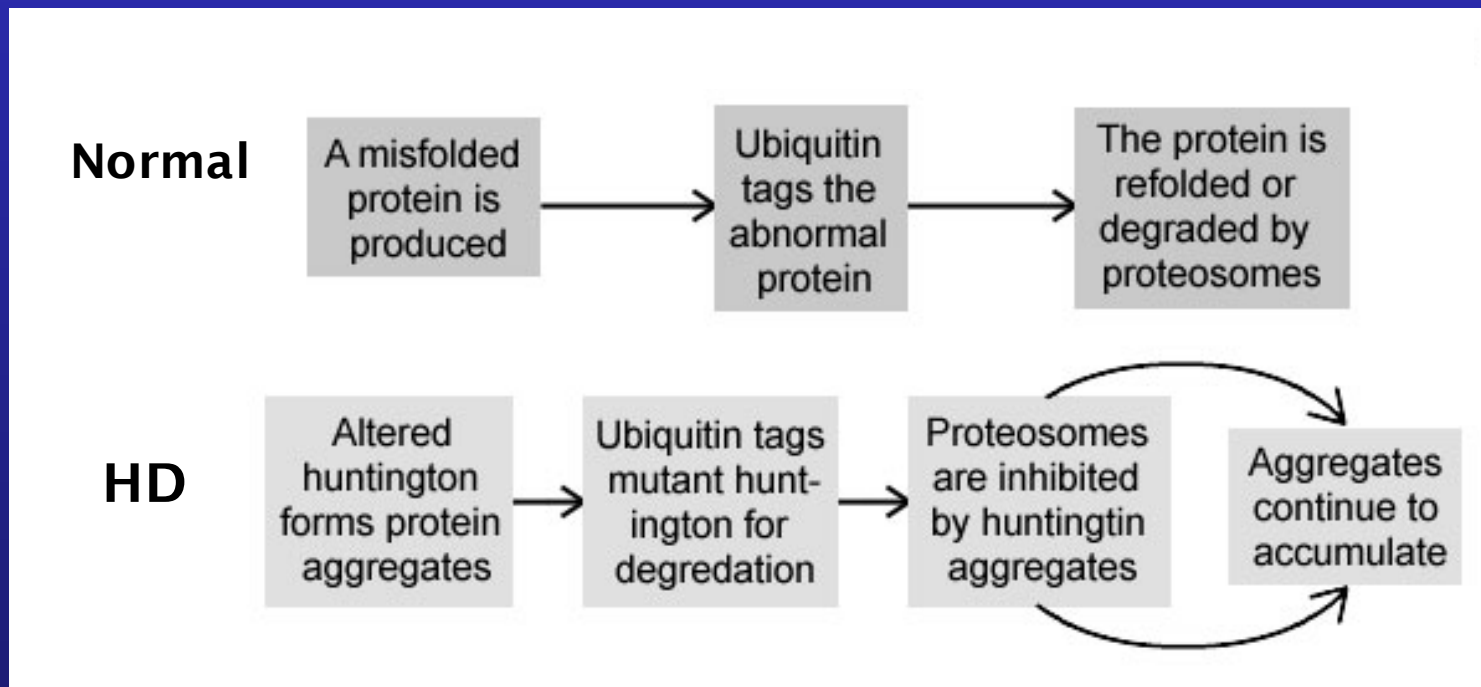
Debe actuar como una “**ganancia de función**” dándole alguna nueva propiedad a la proteína Htt sin eliminar su función normal

La proteína dispara **excitotoxicidad, producción de radicales oxidativos y activación de caspasas**

Pero aun no esta claro que lleva a la muerte neuronal!!



# Agregación y degradación de proteínas

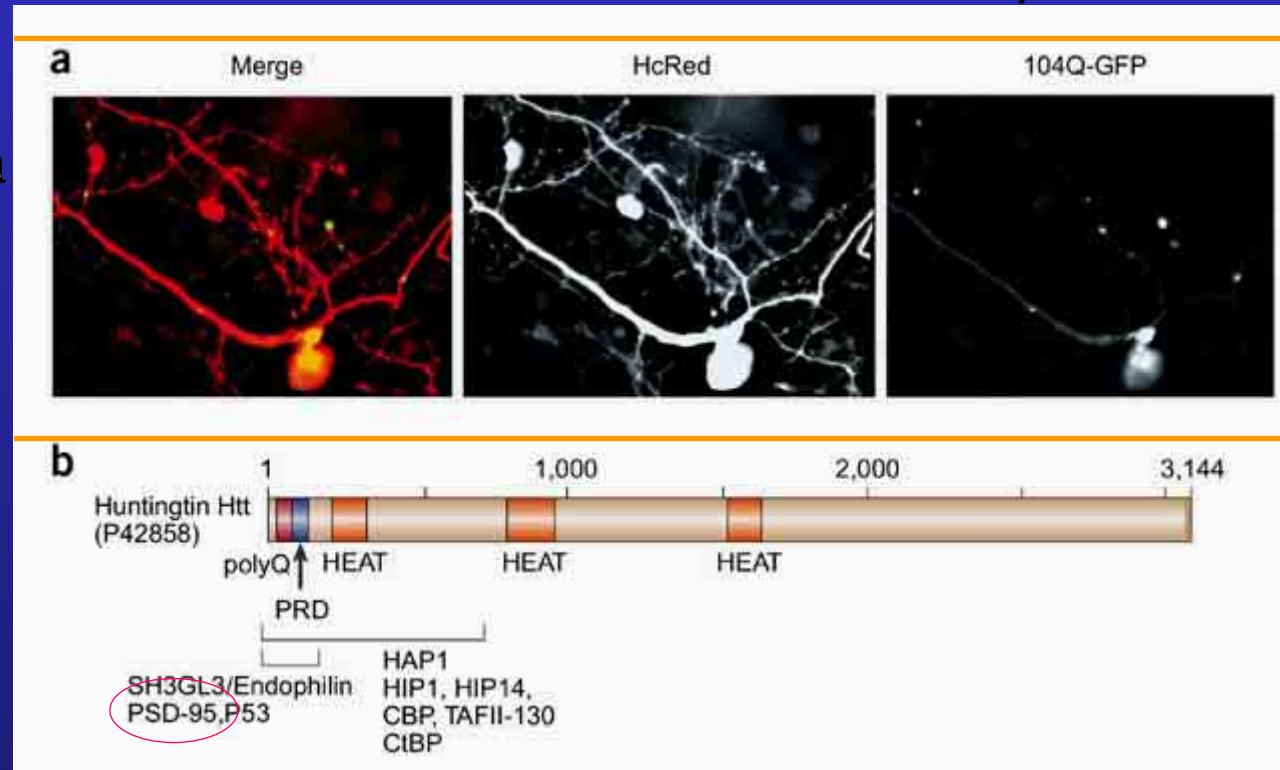


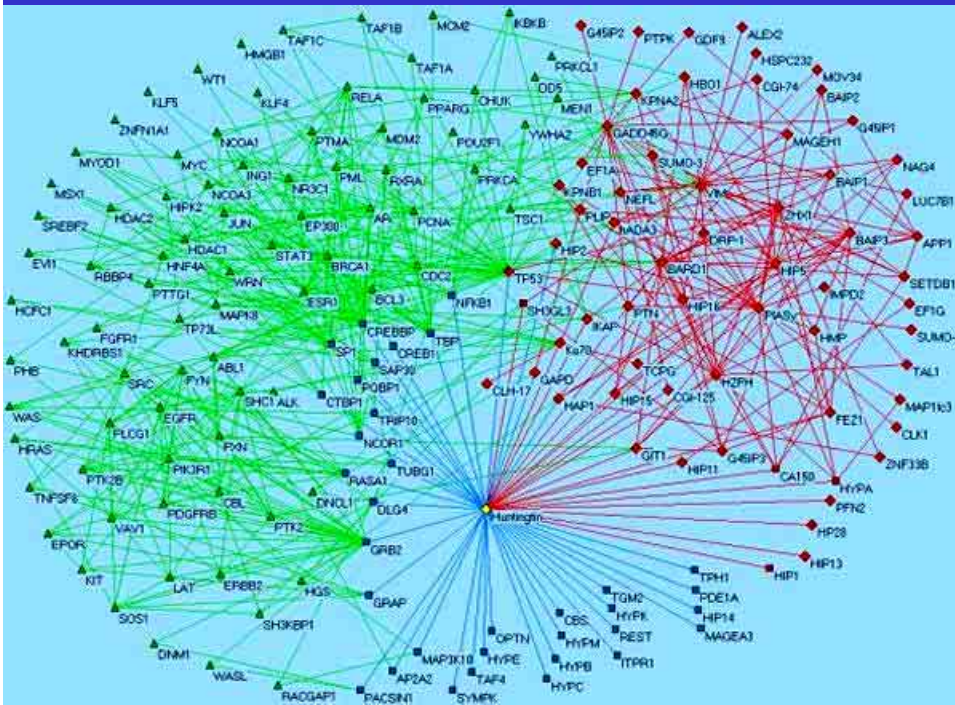
## Expresión poliQ y GFP

Agregación  
de repeticiones  
poliQ en neurona  
con vectores  
104Q-GFP y  
Hc Red

Estructura  
Htt

Sitios de  
Interacciones  
con proteínas

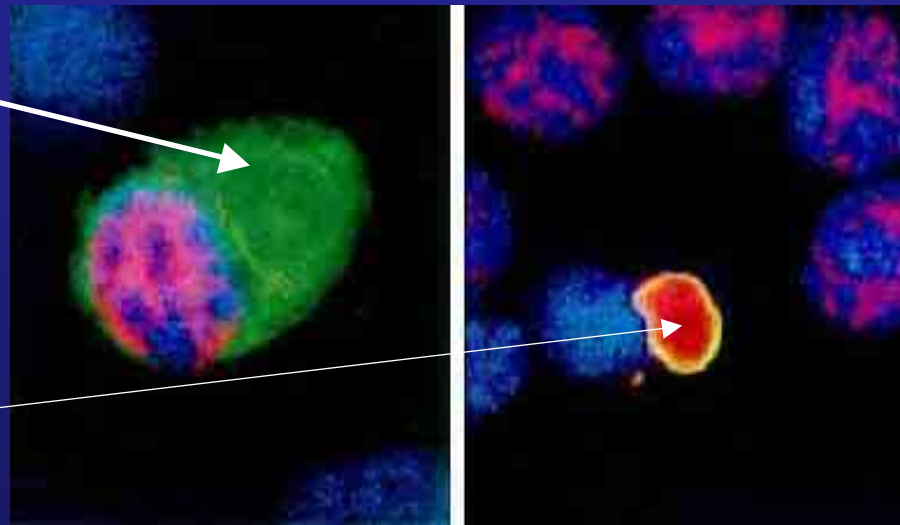




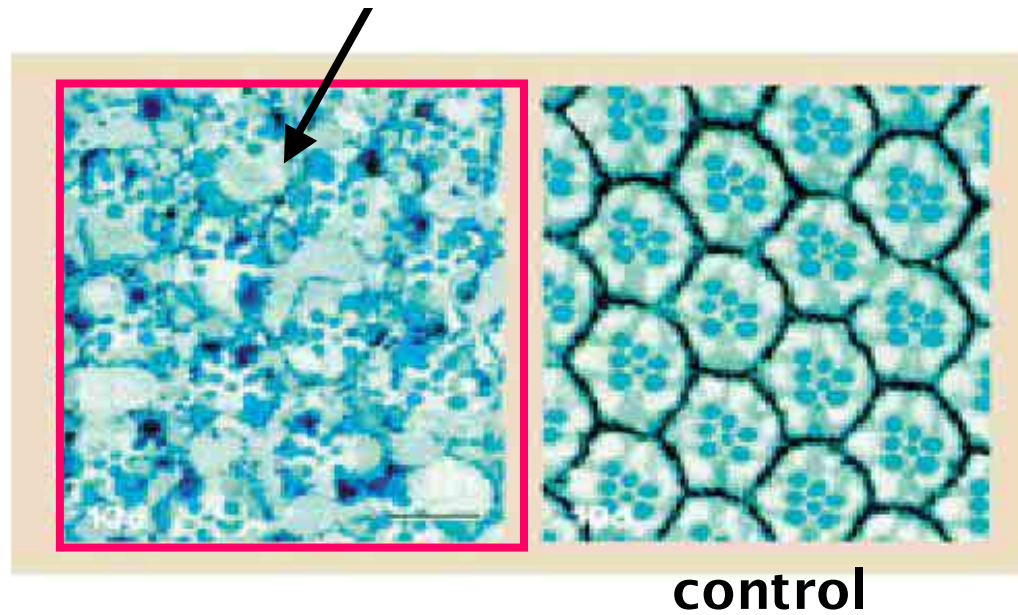
# Interacciones proteína-proteína de Htt

Htt normal  
(célula normal)

Htt mutada  
(célula dañada)



## Inserción de Htt humana con 120 repeticiones poliQ en fotoreceptores de *Drosophila*



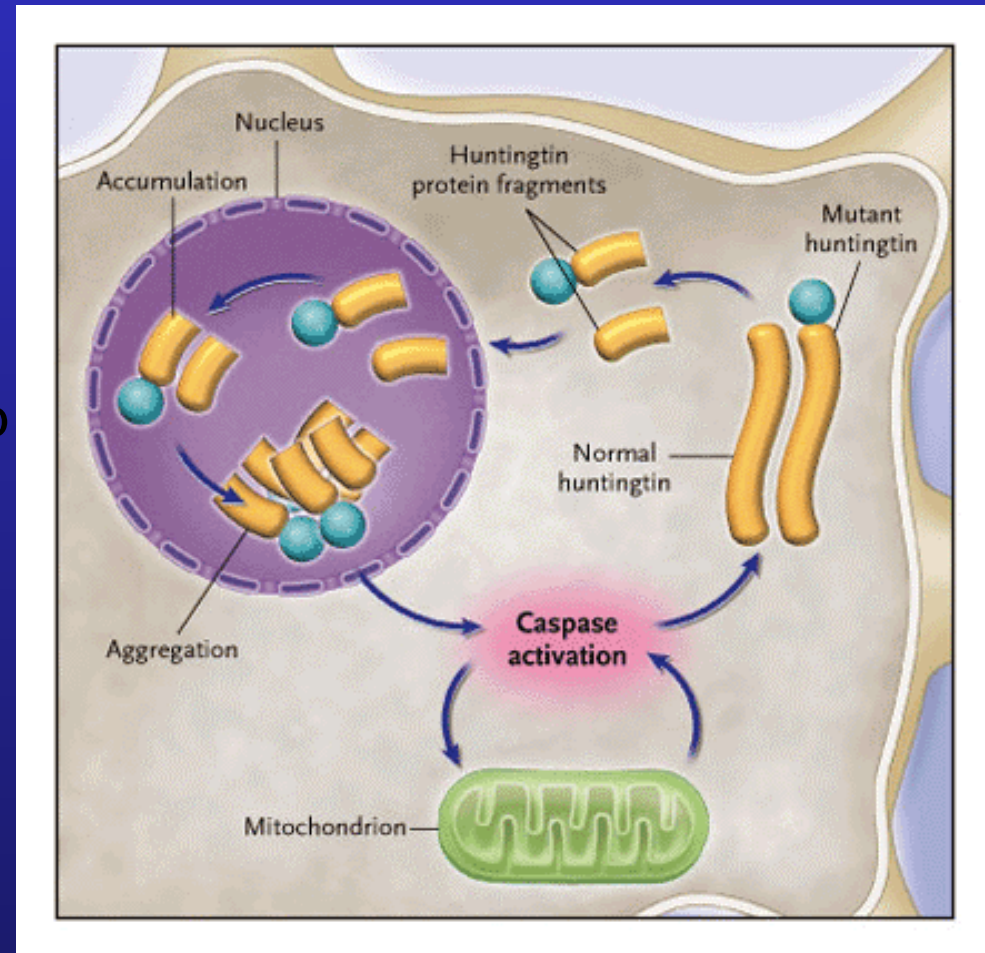
Nature 395:841 (1998) re: Neuron 21:633 (1998)

# Htt y Apoptosis

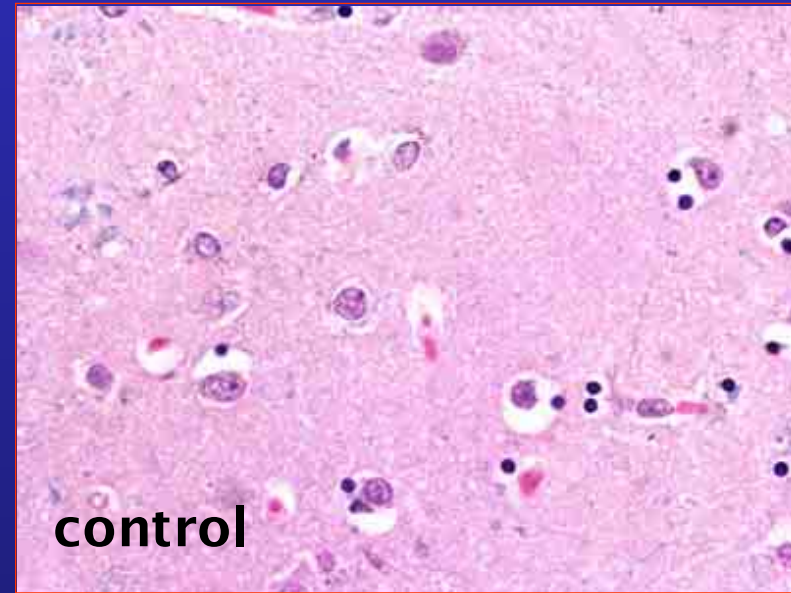
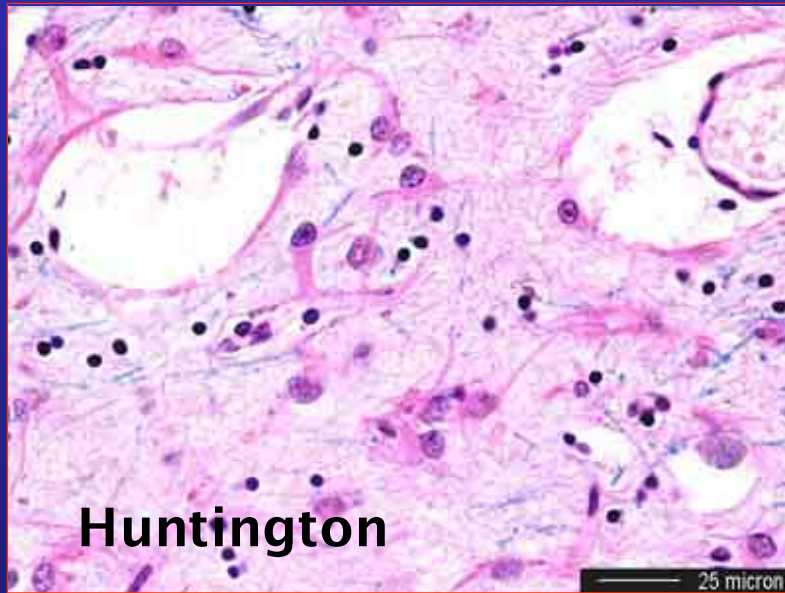
Fragmentos de Htt se acumulan y agregan formando inclusiones intranucleares

