

La acumulación progresiva de ovillos neurofibrilares compuestos por tau truncada en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ se relaciona con la gravedad clínica en la enfermedad de Alzheimer

Gustavo Basurto-Islas¹, Norma Barragán-Andrade¹, José Luna-Muñoz², Raúl Mena-López² y Francisco García-Sierra¹

¹Departamento de Biología Celular.

²Departamento de Neurociencias.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Ciudad de México. México.

Actividad acreditada por:



COMISIÓN DE FORMACIÓN CONTINUADA
DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD



CONSELL CATALÀ DE FORMACIÓ MÈDICA CONTINUADA



Para realizar la actividad de formación continuada debe dirigirse a www.revistaalzheimer.com/formacion.asp

Resumen

Una de las principales alteraciones de la proteína tau que promueve su agregación patológica en la enfermedad de Alzheimer (EA) es su proteólisis endógena en los residuos Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹. Estas modificaciones facilitan su polimerización *in vitro*, y, en el cerebro de individuos con la EA, dicha proteína truncada se agrega en forma de filamentos anormales constituyendo los ovillos neurofibrilares (ONF). Se ha considerado que la proteína tau truncada podría ser citotóxica, no sólo por constituir los ONF, sino también por su capacidad de promover el proceso de apoptosis. Sin embargo, son poco conocidos el significado clinicopatológico de estas truncaciones y su impacto en el deterioro cognitivo de los pacientes con EA. Para un mejor entendimiento, en el presente trabajo de investigación se estudió una población de pacientes ingleses que padecieron la EA con diversos grados de gravedad clínica de la demencia y ancianos no dementes (individuos de control). Se demostró que existe una correlación inversa entre la presencia de ONF constituidos de la proteína tau truncada en Asp⁴²¹ o Glu³⁹¹, con respecto al deterioro cognitivo, evaluado mediante dos de las principales pruebas de diagnóstico clínico en vida: el Mini-Mental State Examination (MMSE) y el Cambridge Cognitive Examination (CAMCOG). Estos resultados comprueban el impacto clinicopatológico de la truncación de la proteína tau en la EA.

Abstract

Cleavage of tau protein at Asp⁴²¹ and Glu³⁹¹ residues is one of the main alterations that promote its self-aggregation in Alzheimer's disease (AD). These truncations enhance the rate of tau polymerization *in vitro* and the occurrence of tau polymers in the brain of AD cases, which later coalesce into neurofibrillary tangles (NFTs). The Glu³⁹¹ and Asp⁴²¹ cleavage of tau has been considered cytotoxic, not only because it forms NFTs, but also because of its capacity to induce programmed cell death (apoptosis). To date, the clinical relevance of tau truncated at Glu³⁹¹- or Asp⁴²¹ along the neuropathological progression and the cognitive impairment in AD patients is still largely unknown. To address this issue, our study analysed a population of elderly British patients who had suffered from AD at various levels of clinical severity, as well as some non-dementia elderly (as controls). A significant inverse correlation was shown between the expression of tau truncated at Glu³⁹¹ and Asp⁴²¹ in NFTs and cognitive impairment, evaluated in life using the "Mini-Mental State Examination" (MMSE) and the "Cambridge Cognitive Examination" (CAMCOG). These results corroborate the clinical importance of tau protein truncation in AD.

(*Alzheimer. Real Invest Demenc.* 2009;42:41-44)

Keywords: Alzheimer's disease, tau protein, neuropathology, tau proteolysis, caspases.

Basurto-Islas G et al. La acumulación progresiva de ovillos neurofibrilares compuestos por tau truncada en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ se relaciona con la gravedad clínica en la enfermedad de Alzheimer

(Alzheimer. Real Invest Demenc. 2009;42:41-44)

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, proteína tau, neuroanatomopatología, proteólisis de tau, caspasas.

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central para la cual no existen tratamientos preventivos o curativos, que afecta al 7-10% de los individuos mayores de 65 años. Las características clínicas de esta enfermedad son ocasionadas por la muerte neuronal en áreas específicas del cerebro, afectándose principalmente la isocorteza temporal, la corteza entorrinal y la formación del hipocampo.

