

# la biomedicina en el cambio de siglo

JESÚS AVILA Y JOSÉ M. MATO

En el siglo anterior se produjo el paso de la biología descriptiva a la biología cuantitativa y de la medicina del diagnóstico a simple vista, a la medicina de las analíticas y protocolos. En ambos casos se buscaba una nueva metodología, más rigurosa y que diera datos reproducibles. Cuantificando y midiendo, se buscaba incrementar el carácter científico de la biología y de la medicina.

De acuerdo con estos criterios, basados en hacer correctas mediciones, se desarrolló la bioquímica y, posteriormente la biología molecular, utilizando, al principio, modelos simples para los análisis, y después modelos cada vez más complicados que permitieran, mediante extrapolación, conocer el funcionamiento del ser humano.

Así pues, la interpretación de una complejidad cada vez mayor fue realizándose partiendo del estudio de procesos simples, sin muchas variables, para después realizar el estudio de las interacciones entre estos procesos, lo que en la transición de los siglos **xx** y **xxi** se denominó biología de sistemas.

## **Novedades en la transición**

En el tiempo que ha comprendido la transición entre los dos siglos, se logró descifrar la información –secuenciar– del genoma de diferentes organismos, entre ellos el del ser humano (Venter, Adams, Myers et al. 2001, 1304), habiéndose realizado una descripción, no muy rigurosa, de las proteínas que se expresan en esos organismos, tanto en lo referente a su cantidad como a la naturaleza de dichas proteínas.

Por otra parte, se conoció, a nivel básico, algo más sobre los elementos básicos de la vida. El Dogma Central de la biología molecular indica que el genoma (DNA), se transcribe en RNA y una forma de éste, el RNA mensajero, se traduce dando lugar a la síntesis de proteínas. En estos últimos años, aparte del RNA mensajero, RNA de transferencia y RNA ribosómico, se ha descrito un nuevo tipo de RNA, el RNA de interferencia que actúa como regulador de la expresión génica (Fire, Xu, Montgomery et al. 1998, 806).

Sin embargo, la segunda parte del código genético, la clave de cómo se pliegan las proteínas sigue sin conocerse.

Este hecho es importante pues existen varias enfermedades, las denominadas proteinopatías, cuya base está en un plegamiento defectuoso, y no funcional, de una proteína, que, en muchos casos da lugar a la agregación aberrante de dichas proteínas.

## **Niveles de estudio**

Se ha estudiado no sólo el nivel molecular, sino el nivel celular. Mientras que los procesos moleculares básicos son comunes no sólo entre las células de un mismo organismo, sino de organismo a organismo, la gran variedad celular en un organismo superior, como un mamífero, ha dado lugar a estudios específicos y especializados para los diferentes tipos celulares. Hay células que proliferan siguiendo un ciclo determinado que cuando funciona aberrantemente puede dar lugar a la aparición de tumores.

Hay células que sobreviven mucho tiempo sin dividirse y en estado diferenciado, como las neuronas. Hay células que interactúan íntimamente entre ellas, como las que forman el tejido epitelial, mientras las del tejido conectivo se rodean de una matriz extracelular. Pero, en general, el proceso de diferenciación empieza con unas células precursoras que tras diversas modificaciones dan lugar a las células maduras. Estas células precursoras, proliferantes, derivan a su vez de unas células más primitivas denominadas troncales o células madre. En este cambio de siglo se ha realizado un importante avance en el conocimiento de estas células madre. En este sentido se han desarrollado protocolos para diferenciar células madre de origen embrionario humano en diferentes tipos celulares: tejido muscular, tejido nervioso, etc. (Thomson, Itskovitz-Eldor, Shapiro et al. 1998, 1145) sugiriéndose que este proceso puede ser utilizado como terapia de regeneración celular. Por otra parte, hay largas discusiones sobre la posibilidad de que células madre de algún tejido adulto pudieran ser pluripotentes, es decir, pudieran diferenciarse a diferentes tipos de tejidos, discusiones que siguen hoy en día. Más recientemente se ha descrito un descubrimiento que podría ser interesante. Este descubrimiento, reprogramación, ha consistido en revertir la diferenciación de células maduras, de tejidos específicos, convirtiéndolas en células con características de células madre embrionarias. La expresión los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc convierte, reprograma, fibroblastos diferenciados en células con características similares a las de las células madre (Takahashi y Yamanaka 2006, 663). Esta reprogramación podría darse de un modo natural en la transición entre células epiteliales y mesenquimales que tienen lugar durante el desarrollo (Mani, Guo, Liao et al. 2008, 704). Posteriormente, estas células con características de células troncales pueden diferenciarse nuevamente en tipos celulares diferentes del inicial. En la rata, neuronas obtenidas de fibroblastos reprogramados se pueden transplantar en un ratón con síntomas de la enfermedad de Parkinson, produciendo en éstos una recuperación funcional (Wernig, Zhao, Pruszak et al. 2008, 5856).