Los fragmentos en el núcleo **umentan** transcripción de **caspara 1** que **activa caspara 3** y clivan Htt depletandola

Con el progreso de la enf se desencadena **apoptosis mitocondrial**



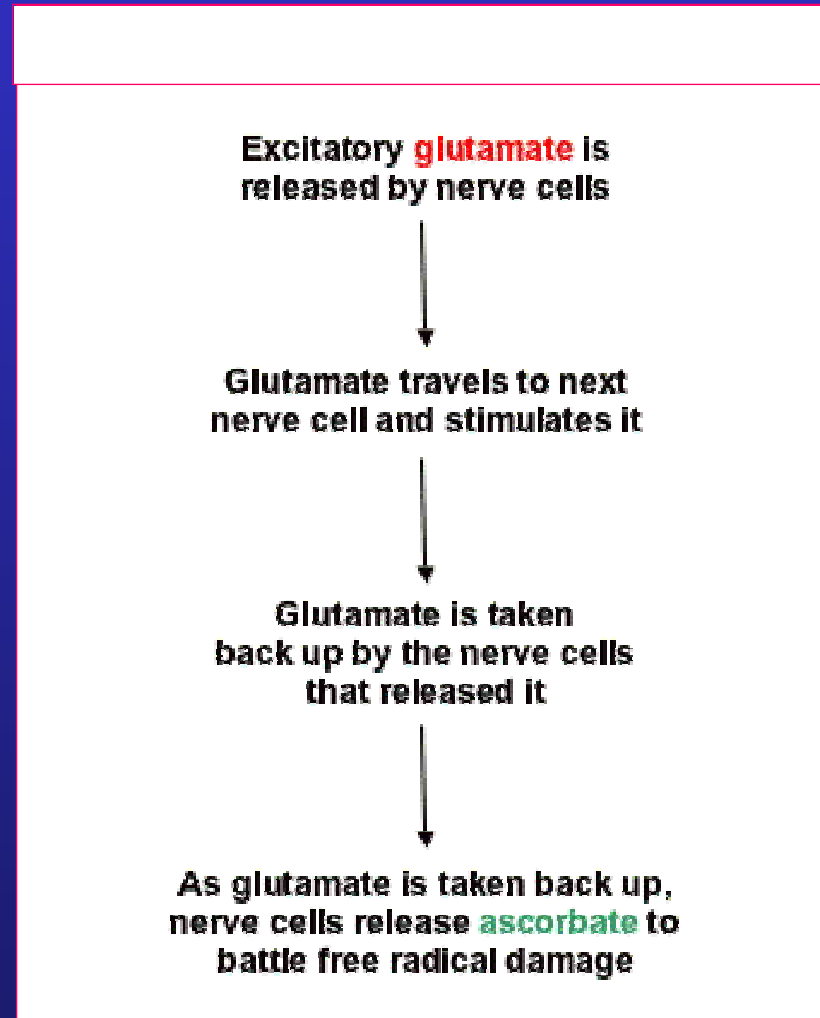
# Inflamación en HD



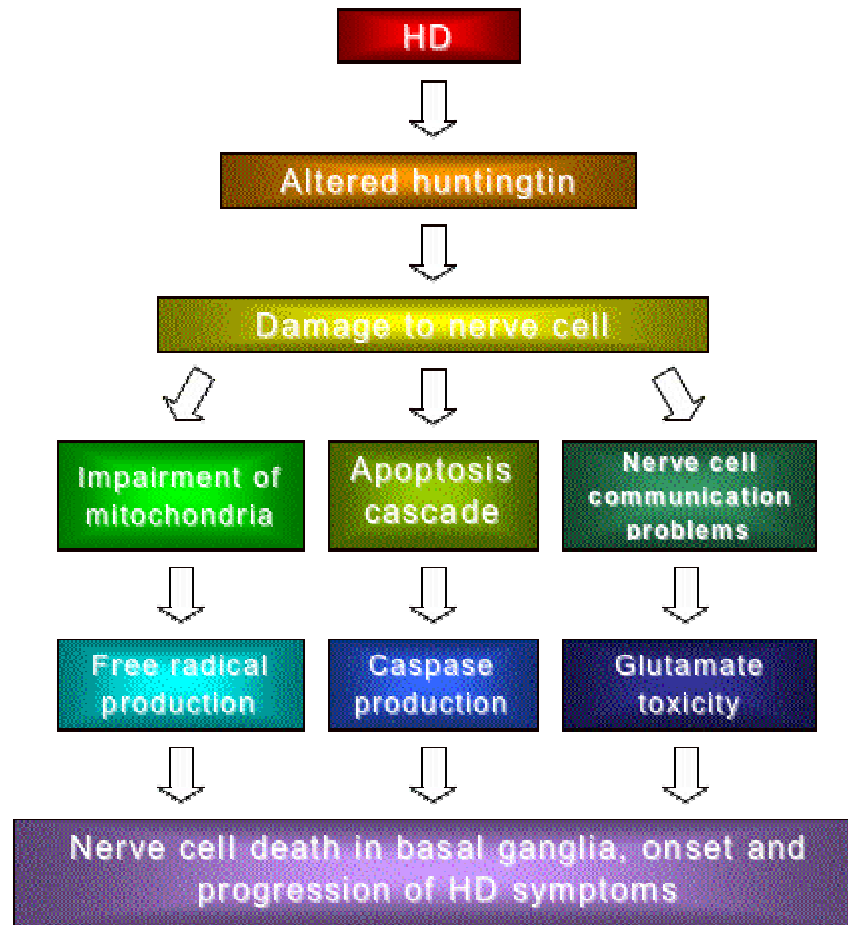
**Astrogliosis en estriado**

# Excitotoxicidad en Huntington

## Aumento de liberación de glutamato



## Cascada de eventos en Huntington



Producción de:  
ROS  
caspasas  
glutamato

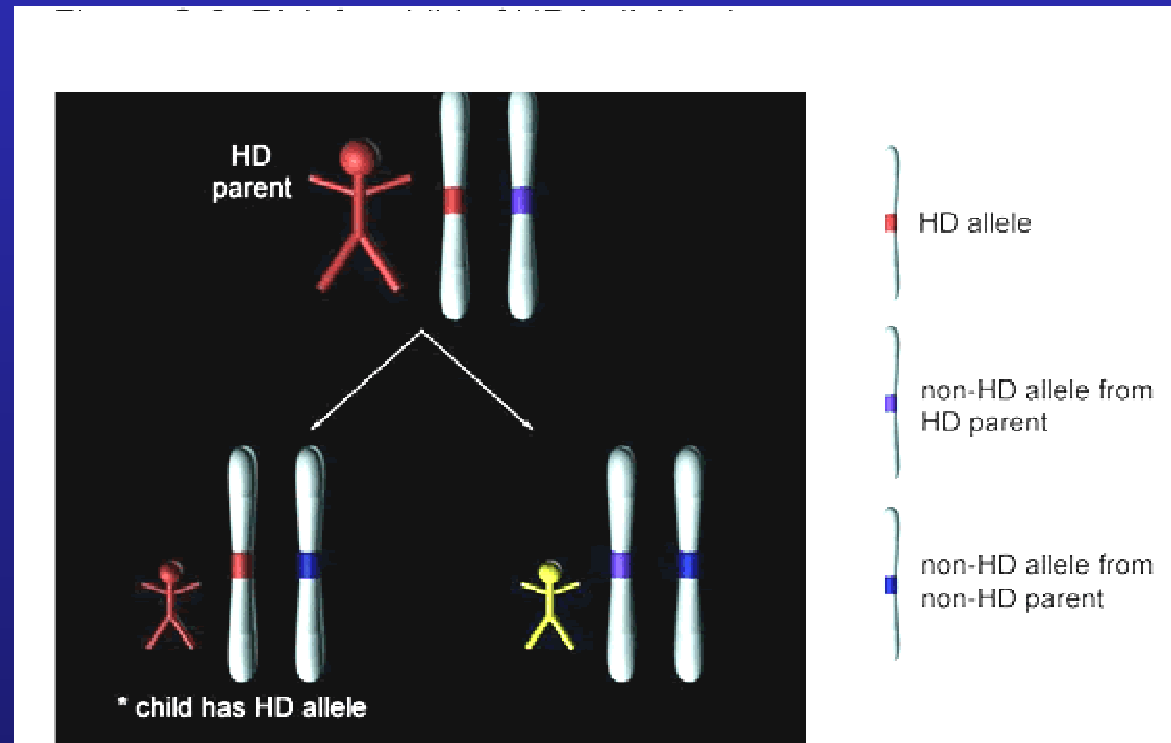


Muerte neuronal



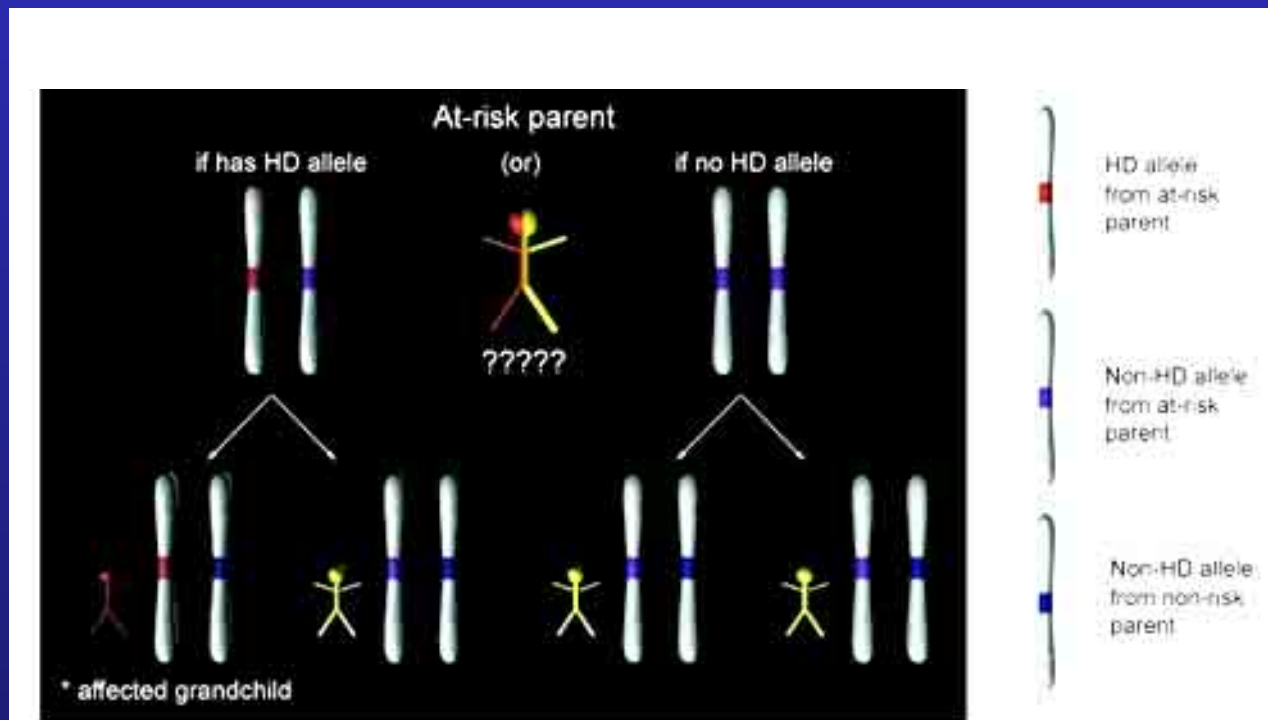
# \* Genética

## Enfermedad heredada autosómica dominante



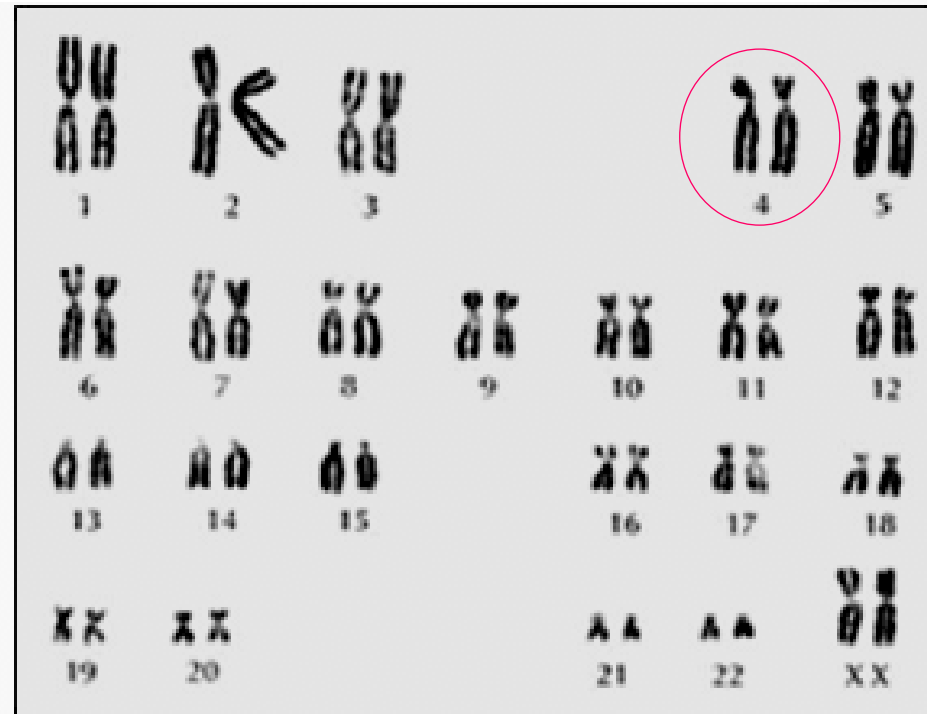
**50% chance de heredar de padres a hijos**

# \* Genética



25% de riesgo de heredar de abuelos a nietos

# Cromosoma afectado en Huntington

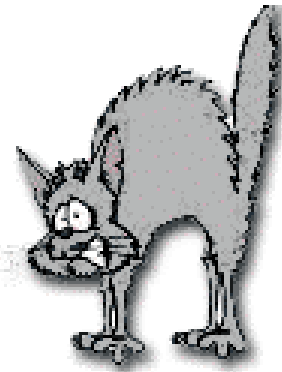


**Brazo corto del cromosoma 4**

# Lenguaje de ADN

**Tripletes de  
nucleótidos  
o codones  
codifican  
para un  
aminoácido**

**C-A-T =**



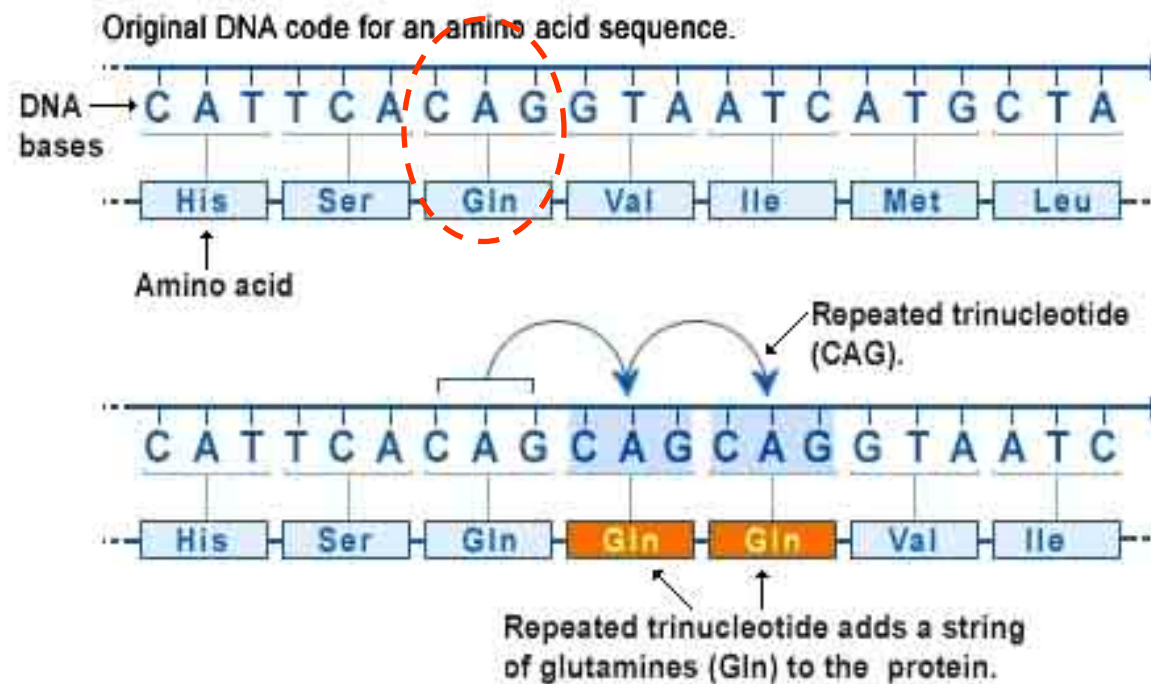
**G-G-C =**



(proline)

# Tipo de mutación en Huntington (1993)

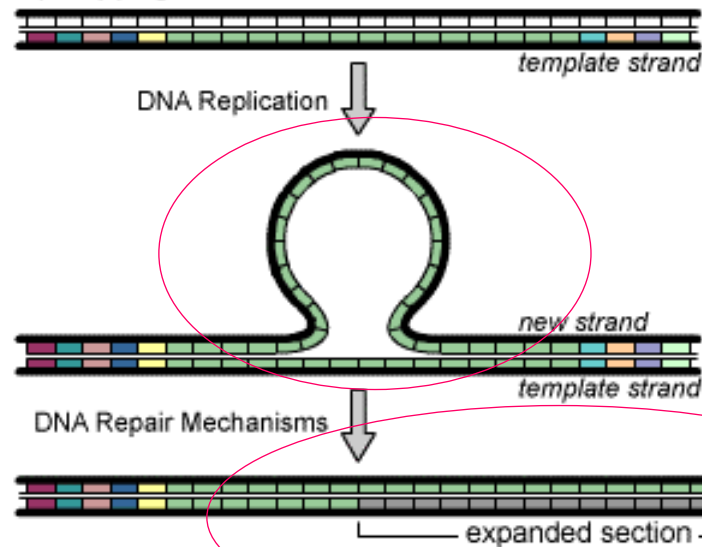
Expansión de repeticiones de tripletes de nucleótidos **CAG** para glutamina



# ¿Cómo ocurre la expansión?

Figure Q-5: The Polymerase Slippage Model

## A) Slippage Event



(A) During replication, polymerase slippage and subsequent reattachment may cause a bubble to form in the new strand. Slippage is thought to occur in sections of DNA with repeated patterns of bases (such as CAG), represented here by matching colors. Then, DNA repair mechanisms realign the template strand with the new strand and the bubble is straightened out. The resulting double helix is thus expanded.