La afectación de estas áreas se debe principalmente a la presencia de estructuras patológicas en el tejido cerebral, como placas neuríticas, filamentos de neuropilo y ovillos neurofibrilares (ONF). Estos últimos están constituidos por filamentos helicoidales insolubles que se acumulan progresivamente en el interior de las neuronas promoviendo su muerte. Estos filamentos helicoidales se conforman por una proteína de asociación a microtúbulos denominada tau, la cual, en la EA, sufre diferentes modificaciones postraduccionales anormales, como su proteólisis endógena, que promueve su autoagregación e incrementa su velocidad de polimerización¹, lo que a su vez facilita la formación de dichos ovillos. La proteólisis de tau se identificó analizando el componente mínimo de los filamentos helicoidales, los cuales fueron sometidos a tratamientos enzimáticos, con lo que se liberó un fragmento de la proteína tau truncada en el aminoácido ácido glutámico-391 (Glu³⁹¹), el cual fue reconocido por el anticuerpo MN423². Esta truncación presente en los ONF pareció ser relevante con respecto a la gravedad de la EA³. Otros estudios han descrito una nue-

va truncación de la proteína tau que ocurre en el aminoácido ácido aspártico-421 (Asp⁴²¹), generada por la acción proteolítica de caspasas⁴. Se ha demostrado la importancia de esta truncación por su efecto citotóxico al ser transfectada en diversas líneas celulares induciendo apoptosis y promoviendo la alteración del citoesqueleto⁵. Asimismo, utilizando un anticuerpo que reconoce esta truncación (Tau-C3), se observó una asociación de esta proteína truncada con la alteración neurofibrilar de la EA⁴. Al igual que la truncación en el Glu³⁹¹, recientemente se identificó que esta truncación se asoció a la gravedad clínica de la EA⁶.

En este estudio se analiza la posible relación entre los ONF constituidos por la proteína truncada en Asp⁴²¹ o Glu³⁹¹ y el deterioro cognitivo de pacientes con EA, evaluado mediante el Mini-Mental State Examination (MMSE) y el Cambridge Cognitive Examination (CAMCOG). Se utilizó una población de ancianos ingleses con diversos grados de demencia e individuos de control no dementes, en los cuales se evaluaron en vida los parámetros cognitivos mencionados antes. Se encontró una correlación significativa entre el deterioro cognitivo y la expresión de la proteína tau truncada en los ONF.

Materiales y métodos

Se utilizó un grupo de casos denominados CPLL (por sus siglas en inglés *Cambridge Project for Long Life*). Este grupo de individuos está bien caracterizado, tanto desde el punto de vista clínico como neuroanatomopatológico, como un grupo de 15 pacientes con EA de gravedad variable y 25 individuos de control como ancianos no dementes. En todos los casos se realizó una evaluación de la capacidad cognitiva mediante los instrumentos MMSE (con valores estándar de refe-

Recibido para su publicación: 15 de diciembre de 2008.

Aceptado para su publicación: 8 de enero de 2009.

Correspondencia: F. García-Sierra.

E-mail: fgarcia-sierra@cell.cinvestav.mx

Basurto-Islas G et al. La acumulación progresiva de ovillos neurofibrilares compuestos por tau truncada en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ se relaciona con la gravedad clínica en la enfermedad de Alzheimer