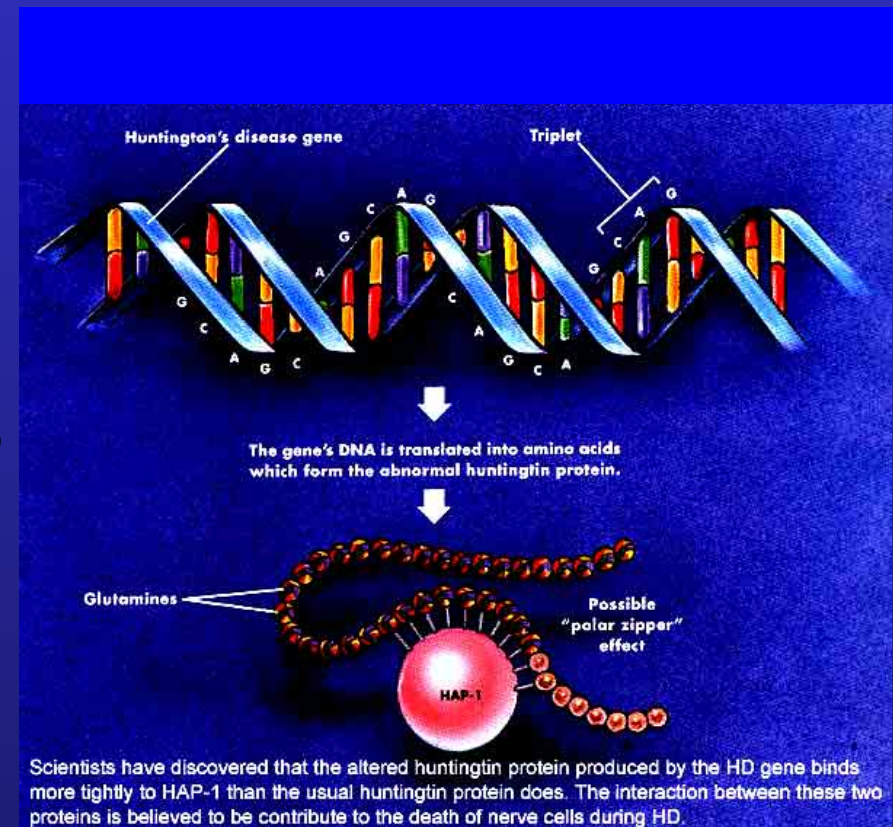
(B) Polymerase slippage, as theorized, cannot occur in DNA without repeating patterns of bases.

El gen codifica para **huntingtin (Htt)**

Si hay 40 o más repeticiones de CAG hay enfermedad!

El **Htt normal** parece ser necesario para desarrollo y sobrevivida.

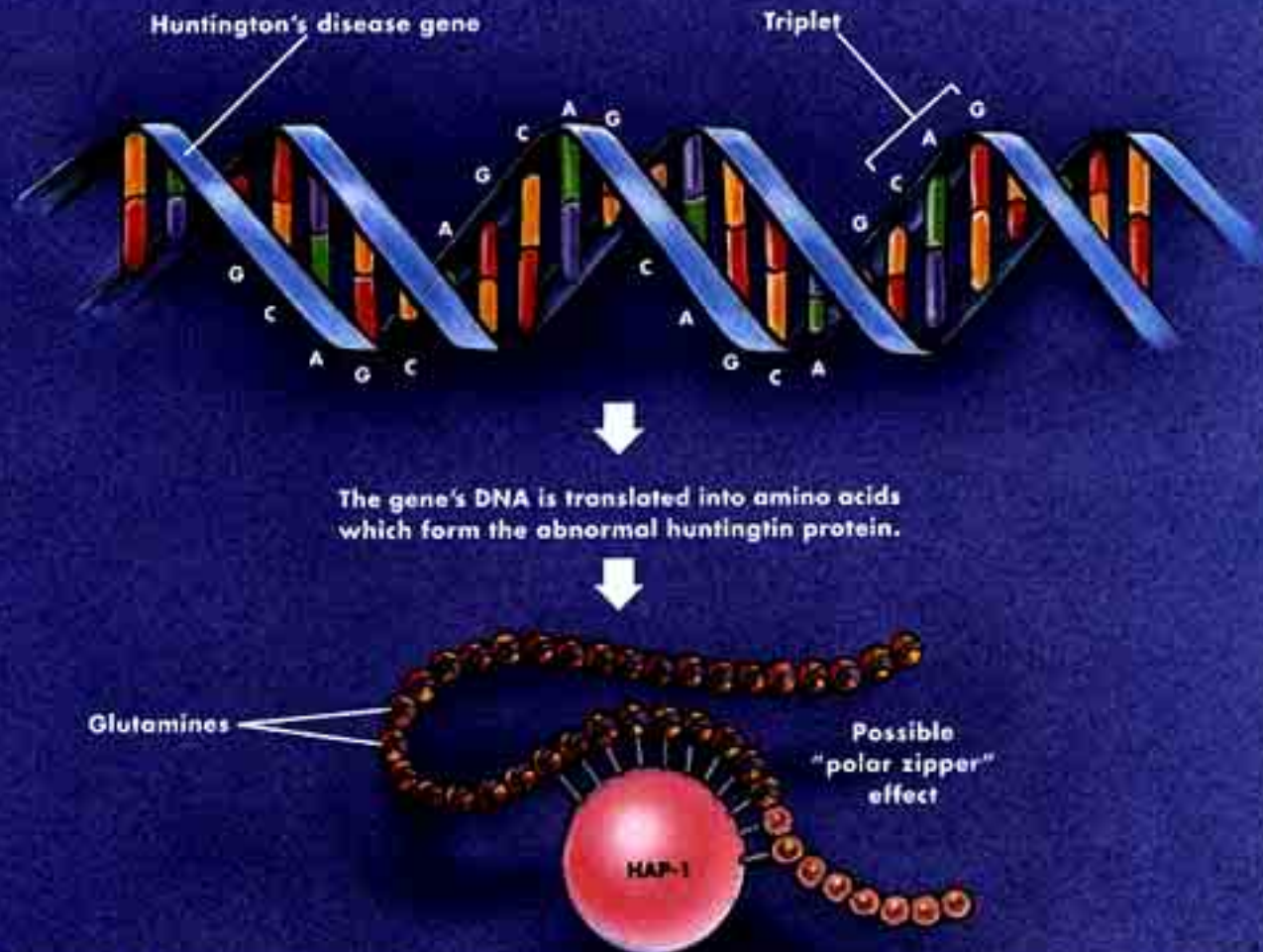
El **Htt mutado** tiene una **larga cola** poli glutamina que hace que tenga interacciones proteína-proteína patológicas!



## Figure D-7: The Interaction between *huntingtin* and HAP-1

Source: Huntington's Disease Genetics.

Available at: <http://www.sfn.org/briefings/huntingtons.html>



Scientists have discovered that the altered huntingtin protein produced by the HD gene binds more tightly to HAP-1 than the usual huntingtin protein does. The interaction between these two proteins is believed to contribute to the death of nerve cells during HD.



La expansión poliQ en Htt da **ganancia tóxica** de función con pérdida selectiva de neuronas en estriado y cortex

Htt aunque se expresa ubicuamente en los enfermos hay **daño selectivo** en el cuerpo estriado (¿por qué?)

# \*Modelos

(en células, en moscas, en ratones)

**Sobreexpresión de Htt** causa menos inclusiones que los fragmentos truncados y esas inclusiones parecen tener el tracto poliQ en conformación soluble más que insoluble

**Ratones transgénicos** reproducen la patología pero no de manera comparable a la humana, ellos no muestran la pérdida neuronal extensa característica que parece ser dependiente del tiempo.

La duración de la vida del ratón es insuficiente para desarrollar completamente la enfermedad



**Ratón K-I con  
mutación CAG con  
150 repeticiones!**

**Muestra alteraciones de la  
marcha e inclusiones  
intranucleares en estriado**



**Inclusiones en estriado**

# \* FUTURO

## 1. Detección de individuos a riesgo

Marcadores genéticos es posible desde 1983

Dilemas éticos

## 2. Detección precoz de la enfermedad

identificar el sujeto que lleva el gen desde 1993

## 3. Tratamiento molecular en base a etiopatogenia -ideal- **modificador del curso de la enfermedad**

Manipulación farmacológica de genes para retardan  
inicio de la enfermedad !!! ????

**(The U.S. -Venezuela Collaborative Research Project.  
2004)**

# Tratamiento actual

- \* No hay cura
- \* Tratamiento sintomático y ensayos farmacológicos

## \* **Tratamiento en base a etiopatogenia**

1. Antioxidantes, antiapoptóticos, antiexcitotóxicos
2. Neuroprotectores: ácidos biliares, Cop1, omega 3
3. Manipulación farmacológica de Genes modificadores del inicio de la enfermedad ??

## **Tratamientos posibles para Huntington para combatir:**

1. Agregación de proteínas
2. Inflamación
3. Anormalidades en el metabolismo de  
Energía
4. Estrés oxidativo
5. Excitotoxicidad
6. Cambios en transcripción genética

- **Antibióticos**

  - Minocyclin** antiinflamatorio

  - Geldanamycin** antiagregación Htt

  - Rapamycin** antiagregación Htt

- **Ácidos grasos esenciales**

  - Omega 3 y 6** antiinflamatorios

- **Creatina**

  - Puede evitar depleción de energía,  
estabiliza membranas biológicas e inicia otros  
mecanismos que protegen las células del daño



◦ **Antioxidantes**

Ginkgo Biloba,  
Coenzima Q10,  
Vit C,  
Selenio  
Ácido lipoico

◦ **Drogas antiglutamato**

RILUZOLE

Remacemida mejoran función motora

# Minocyclin

Tetraciclina de segunda generación tiene propiedades **neuroprotectoras**

## INHIBE:

- directamente liberación de **citocromo c** (*Cit c*)
- **NOS**
- directamente la **microgliosis** reactiva o secundariamente a liberación del *Cit c*

Está en pruebas clínicas de **HD** y **ALS**

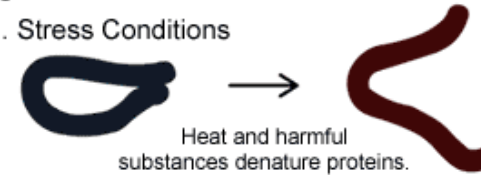
# Geldanamycin

Evita agregación de Htt por:

1. Se enlaza a HSP90 creando HSF1 libre dentro de neuronas HD
2. La HSF1 libre aumenta producción de Hsp70 y Hsp40 dentro de las células
3. Niveles altos de Hsp 70 y Hsp 40 evitan la agregación de Htt mutante

Figure H-1: How Heat Shock Proteins Work

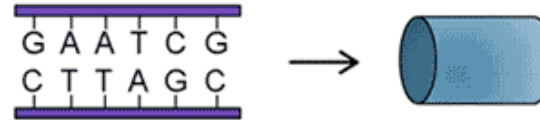
1. Stress Conditions



2. Denatured Proteins Are Detected



3. Heat Shock Proteins Are Produced

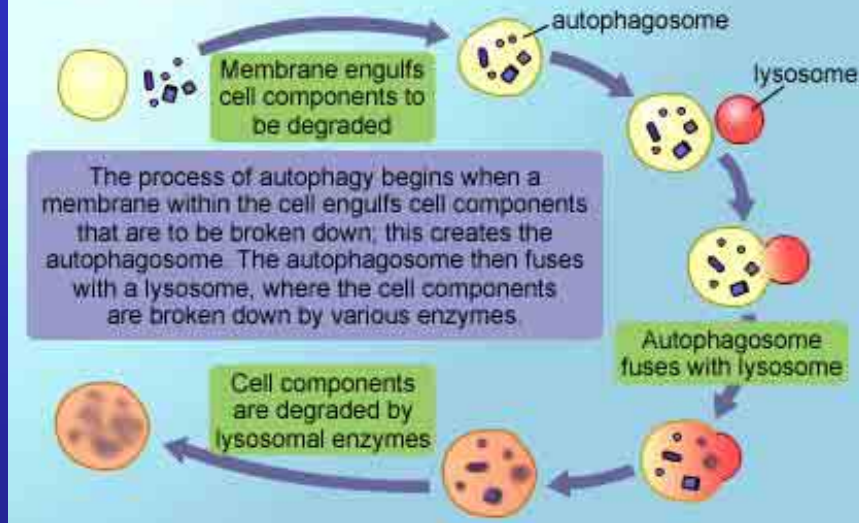


4. Heat Shock Proteins Refold Denatured Proteins



Heat and harmful substances denature proteins, causing them to unfold. Once proteins lose their original conformation, they are no longer able to function properly. When the denatured proteins are detected by the cell, heat shock proteins are produced. Heat shock proteins act as molecular chaperones and help proteins fold back to their original conformation.

Figure H-3: The Process of Autophagy



mTOR es una proteína que regula la síntesis y degradación de proteínas

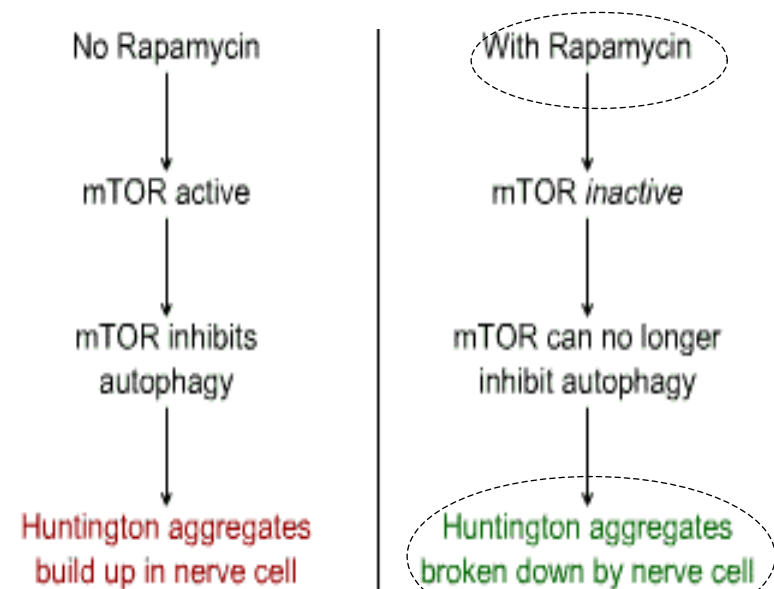
mTOR inhibe autofagia.

mTOR indica cuando hay suficientes nutrientes, la autofagia no es necesaria para romper las moléculas existentes.

**Rapamycin inhibe mTOR y así estimula la autofagia lo que ayudaría a neuronas a eliminar agregados de Htt.**

**Aumenta degradación de agregados Htt**

## Rapamycin



Rapamycin acts to inhibit the function of the protein mTOR. When it does this, mTOR can no longer inhibit the autophagy process, and huntingtin aggregates are more likely to get broken down by the nerve cell.



**ESCLEROSIS LATERAL  
AMIOTRÓFICA  
(ALS)**

**Enfermedad de Lou Gehrig**

# DEDICACIÓN

**Moravia Gómez,**  
compañera y amiga de la escuela  
primaria y del bachillerato

Murió de ALS en noviembre 1991

- \* **Lectura**
- \* **Epidemiología**
- \* **Clínica**
- \* **Patología**
- \* **Etiopatogenia**
- \* **Modelos animales**
- \* **Futuro**



# Lou Gehring

Beisbolista de los Yankees  
de NY murió de ALS en  
1941 a los 38 años



DISEASES AND PEOPLE

# ALS— LOU GEHRIG'S DISEASE



*Marcie Gibson*



*Lou Gehrig*



*Stephen Hawking*

Mary Dodson Wade

Stephen  
Hawking

Físico  
cosmológico



Esta enfermedad fue descrita por primera vez por el neurólogo francés **Jean-Martin Charcot en 1869**

En USA fue descrita como la Enf de Lou Gehrig luego de la muerte en **1941** del famoso beisbolista de los Yankees de NY

En **1993** Rosen et al descubren que una mutación en la enzima **SOD1** es la causa primaria en una porción de casos familiares de ALS!

- \* ALS es rápidamente progresiva, invariablemente **fatal** que ataca a las motoneuronas de los músculos voluntarios.

Los músculos gradualmente se debilitan y se atrofian. Finalmente el cerebro pierde la habilidad de controlar el movimiento.

- \* Los pacientes pierden fuerza y capacidad para mover su cuerpo. Cuando se afectan los músculos respiratorios, el paciente muere por insuficiencia respiratoria

- \* La mente, personalidad, inteligencia y sensorio **NO** se deterioran.
- \* No se conoce la causa y no hay tratamiento curativo.

## \* Epidemiología

- 1 de 100,000 individuos son afectados
- 90-95% casos ALS esporádica  
5-10% casos ALS familiar
- En sólo el 20% de ALS familiar hay sobreexpresión de SOD1 mutada  
1993 Rosen et al descubrieron la mutación G93A SOD1
- 90% casos comienza entre 40-50 años de vida
- 50 % casos muere a los 5 años del diagnóstico

## ALS Familiar 5-10% casos

Mutaciones en la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (**Cu-Zn SOD1**)

Rosen et al *Nature* 362: 59-62, 2003

*Mutations in the Cu-Zn superoxide dismutase gen associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*

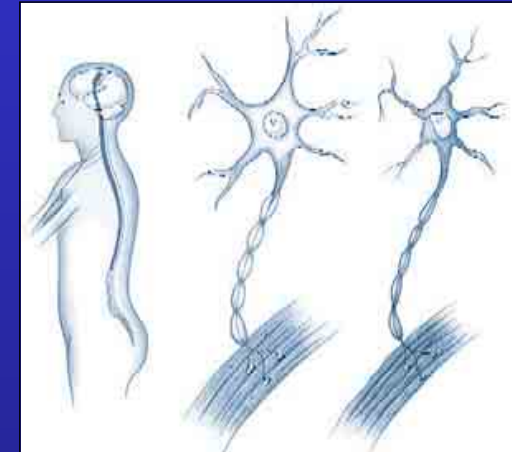
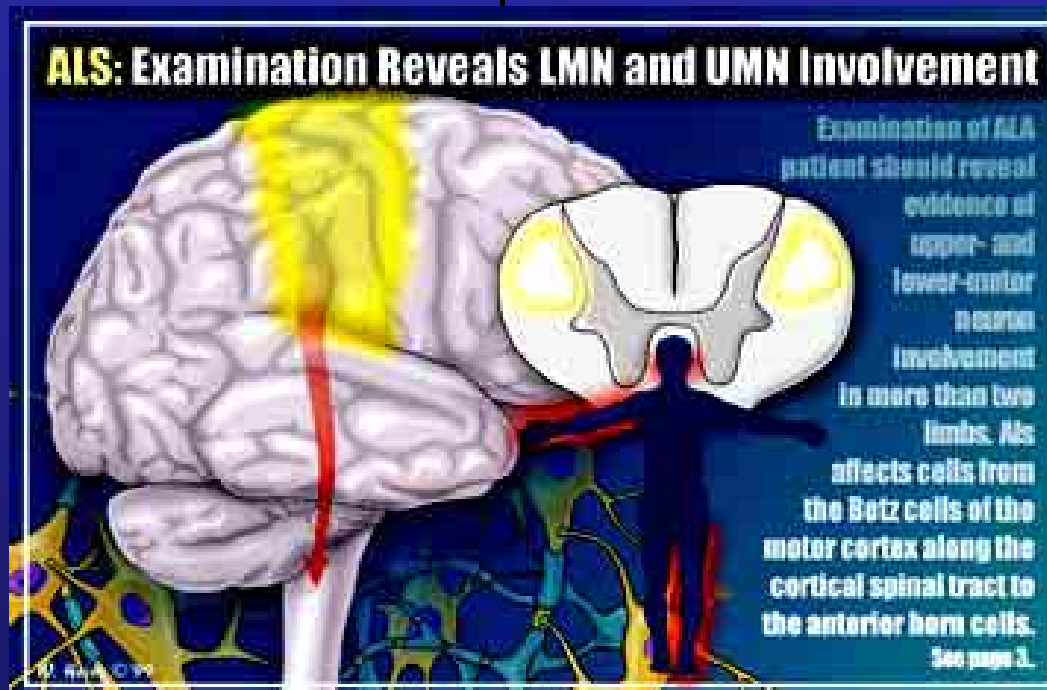
## ALS Esporádica 90-95%



## \* Clínica

No hay afectación de la función sensorial o intelectual

La muerte ocurre por falla de musculatura respiratoria



Amotrophic lateral sclerosis (ALS), also known as Lou Gehrig's disease, causes degeneration of nerve cells connected to the brain that control voluntary motor functions.

Daño de las **neuronas motoras superiores** (corteza) e inferiores (médula espinal) y El tracto corticoespinal

La **debilidad muscular** es lo más frecuente 60%,  
manos pies son afectados primero

Se extiende luego la parálisis al tronco y finalmente afecta  
masticación, deglución, lenguaje y respiración.

Necesitan soporte ventilatorio para sobrevivir

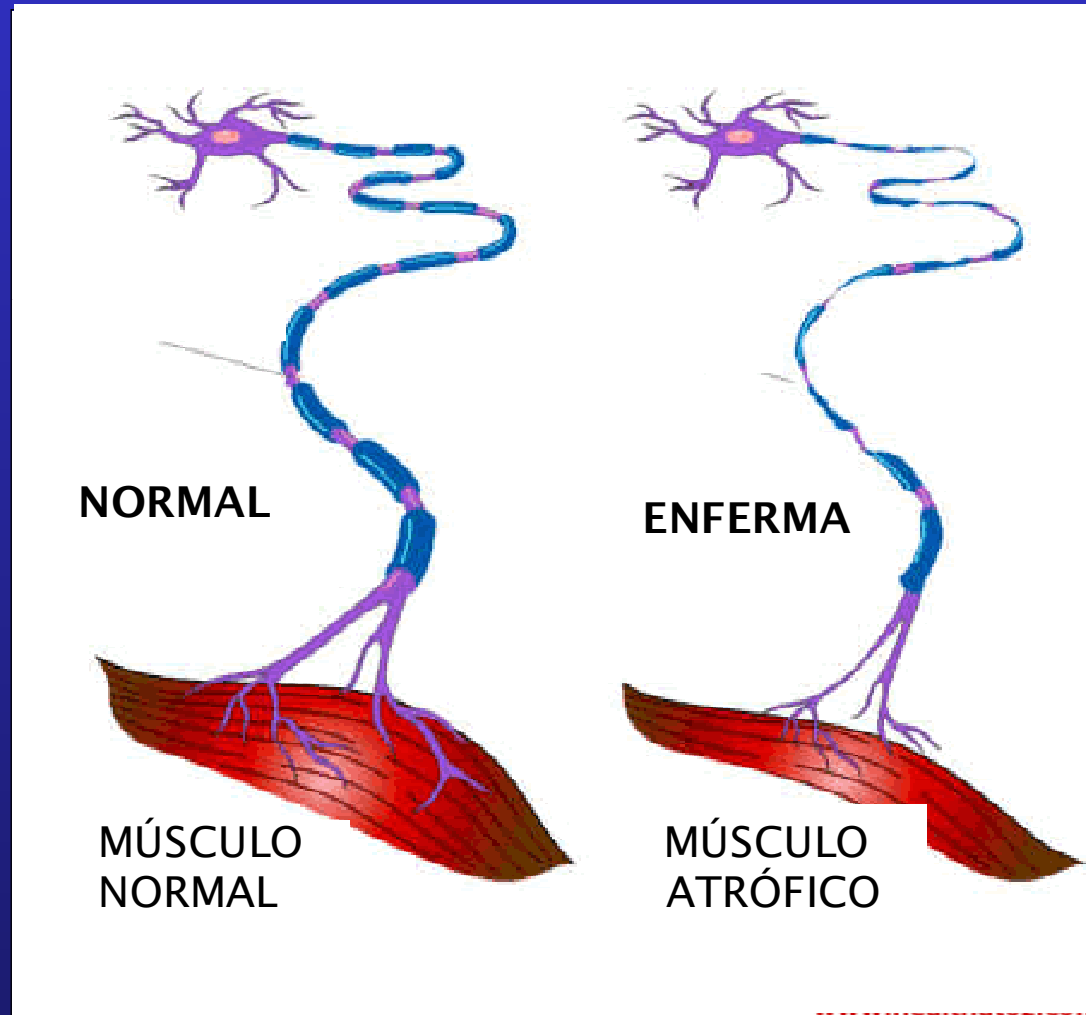
Los sentidos no son afectados y los enfermos  
permanecen alerta hasta el final

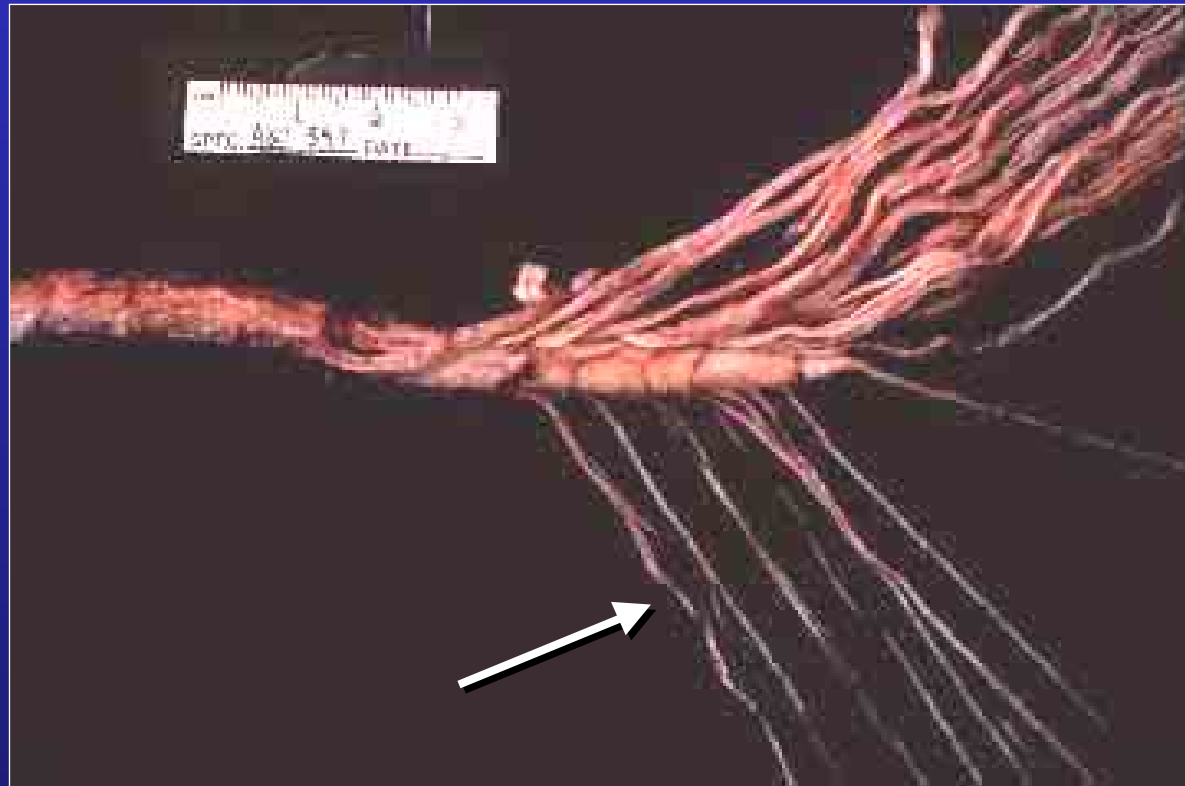
Sobrevida 3-5 años, pero puede llegar a 10 o más años

## \* Patogenia

- Muerte de las motoneuronas de la corteza motora y asta anterior médula espinal
- Gliosis y desmielinización (**esclerosis**) de los tractos corticoespinales anterior y **lateral**
- **Atrofia** muscular

# MOTONEURONAS





**Atrofia severa de las raíces  
anteriores médula espinal**

Note la diferencia en  
grosor de raíces  
anteriores.  
Hay atrofia evidente en  
ALS



# \* Etiopatogenia

Excitotoxicidad

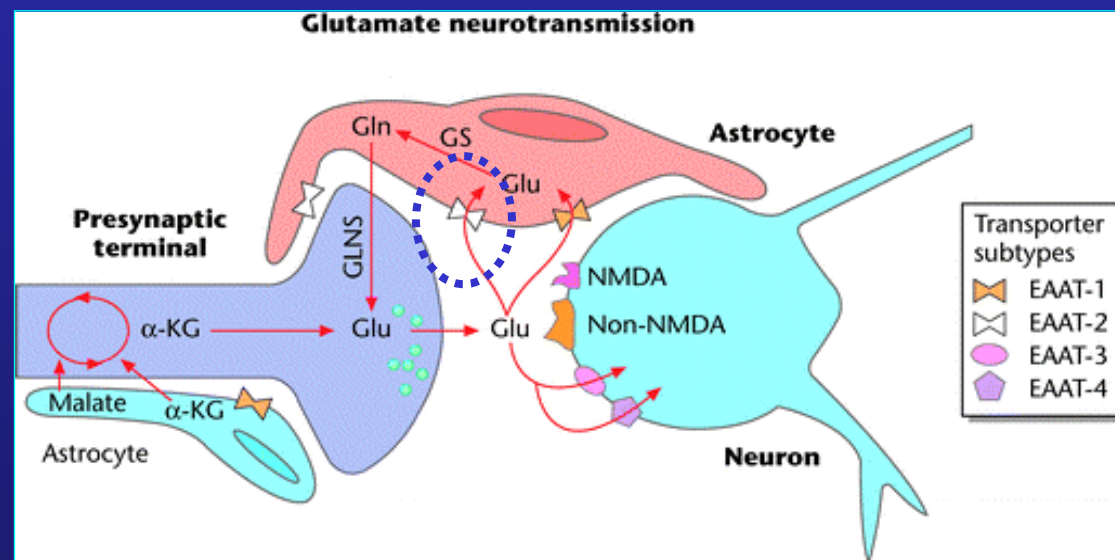
Apoptosis

Agregación de proteínas

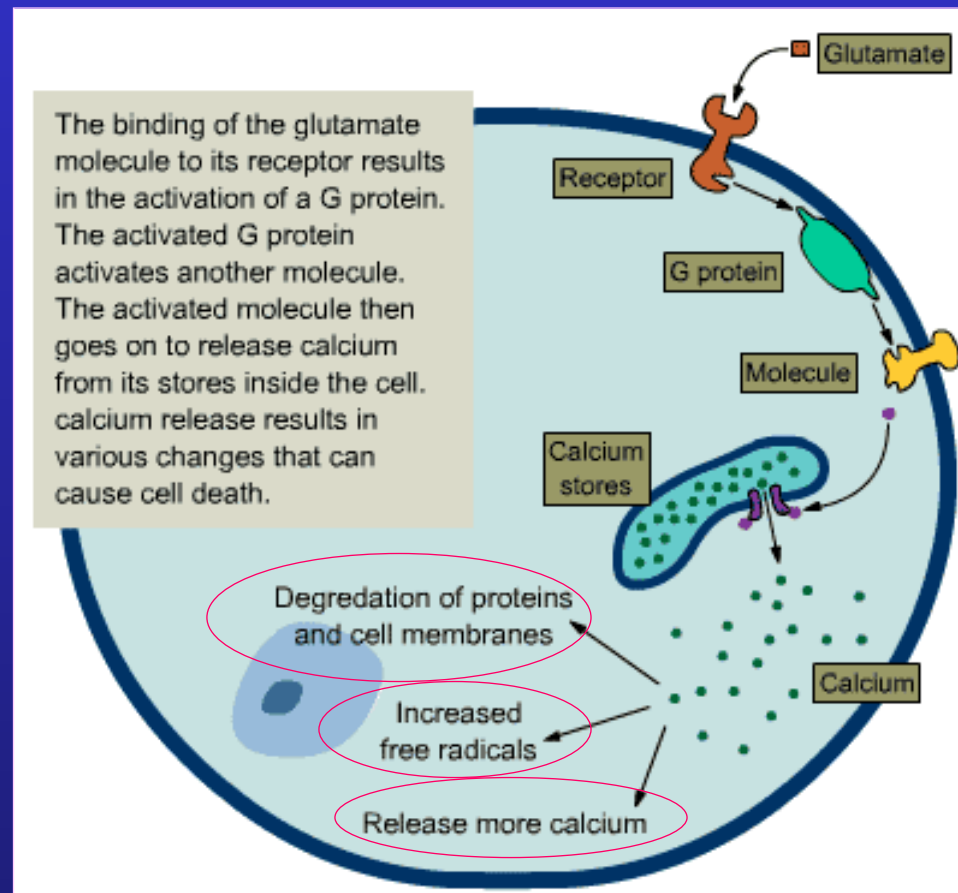
Inflamación

# 1. Excitotoxicidad

Parece haber aumento de glutamato en plasma y LCR de los pacientes y reducción de los transportadores de glutamato de los astrocitos