rencia de 30-29 para el nivel normal; 28-26, para la manifestación de disfunción cognitiva leve; 25-18, para la disfunción cognitiva acusada, y < 17, para la demencia grave) y CAMCOG. Dicho diagnóstico fue corroborado mediante estudio neuroanatomopatológico por autopsia del encéfalo tras la muerte de los individuos y utilizando el instrumento de diagnóstico de progresión neuroanatomopatológica denominado Braak stages (BST)⁷. Las muestras de tejido cerebral de estos individuos fueron previamente fijadas y embebidas en parafina, obteniéndose secciones de 10 μm de las regiones principalmente afectadas por la alteración neurofibrilar de la EA⁷. Estas muestras fueron donadas por el Banco de Cerebros de la Universidad de Cambridge. Las secciones de tejido fueron procesadas por inmunoperoxidasa con los anticuerpos Tau-C3 y MN423 que identifican la tau truncada en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹, respectivamente. Seguidamente se les realizó un análisis morfológico cualitativo y cuantitativo, utilizando microscopia de campo claro. Por área específica se expresó la densidad de ONF por milímetro cuadrado a partir del promedio de tres diferentes campos aleatorios por región observada. Finalmente se utilizó la prueba estadística de correlación de Pearson para evaluar la posible interrelación entre la densidad de los ONF y los parámetros cognitivos.

Resultados

Para determinar si la densidad de los ONF constituidos por tau truncada en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ se asociaba con el deterioro de las funciones cognitivas, se realizó la prueba estadística de correlación de Pearson entre la densidad de los ONF inmunorreactivos a Tau-C3 y MN423 en la población total de individuos, con respecto al MMSE y al CAMCOG, descritos antes.

Se constató una correlación negativa entre la acumulación de ONF que contenían la proteína tau truncada en Asp⁴²¹, con respecto a los niveles del MMSE, con valores de correlación $r = -0,443$, y «p» significativa = 0,004* (fig. 1). La misma correlación negativa se encontró para la densidad de ONF compuestos de

tau truncada en Glu³⁹¹, con valores de correlación $r = -0,515$, y «p» significativa = 0,001* (fig. 2). Adicionalmente, se determinó la misma correlación al analizar la inmunorreactividad ya descrita de los ONF, con respecto a la prueba del CAMCOG, y se obtuvieron valores significativos de $r = -0,395$, y $p = 0,012^*$, así como de $r = -0,489$, y $p = 0,001^*$ para los anticuerpos Tau-C3 y MN423, respectivamente (gráficas no mostradas).

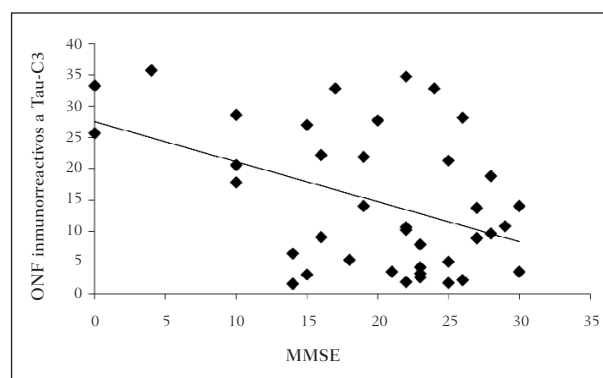


Figura 1. Correlación entre la densidad de los ovillos neurofibrilares (ONF) constituidos por tau truncada en Asp⁴²¹, y la gravedad clínica de la enfermedad de Alzheimer. El promedio de la densidad total de ONF fue graficado de acuerdo a su correspondiente índice de gravedad clínica (Mini-Mental State Examination [MMSE]). La densidad de los ONF inmunorreactivos a Tau-C3 se relacionó significativamente con el MMSE ($r = -0,443$; $p = 0,004^*$). El análisis de correlación se realizó mediante la prueba de Pearson.

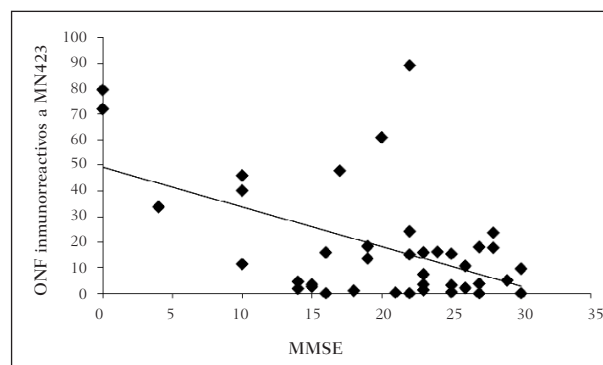


Figura 2. Correlación entre la densidad de los ovillos neurofibrilares (ONF) constituidos por tau truncada en Glu³⁹¹, y la gravedad clínica de la enfermedad de Alzheimer. Se realizó la misma evaluación para la truncación en E³⁹¹. La densidad de los ONF inmunorreactivos a MN423 se relacionó significativamente con el Mini-Mental State Examination ($r = -0,515$; $p = 0,001^*$). El análisis de correlación se realizó mediante la prueba de Pearson.