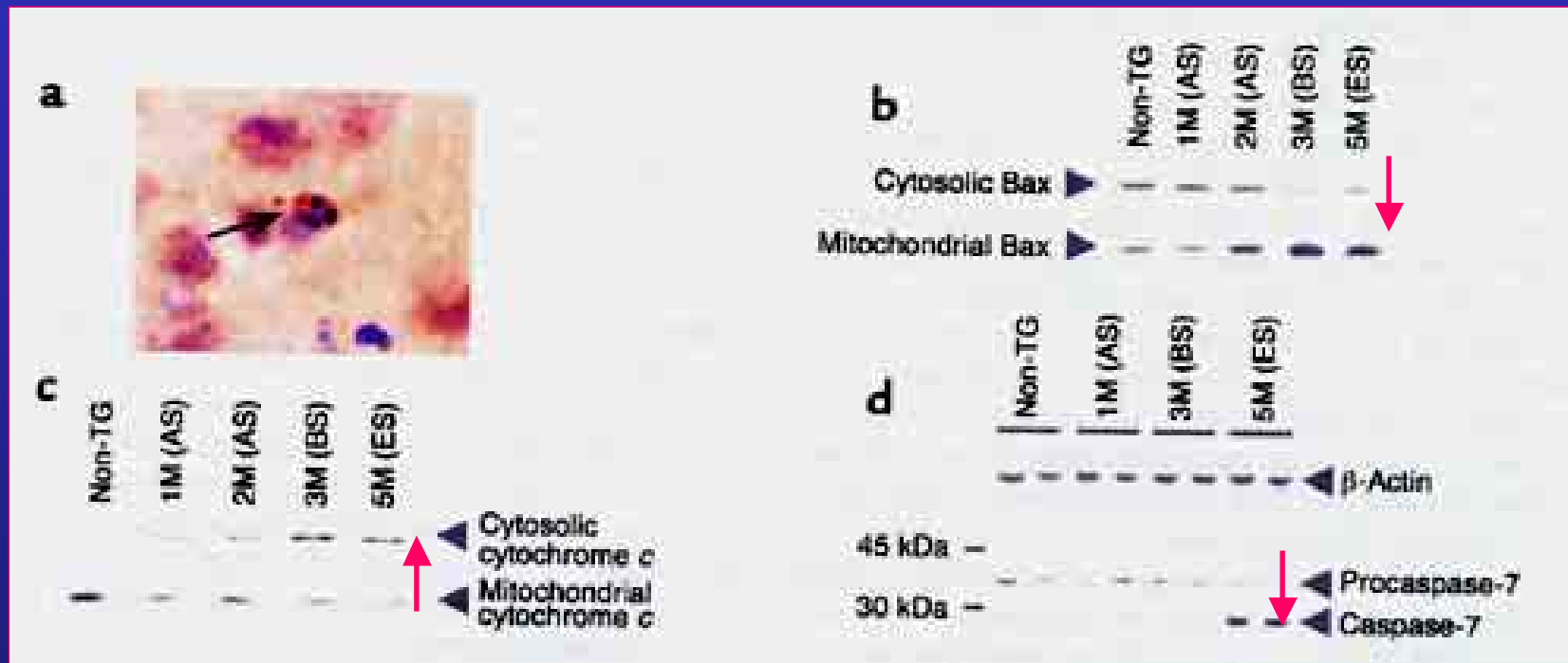






Activación de receptores de glutamato llevan aumento de calcio intracelular y a desencadenar el daño por excitotoxicidad que termina en destrucción de la neurona

## 2. APOPTOSIS en modelo de ALS



- Condensación de cromatina motoneuronas asta anterior med. esp.
- Movilización de BAX de citosol a membrana mitocondrial
- Movilización citocromo c a la inversa
- Caspasa 7 activada en el curso de la enfermedad

### 3. Proteasas y agregación de proteínas

Actividad de serino-proteasas aumentada o disregulada sistémica y en LCR en ALS

Una serino-proteasa específica, la trombina mata neuronas in vitro por activar un **receptor activado por proteasa (PAR-1)** que por vías de señalización:

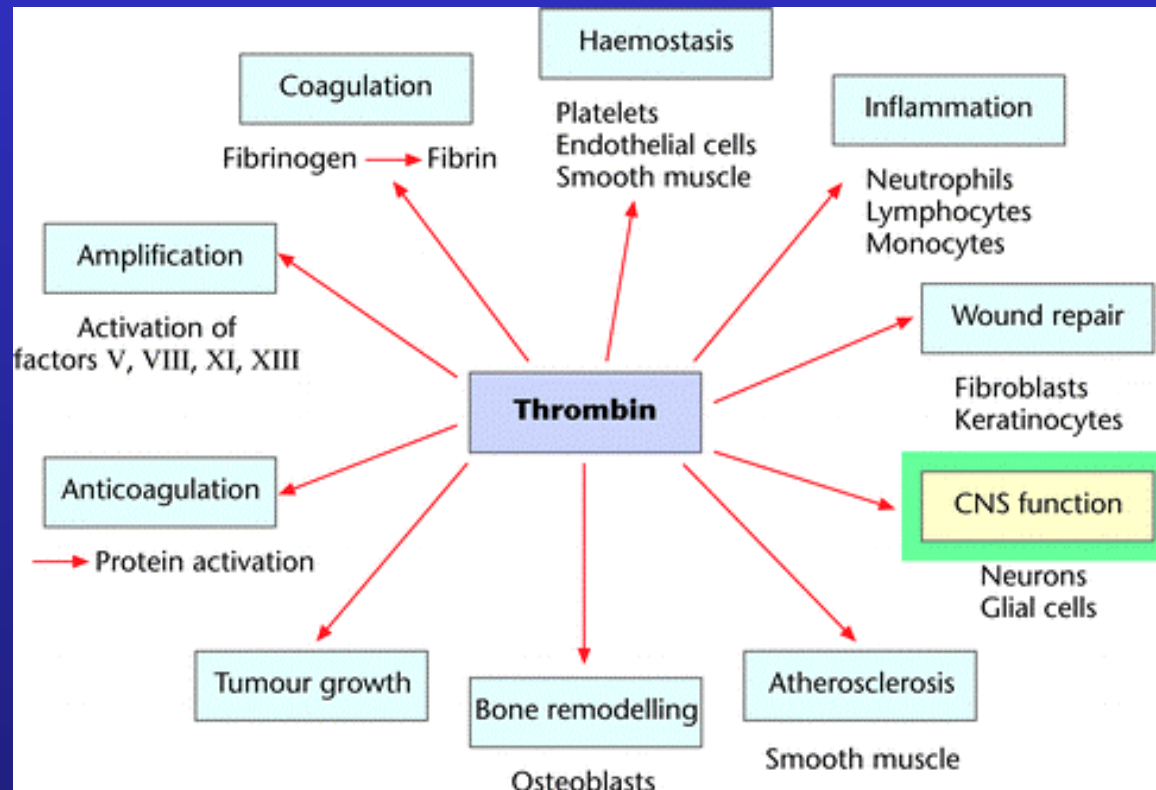
- hidroliza IP

- moviliza calcio

- activa MAPK

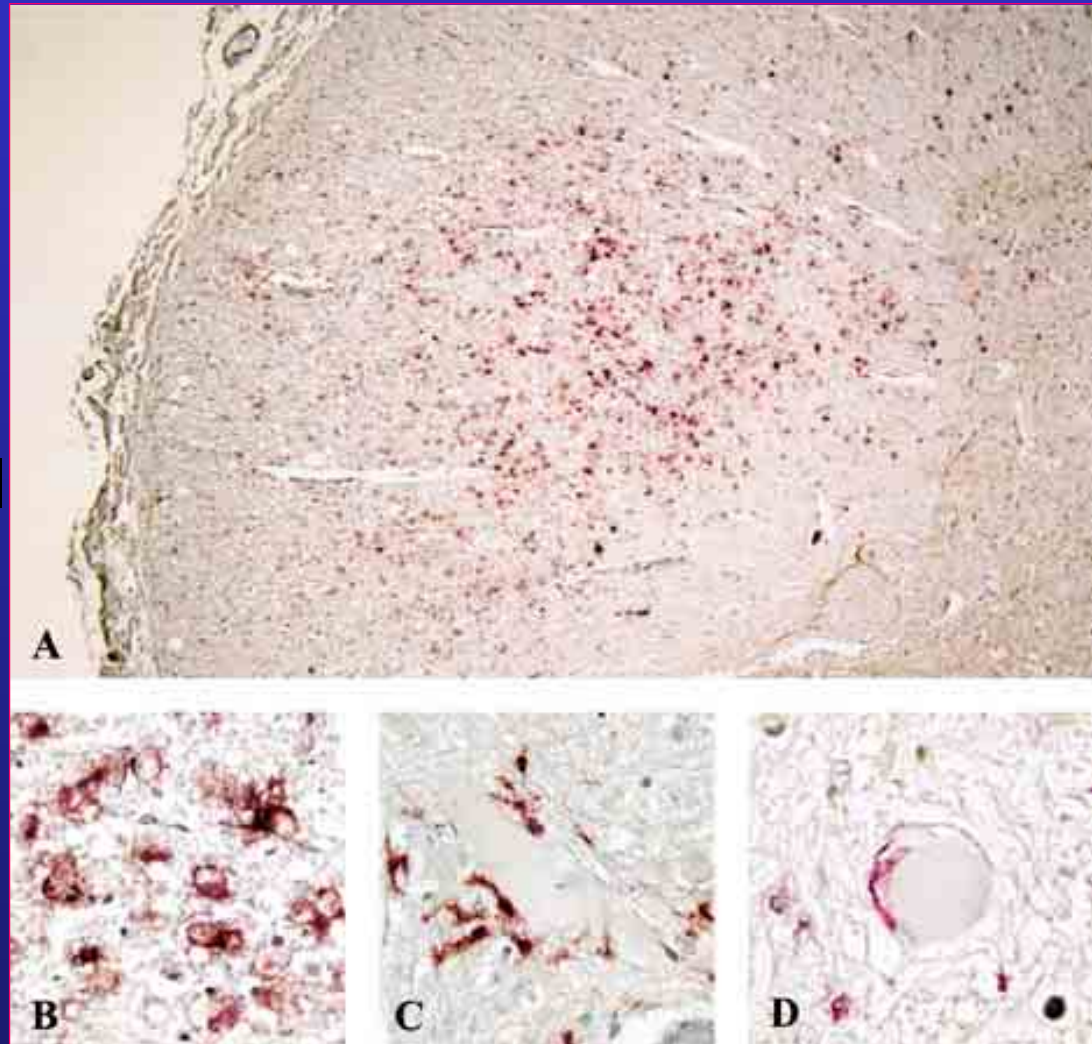
- proteínas G pequeñas como ras y caspasa 3

La característica más notoria de neuronas sobrevivientes es la **agregación de proteínas** precipitación y presencia de **cuerpos de inclusión**



Serina proteasas como trombina activan un receptor activado por proteasas (**PAR-1**) que está acoplado a vías de señalización que hidroliza inositol fosfato, moviliza  $\text{Ca}^{++}$  y activa MAPK, ras y caspasa 3

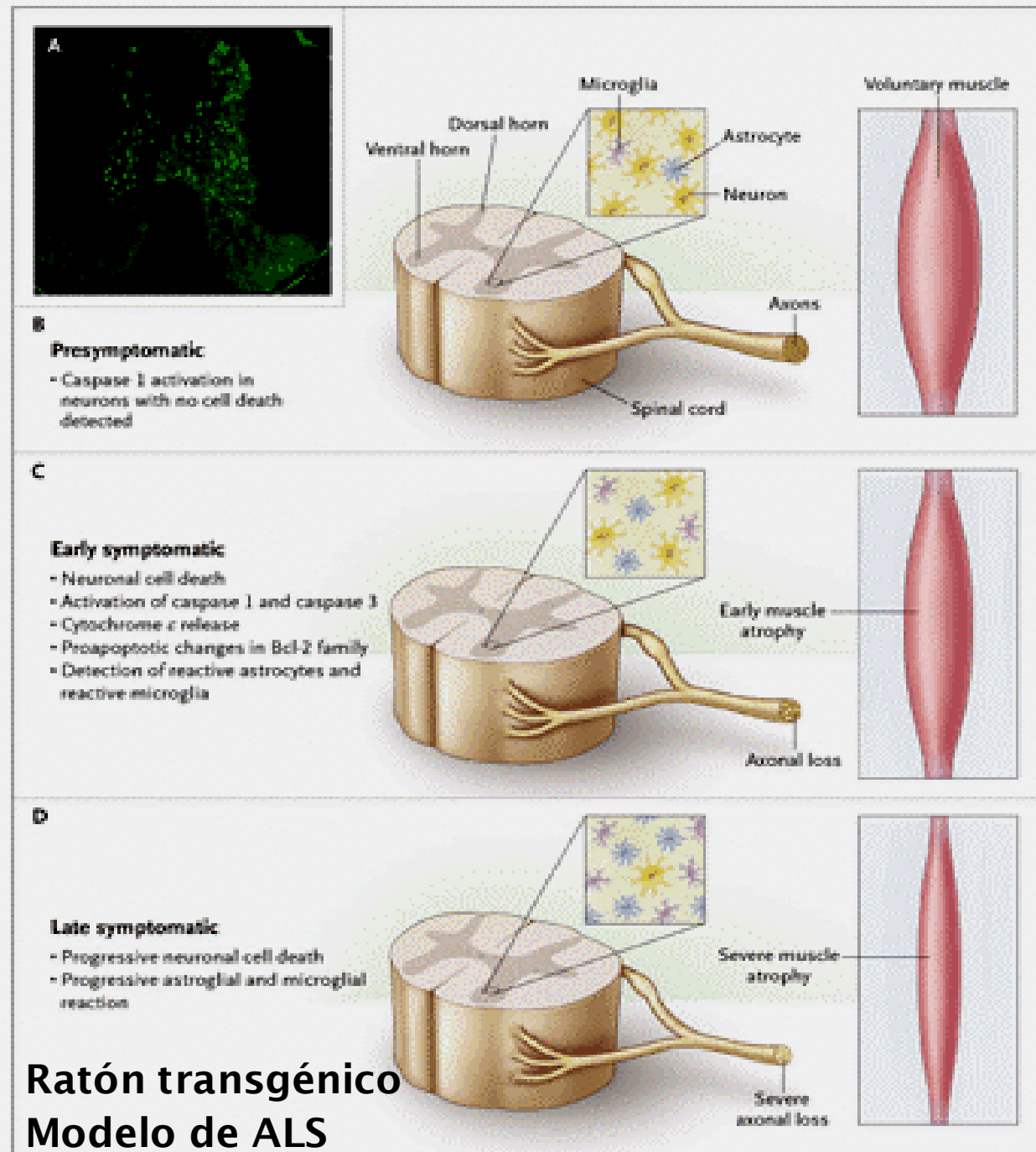
4. Activación  
microglial  
en ALS  
médula espinal



**Progresiva  
muerte  
neuronal**

**Progresiva  
atrofia  
muscular**

**Progresiva  
activación  
glial**



## \* Genética

En 2% de casos hay **mutaciones del gen SOD1** que llevan a agregación, afectan el transporte celular y finalmente mata las motoneuronas

**ALS1** fue el primer gen identificado en **1993** en el cromosoma 21 y se identificó como **Cu-Zn SOD1** asociado con la forma dominante familiar

**ALS2** asociado con la forma recesiva juvenil

## SOD1 mutada

La enzima antioxidante mutada NO pierde actividad enzimática

La forma familiar se ha propuesto ocurre por “ganancia tóxica” de SOD1 con acumulación de peroxynitrito -ONOO



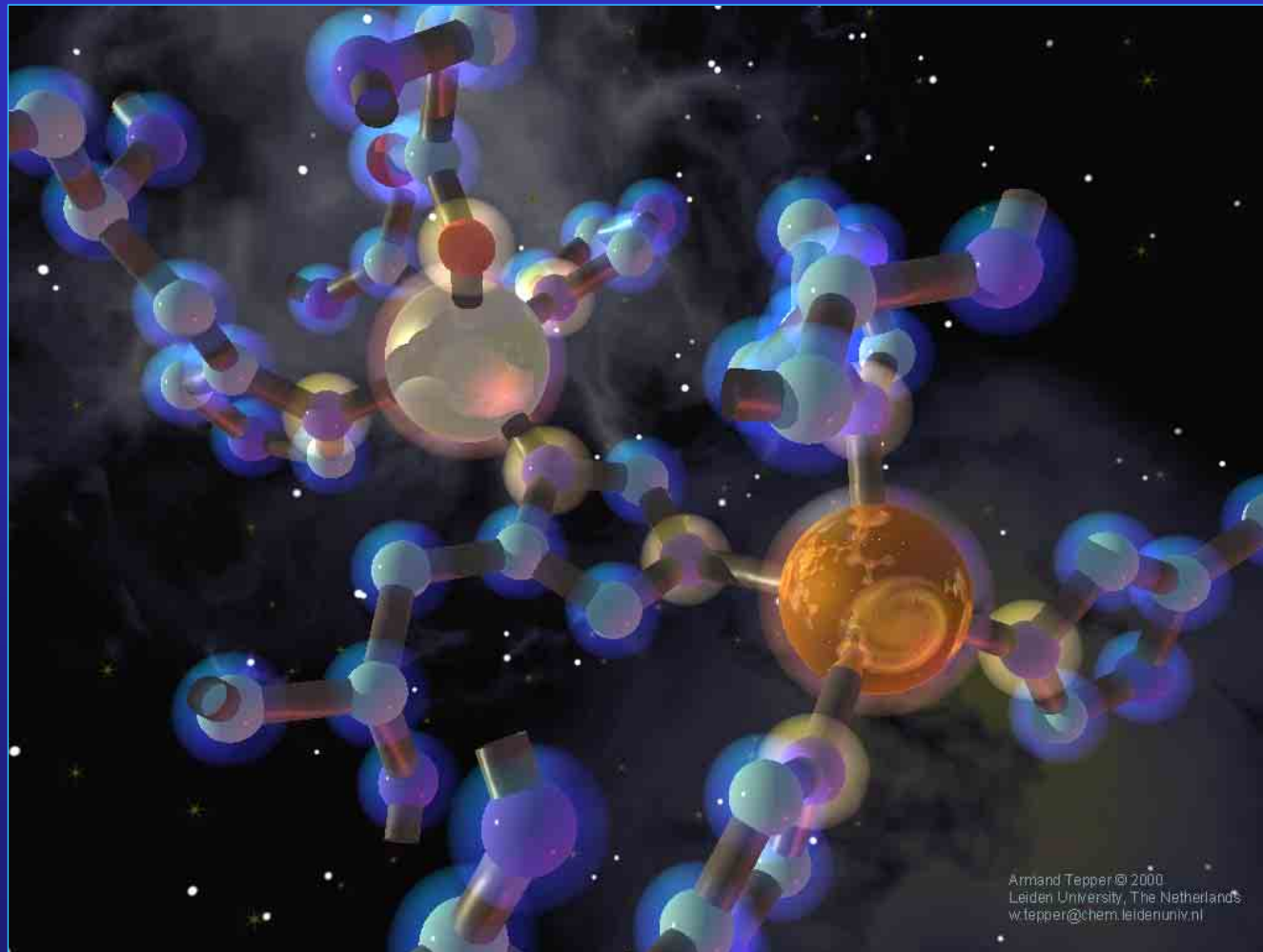
**SOD1** es una enzima que evita el daño celular causado por aniones superóxido



La Cu-Zn SOD forma un complejo proteico grande, porque la proteina mutada tiene forma alterada que afecta el enlace como otras proteinas

El estres oxidativo con perdida de metales y agregacion de proteinas afecta el transporte en las motoneuronas

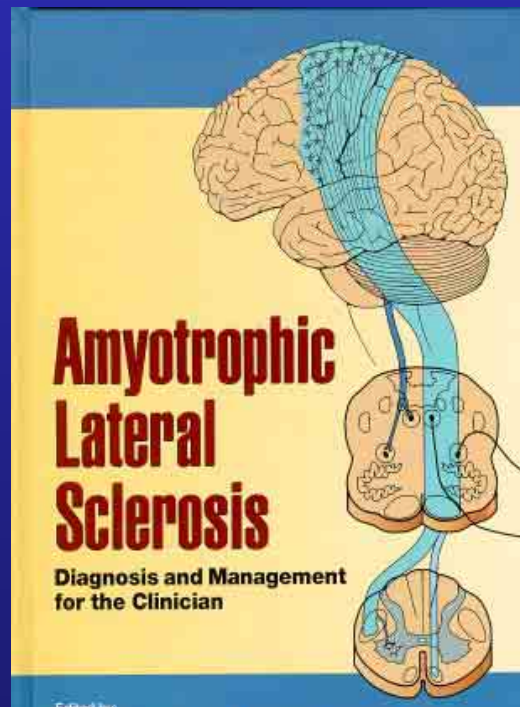
*3D crystallography ALS familiar*  
(Natural Structural Biology, June 2003 )



# SOD1 sitios activos

# MODELO ANIMAL

## Mutación Cu/Zn SOD1



Cerebro

Bulbo

Médula espinal

Vía motora corticoespinal

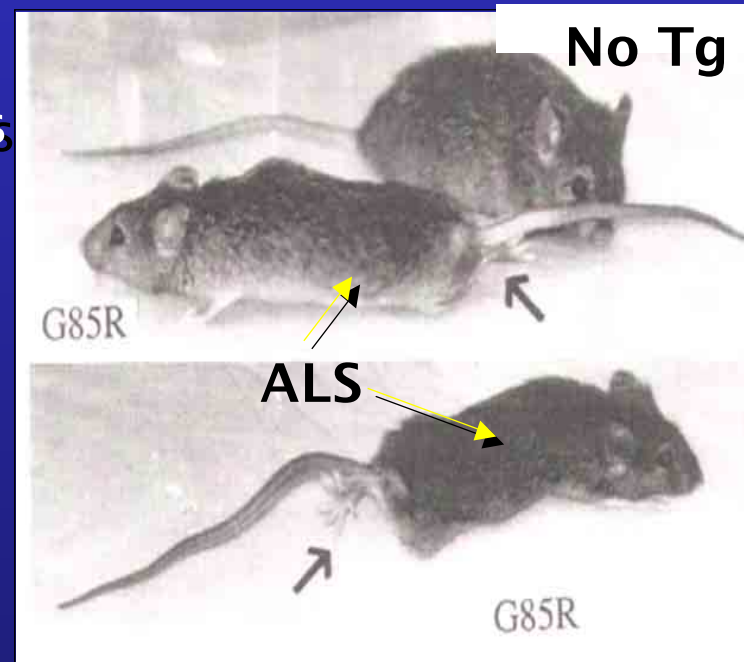


# Modelo ALS ratones

La sobreexpresión de **mutación SOD-1** reproduce las características clínicas y patológicas de la enfermedad humana

La enfermedad **comienza** a los **90 días** de edad y la **muerte** ocurre **30 días** más tarde

Los posibles agentes terapéuticos se pueden probar en este modelo



# Modelo ALS ratas Japón



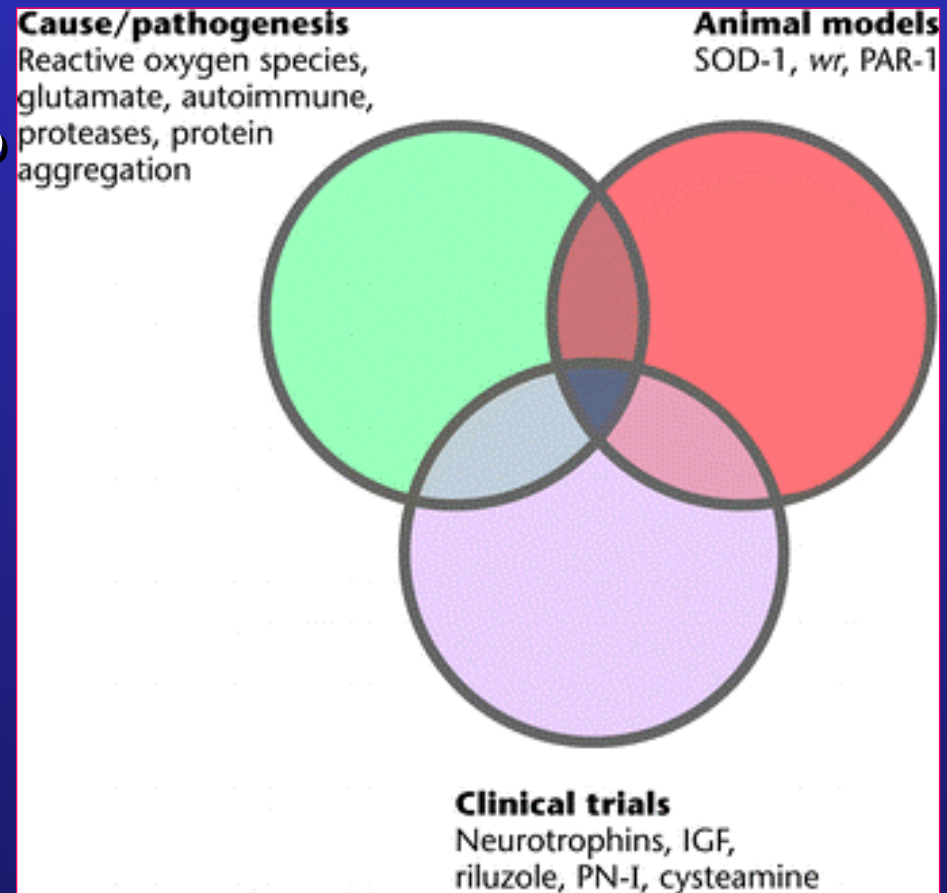
SOD トランスジェニックラット

Tres frentes de progreso  
en la investigación en  
ALS:

Etiopatogenia

Modelos animales

Ensayos clínicos



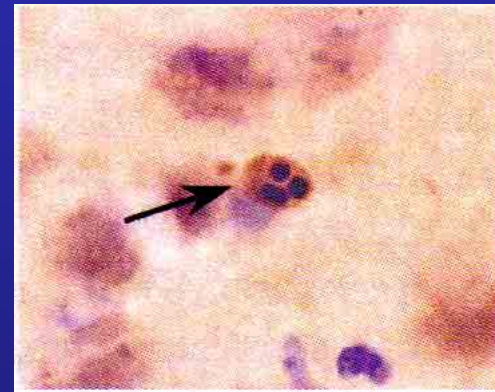
# Investigación ALS

- Mutaciones SOD-1 en modelos animales con aumento de ROS
- Reducción factores neurotróficos
- Aumento de apoptosis

Hasta ahora

NO hay causa conocida

NO hay cura



Apoptosis  
en en ALS



# Terapia propuesta en ALS

1. Combatir neurotoxicidad
2. Antioxidantes
3. Reducir apoptosis
4. Aumentar factores neurotróficos

## FACTORES NEUROTRÓFICOS

Son candidatos a usar en ALS y otras enfermedades neurodegenerativas

Ellos tiene que ser administrados en el SNC. Pero esto ha sido difícil

# Tratamientos posibles

## 1. Drogas antiglutamato:

**Riluzole** (Rilutek)

Es la **única droga** aprobada FDA para pacientes, mostró aumento de 3-4

meses

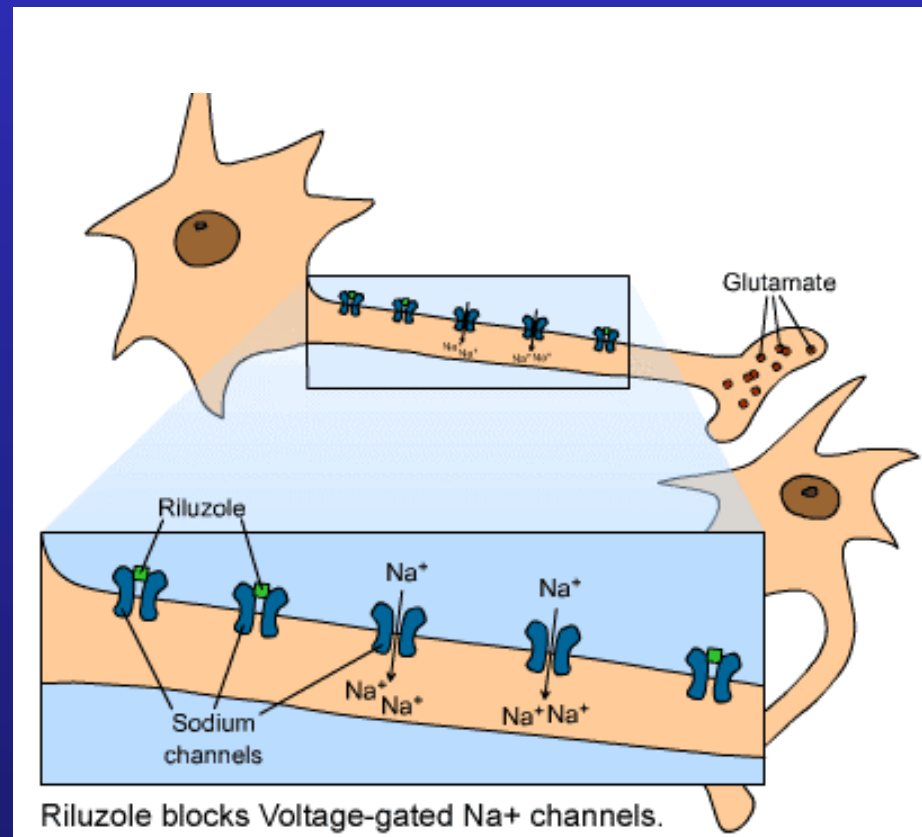
de sobrevida!

## 2. Terapia de apoyo, antidepresores, relajantes

## 3. Factores neurotróficos:

GH, BDNF, CNF, IGF1

## Acción del Riluzole



Inhíbe la liberación de glutamato por  
bloquear canales de sodio

# Descubrimiento!!

Los vectores virales adeno-asociados (rAAV) pueden ser transportados **retrógradamente!!**

DE: terminales presinápticos  
A: núcleos en los cuerpos neuronales

Esto puede proveer entrega continua de genes...



## Propósito:

Transporte de factores de crecimiento a motoneuronas usando vectores rAAV en el modelo ALS en ratón

**En Modelo ALS :**

**Administración de Factores  
neurotróficos**

**IGF-1**

**GDNF**

**Mediante vectores virales**

**AAV**

**Lentivirus**



## HOW did they perform the experiments?

G93A SOD-1 mice at 60 or 90  
of age were intramuscular injected with:

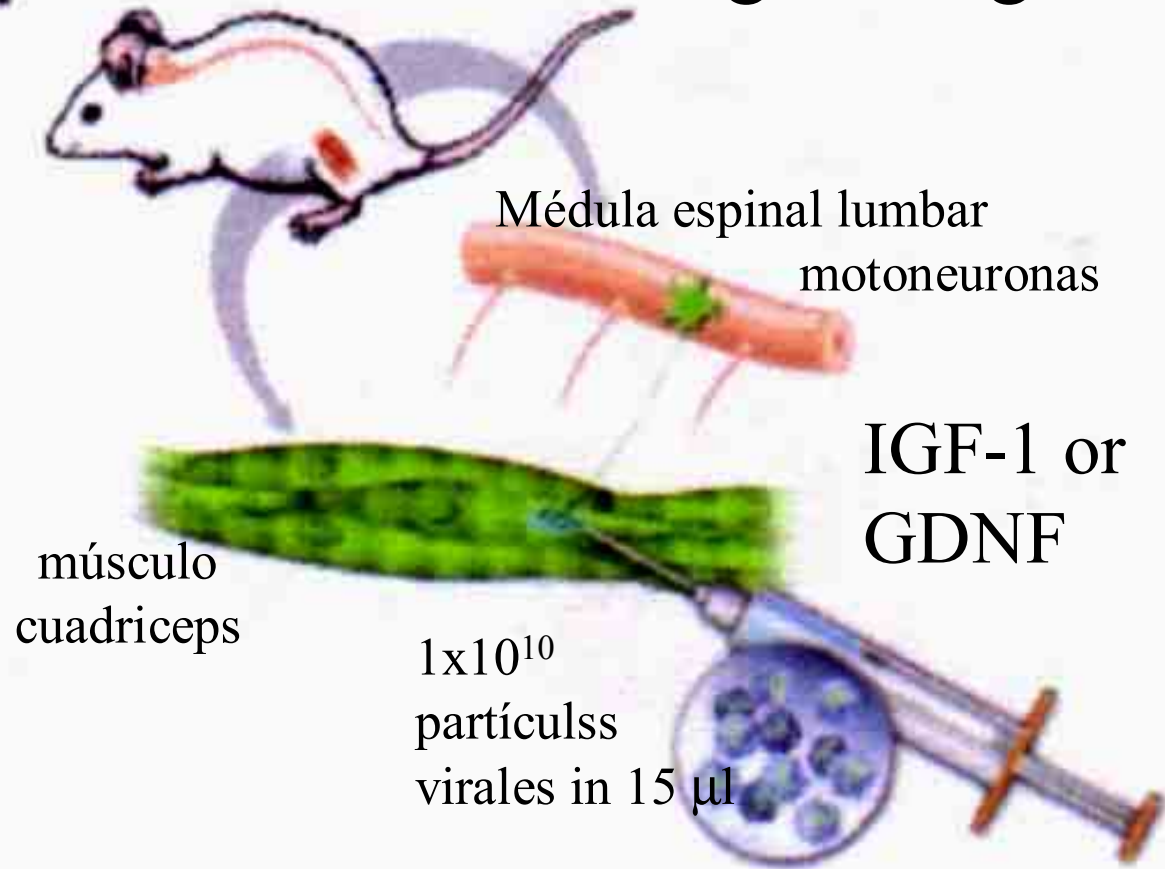
1. AAV-GFP control
2. AAV-GDNF growth factor
3. AAV-IGF-1 growth factor
4. LV-IGF-1 growth factor

## HOW did they perform the experiments?

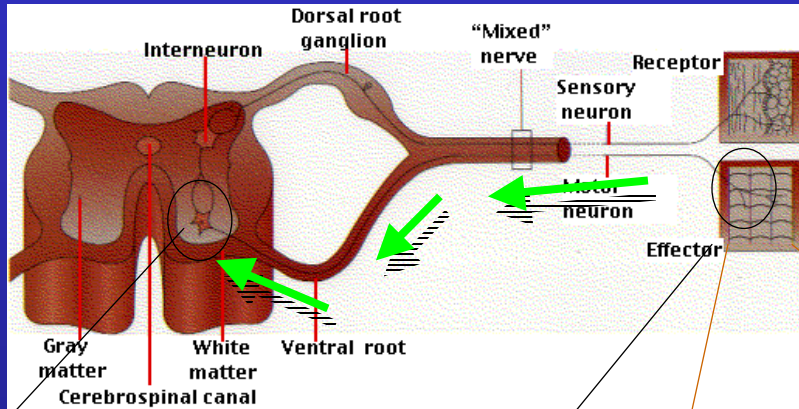
- Survival and weight were checked daily
- Motor function weekly
- ONSET : one hind limb displayed weakness
- DEATH: inability to right in 30 sec
  