Basurto-Islas G et al. La acumulación progresiva de ovillos neurofibrilares compuestos por tau truncada en Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ se relaciona con la gravedad clínica en la enfermedad de Alzheimer

Estos resultados indican que la progresión en la aparición de estructuras neuroanatomopatológicas compuestas por la proteína tau truncada en sus residuos Asp⁴²¹ y Glu³⁹¹ se relaciona significativamente con el incremento en el deterioro cognitivo de individuos que desarrollan EA.

Comentario

La truncación de la proteína tau tiene gran relevancia en la EA como uno de los principales mecanismos para la agregación de esta proteína formadora de ONF, así como por su estrecha asociación con la muerte celular en el cerebro de pacientes con EA y en líneas celulares⁵. Sin embargo, estos datos son aún motivo de discusión, pues se considera que la enfermedad es el resultado de diversos factores, entre los cuales este suceso de proteólisis podría ser uno de tantos participantes.

El presente estudio, realizado en 40 pacientes con EA y controles, validó que no sólo el número sino también la naturaleza molecular de los ONF compuestos por dos variantes truncadas de la proteína tau se relacionó negativamente con dos importantes parámetros de evaluación de las capacidades cognitivas.

La truncación de tau en Asp⁴²¹ está asociada directamente con los mecanismos moleculares iniciales que llevan a la formación de los ONF y, por consiguiente, a la agregación y posterior polimerización de tau en filamentos helicoidales, lo que sitúa la truncación en Asp⁴²¹ en una etapa crucial para la formación de estas estructuras patológicas.

En la evolución de la alteración neurofibrilar se ha asociado la truncación en Glu³⁹¹ a etapas avanzadas en el procesamiento de los ONF, y se ha demostrado que ambas truncaciones ocurren de manera secuencial, ya que no se detectan estructuras patológicas que contengan ambas truncaciones; asimismo, los ONF constituidos por cada una de estas especies truncadas se encuentran distribuidas inversamente en las áreas afectadas durante la evolución de la EA⁶. Estos resultados indican que ambas truncaciones identifican claramente diferentes etapas de la alteración neurofibrilar de la EA; sin embargo, nuestros resultados demuestran

que, a pesar de esta diferencia de temporalidad, ambas truncaciones están estrechamente asociadas con el deterioro cognitivo de la EA, como se ha descrito antes⁶. Esto pone de manifiesto la importancia de la truncación de tau como suceso estrechamente asociado a la gravedad clínica de la EA en diferentes etapas de evolución; además, estos datos, junto con información previa^{3,6}, validan a estas truncaciones como marcadores neuroanatomopatológicos precisos de la EA.

Agradecimientos

Agradecemos al Banco de Cerebros de la Universidad de Cambridge, Inglaterra, por la donación del tejido cerebral para el presente estudio. La investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México, proyecto 59651 al Dr. Francisco García-Sierra. El estudiante Basurto-Islas recibió la beca CONACYT-México durante el desarrollo de la investigación.

Bibliografía

1. Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J, et al. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci.* 2000;113:3737-45.
2. Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5837-41.
3. García-Sierra F, Wischik CM, Harrington CR, Luna-Muñoz J, Mena R. Accumulation of C-terminally truncated tau protein associated with vulnerability of the perforant pathway in early stages of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat.* 2001;22:65-77.
4. Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, et al. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10032-7.
5. Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, et al. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem.* 2000;75:624-33.
6. Basurto-Islas G, Luna-Muñoz J, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, García-Sierra F. Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67:470-83.
7. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239-59.