- Eutanathization and removal of spinal cord for histopathology

**A**

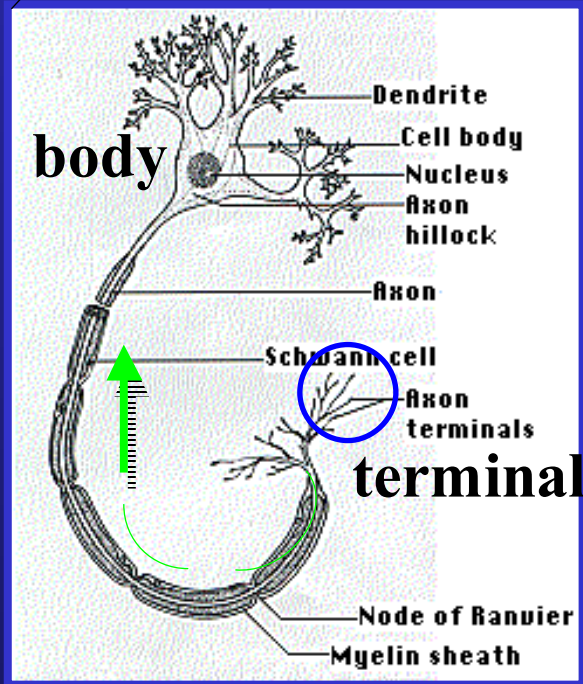
# Entrega retrógrada



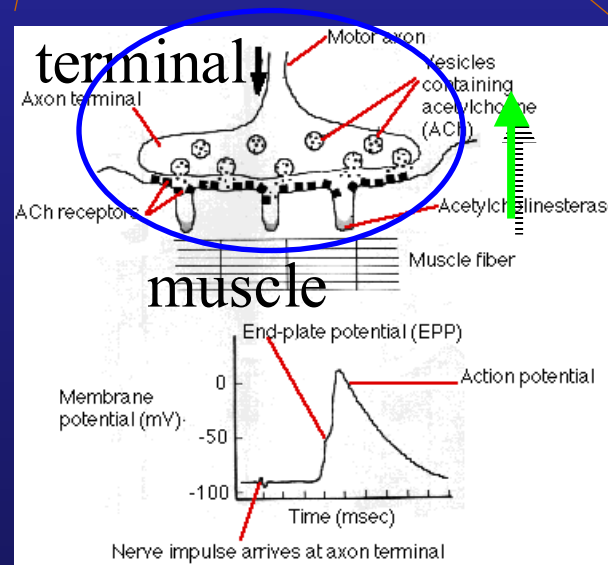
# SPINAL CORD



Retrograde  
Axonal transport



MOTONEURON

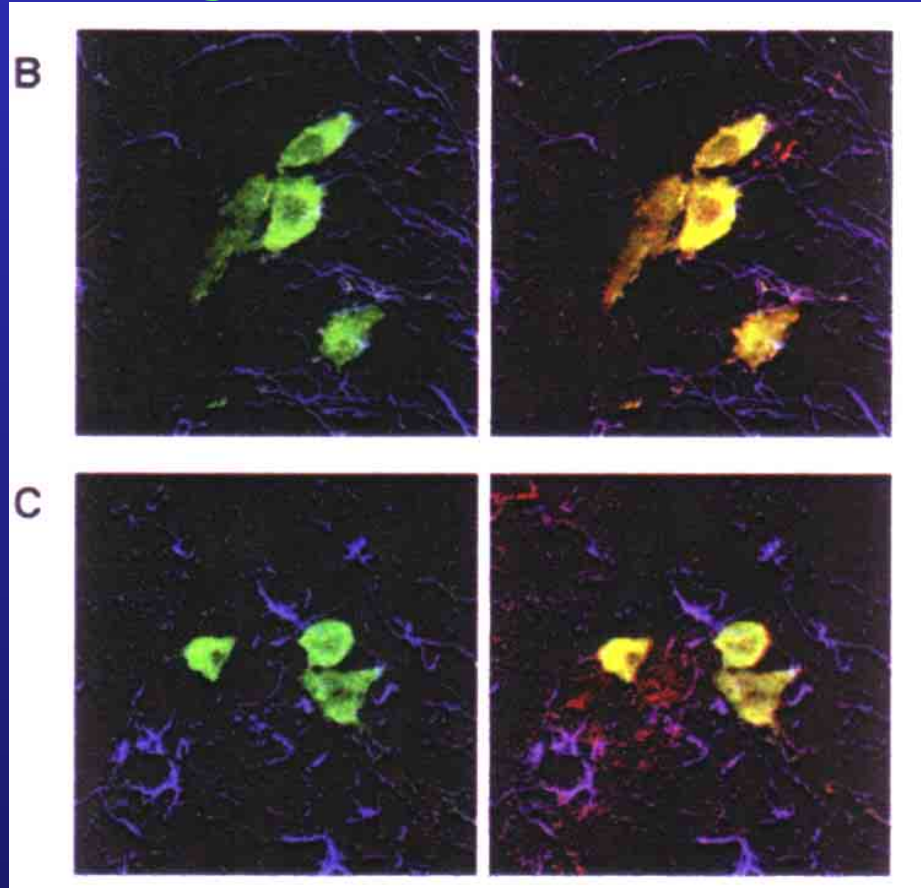


Neuromuscular  
junction

# Resultados

GFP expression in CHAT motoneurons  
(green) (red)

Lumbar  
spinal  
cord



Thoracic  
spinal  
cord

## Resultados

Presence of **GFP** in lumbar spinal cord  
by PCR

Minimun  $1 \times 10^{10}$  particles



Dose response for retrograde transport  
1.1% of injected particles were transported!!

# Neurotrophic factors delivered

## Insulin growth factor (IGF-1)

Hormone synthesized by liver, *somatomedina*, immediate stimulus for growth.

Trophic action on muscles.

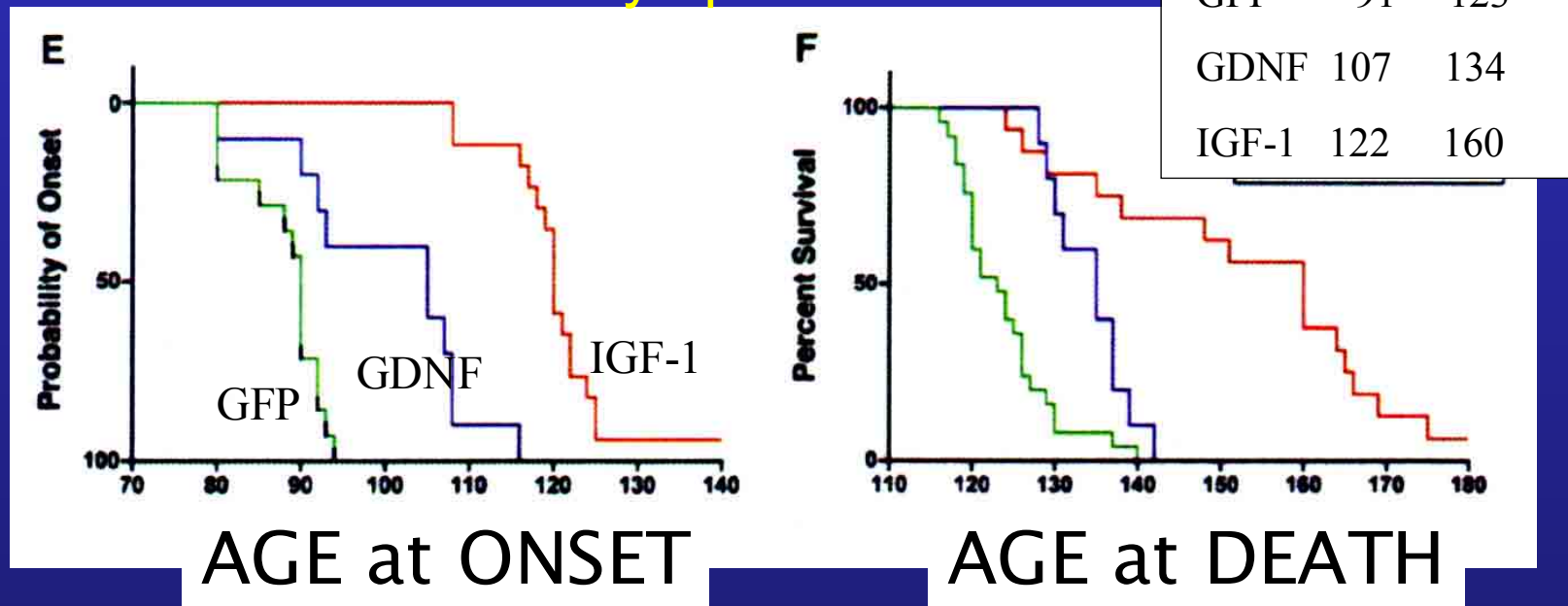
Binds on cells receptors and triggers inhibition of apoptosis



## Glial derived growth factor (GDNF)

# Resultados

AAV injected at 60 days of age  
**BEFORE ONSET** of symptoms



**IGF-1 delays symptoms  
and increases survival**

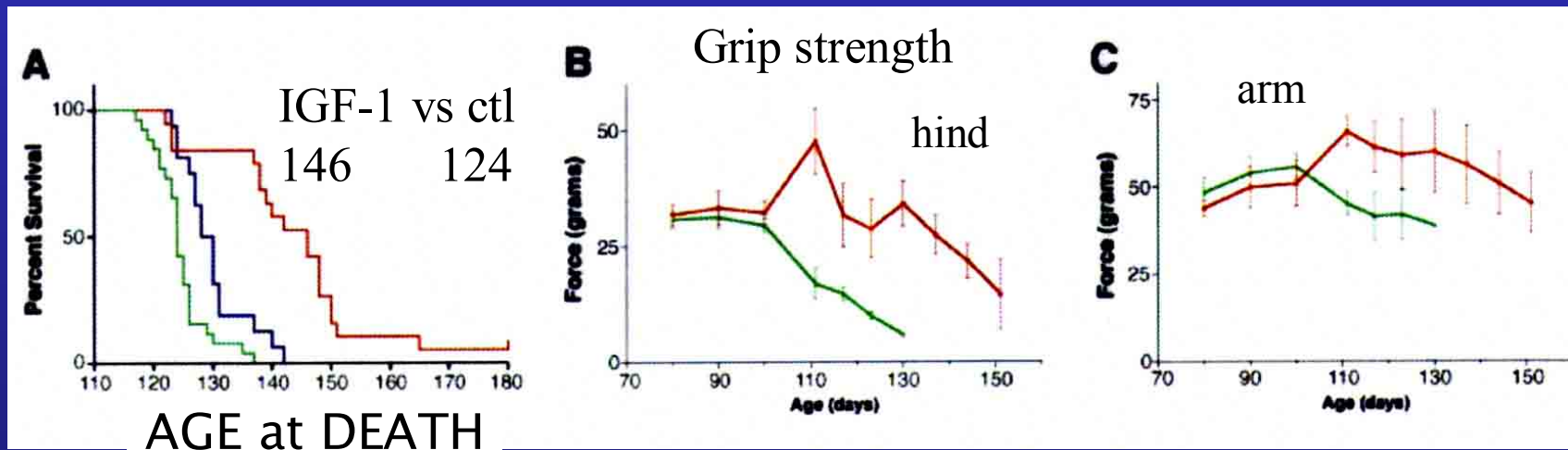


# Results

AAV injected at 90 days of age

**AT ONSET** of symptoms

Neuromuscular function

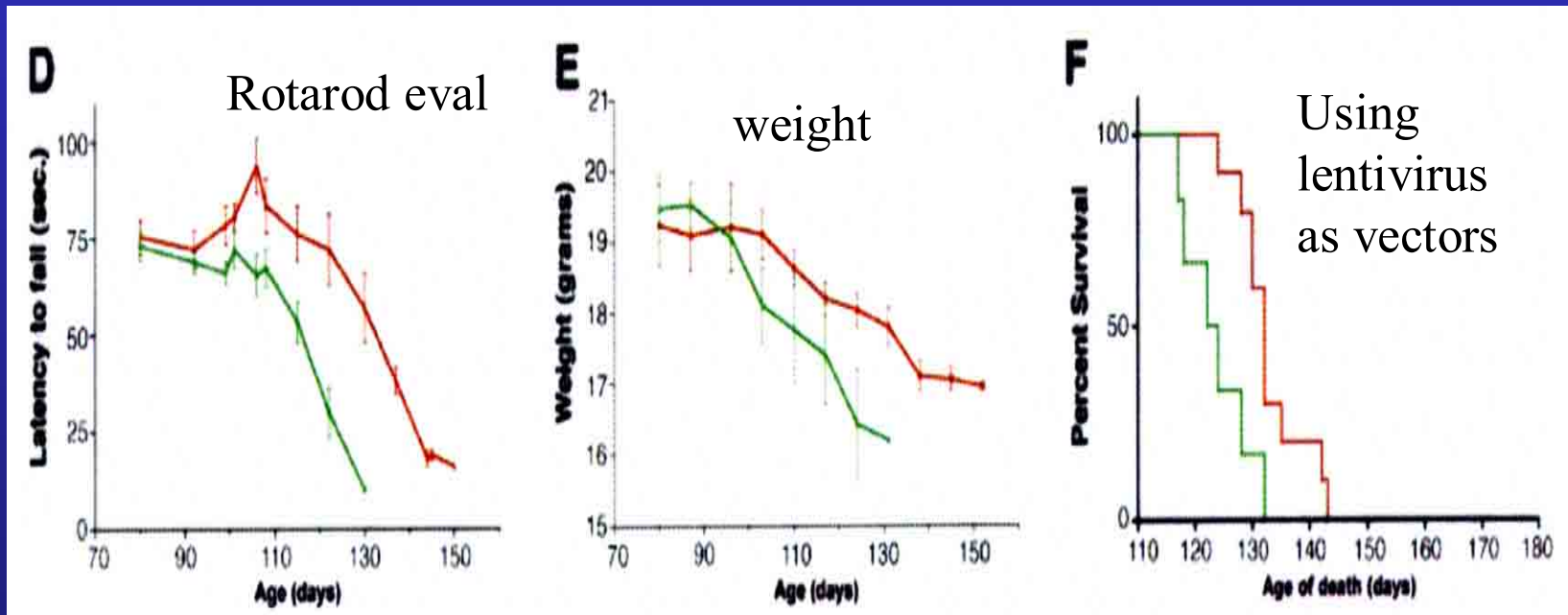


**IGF-1 increases survival**

With **IGF-1**  
decreases 20d later

# Results

## Neuronal function



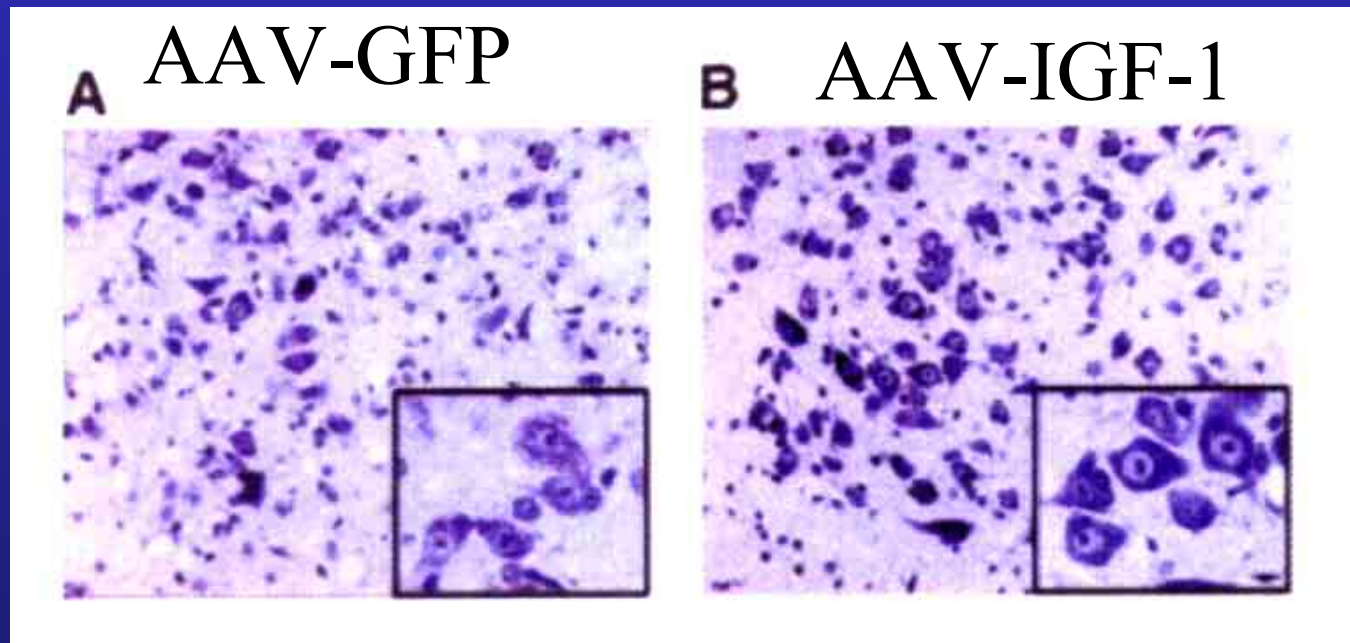
With **IGF-1**  
decreases 20d later

With **IGF-1**  
The weight is  
maintained  
longer

**IGF-1** with lentivirus  
increases survival  
only 9d vs **22 d** with **AAV**

# Resultados

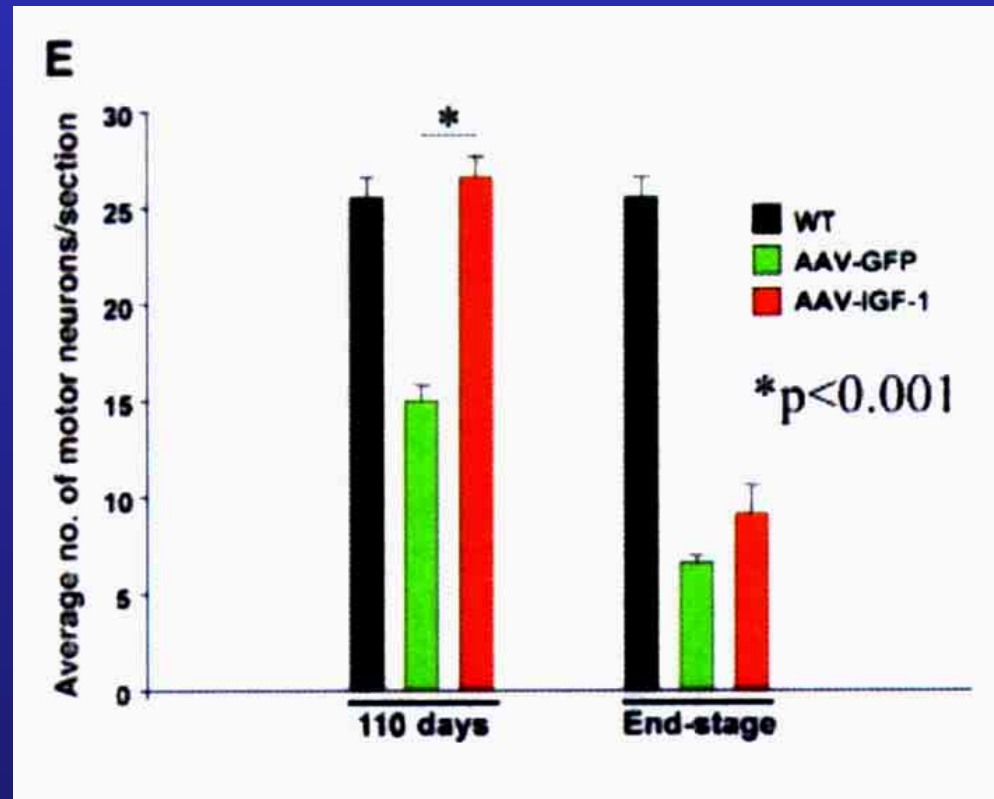
## Histopathological evaluation



**IGF-1** prevented cellular vacuolization at 110 d of age

# Resultados

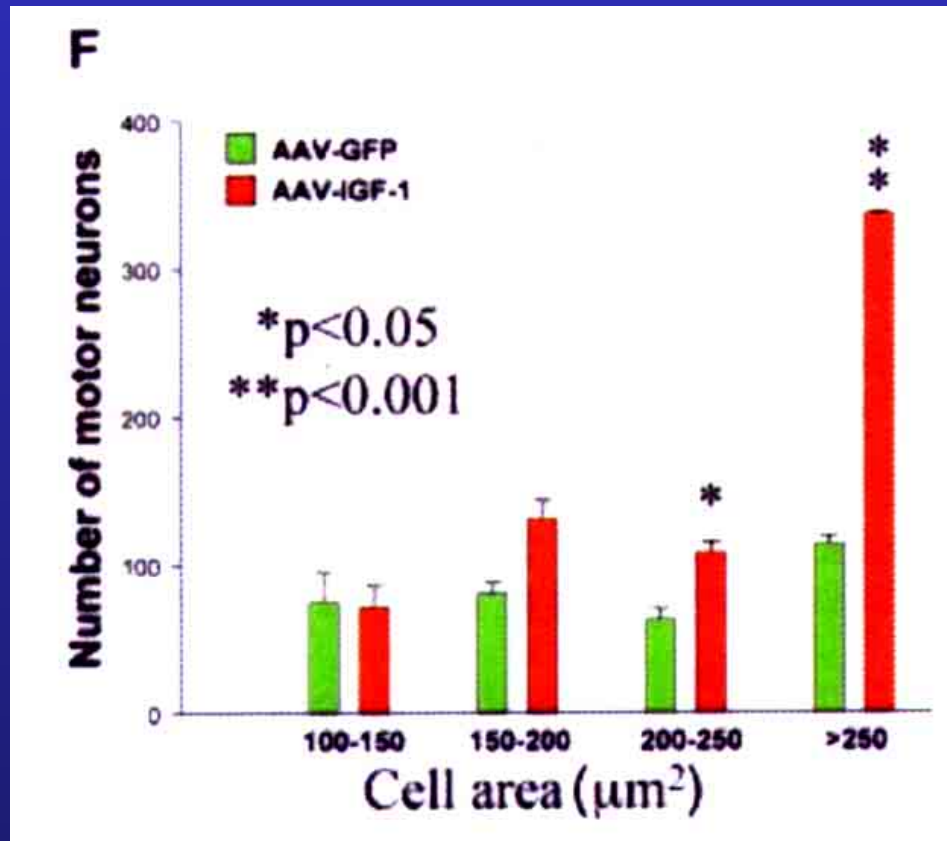
## Quantification of surviving neurons



w/**IGF-1** the number of neurons is similar to wild type mice at 110 d of age

# Resultados

## Morphometric analysis at 110 d of age

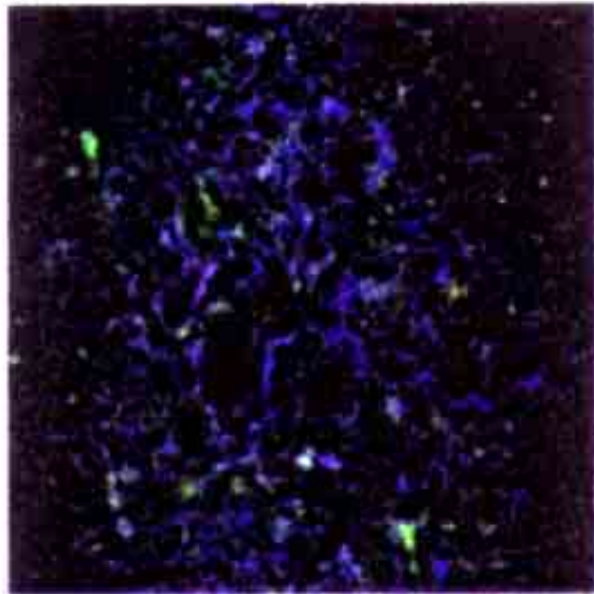


IGF-1 preserved 66% of large motoneurons, the most vulnerable ones

# Resultados

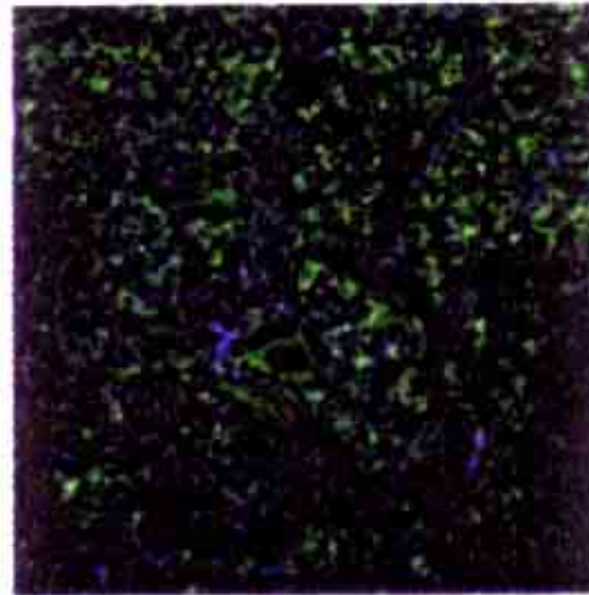
Immunohistochemistry at 110 d of age

C AAV-GFP



GFAP blue

D AAV-IGF-1

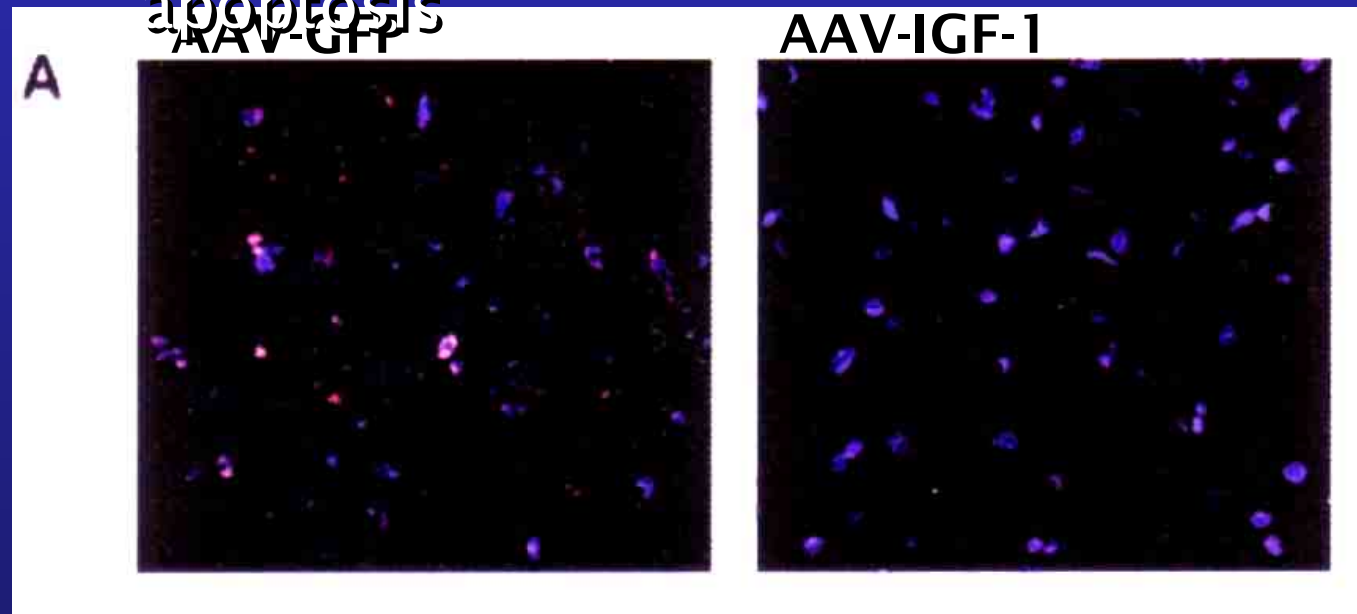


Neurofilament marker  
green SMI 32

w/ IGF-1  
More  
Neurons  
Less gliosis

# Resultados

**AAV-IGF-1** treatment inhibits  
apoptosis

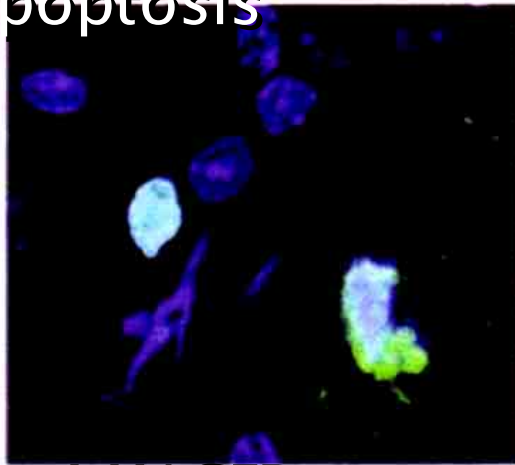


TUNEL staining for apoptosis  
(red)

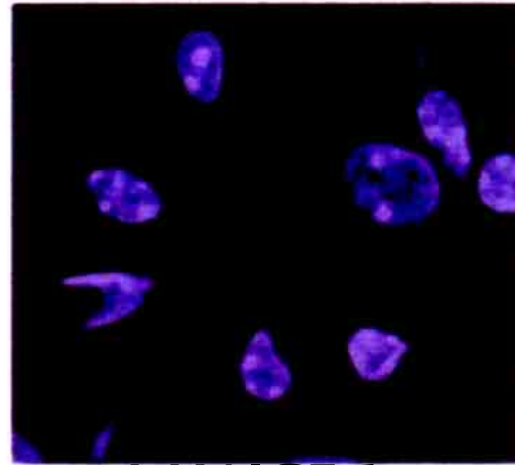
# Results

AAV-IGF-1 treatment inhibits

B apoptosis



AAV-GFP



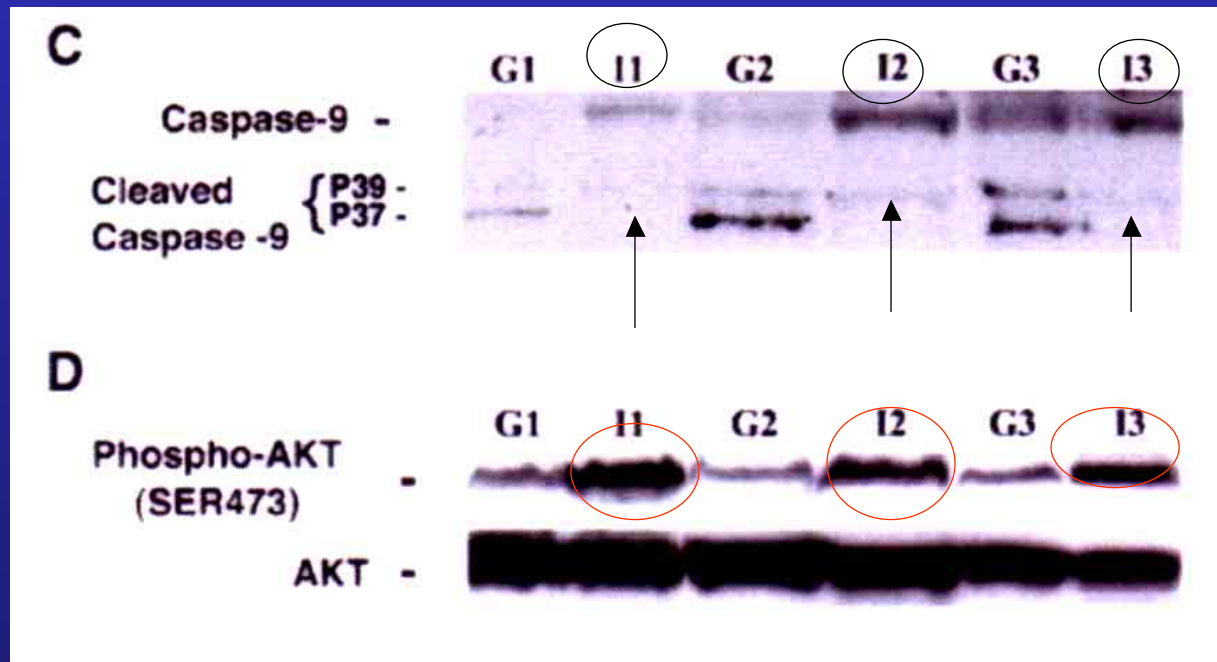
AAV-IGF-1

Active caspase-3 (green)



# Results

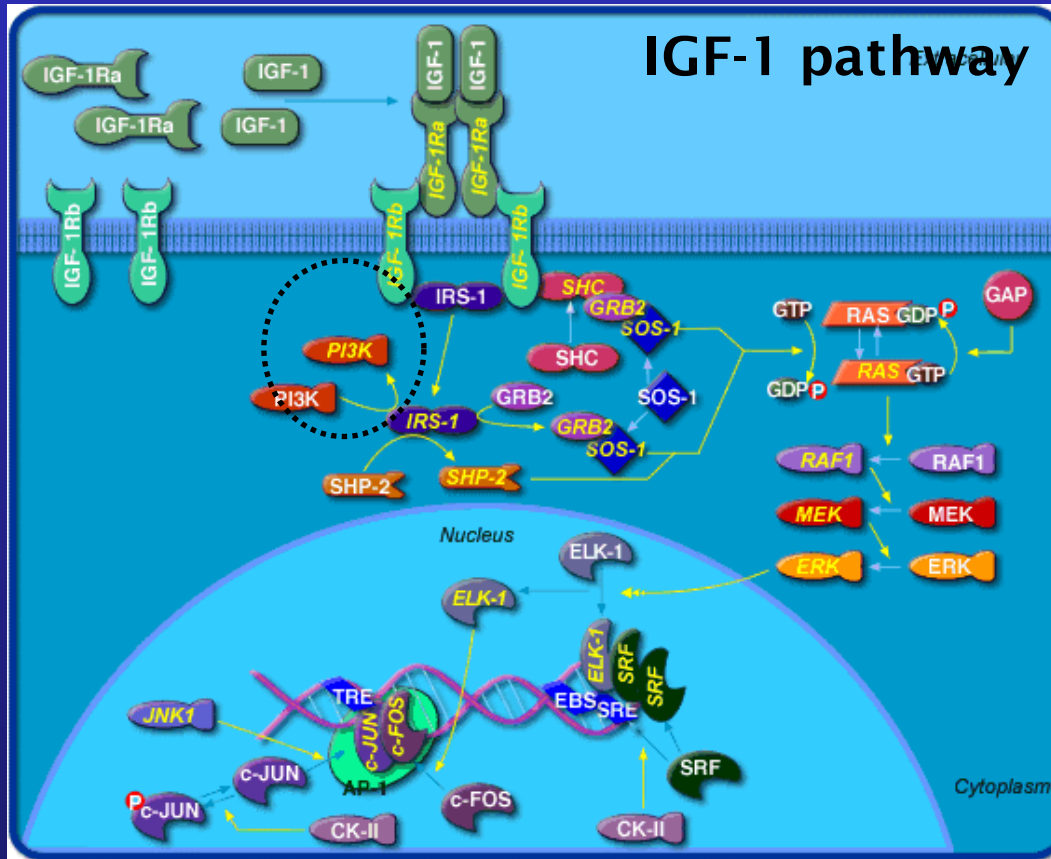
## AAV-IGF-1 treatment inhibits apoptosis



Cleaved caspase-9 is less evident w/IGF-1

IGF-1 increases Akt phosphorylation

# Resultados



**IGF-1**  
Inhibits apoptosis  
pathways  
through PIK3

# Conclusion

- AAV vectors successfully retrogradely delivered neurotrophic factors to motoneurons
- IGF-1 treatment delayed the onset of symptoms and prolong the survival of ALS mice
- IGF-1 inhibited apoptosis
- IGF-1 did not work well using lentivirus
- GDNF treatment only delayed the onset of symptoms



**NEXT the clinical trial...**

# Posibles mecanismos y posibles terapéuticas a nivel molecular