#### Nuevas terapias

A partir de los dos descubrimientos anteriormente indicados relativos al RNA de interferencia, RNAi, y a la caracterización de las células madre, se han establecido métodos de terapia molecular, basados en el uso de los RNAi, para impedir la expresión de una proteína que pueda ser tóxica para el organismo; o métodos de terapia celular mediante el uso de células precursoras en procesos regenerativos. Una fuente alternativa de células troncales es la sangre del cordón umbilical (Kurtzberg, Laughlin, Graham et al. 1996, 157). Estas células pueden ser utilizadas para terapia celular en enfermedades como leucemias o hemoglobinopatías, habiéndose establecido bancos para almacenar estas células.

La regeneración de órganos y tejidos varía drásticamente con la naturaleza de las células que forman parte de estos tejidos. Es conocido que, tras una hepatotomía, el hígado regenera hasta su tamaño inicial, como también se conoce que puede haber un recambio de las células de la sangre, de la piel o de los huesos, de un modo natural. Artificialmente, en el caso de las células de la piel, se ha conseguido obtener piel cultivada con propósitos regenerativos (O'Connor, Mulliken, Banks-Schlegel et al. 1981, 75), tras realizar cultivos celulares de queratinocitos y fibroblastos. También el implante de condriocitos ha permitido la regeneración del cartilago (Brittberg, Lindahl, Nilsson et al. 1994, 889). Más difícil es la regeneración en otros órganos, como el cerebro.

El desarrollo de áreas como la biología molecular, la biología celular o la biotecnología ha permitido diagnosticar mejor diferentes enfermedades y, en algunos casos, proponer tratamientos personalizados para los pacientes. Son claras las diferencias que pueden observarse entre los seres humanos; diferentes géneros, razas, colores de pelo, estatura, volumen corporal, etc. Esto se debe, en parte, a diferencias en sus genomas, DNA, y recientemente se ha observado que aunque existen los denominados polimorfismos de un solo nucleótido, que dan lugar a la existencia de pequeñas diferencias de un mismo gen en diferentes individuos, parece ser que las mayores diferencias se deben a la existencia de deleciones y/o inversiones en el material genético de un individuo comparado con el material genético de otro individuo. Esta observación se consideró por la revista *Science* como uno de los hitos científicos del pasado año (Kennedy 2007, 1833).

#### Difusión de los resultados

Es importante resaltar la incidencia mediática en la mayor o menor visualización de descubrimientos. Como se ha indicado, al final de cada año la revista *Science* resalta sus descubrimientos favoritos. También *Nature*, a través de la revista *Nature Methods*, indica los métodos del año. Este año el principal método fue una nueva tecnología para secuenciar, más rápido y barato, genomas como el de diferentes seres humanos (Wold y Myers 2008, 19). Se ha sugerido que con esta técnica se ha secuenciado el genoma de los científicos Watson y Venter.

También la revista *Cell* hace propaganda de los descubrimientos que publica en sus páginas. Hace pocos años, coincidiendo con el 30 aniversario de la revista, se recopiló en un número especial (*Cell 30<sup>th</sup> Anniversary Supplement*, January 23, 2004), los trabajos más relevantes previamente publicados en *Cell*, entre ellos varios por los que sus autores fueron galardonados con el Premio Nobel. Un ejemplo es el referente a los mecanismos de degradación de las proteínas del citoplasma a través de una maquinaria conocida como proteasoma (Rader y Daugherty 2008, 904). Es posible que algunos de los Premios Nobel futuros correspondan a algún autor con alguna contribución en dicho número.

### Las enfermedades más prevalentes

Por otra parte, el conocimiento molecular de diversos tipos celulares encontrados en diferentes tejidos puede facilitar el mejor conocimiento de enfermedades. Desde un punto de vista muy general, se puede considerar que en un organismo existen cuatro tipos mayoritarios de tejidos: el muscular, el nervioso, el epitelial y el conectivo. El primero está muy relacionado con problemas cardiovasculares, dado el carácter muscular del corazón; el segundo con problemas neurodegenerativos; el tercero con procesos infecciosos y parte de este último y el cuarto con la mayor formación de tumores. La solución de estos cuatro tipos de problemas; cardiovasculares, neurodegenerativos, oncológicos e infecciosos son los retos fundamentales de la medicina del siglo XXI. En este capítulo nos ocuparemos, principalmente, de problemas relacionados con defectos metabólicos o con procesos neurodegenerativos.

En aspectos relacionados con enfermedades cardiovasculares referimos al lector a un número específico de *Nature*, volumen 451, issue 7181, casi monográfico sobre el tema, en donde se comentan posibles nuevas terapias para arterioesclerosis (Rader y Daugherty 2008, 904), posibles tratamientos para la trombosis (Mackman 2008, 914), o el uso de células madre para enfermedades cardíacas (Sengers y Lee 2008, 937).

Respecto a aspectos relacionados con cáncer referimos al lector al número de *Nature* 441, 7092; que incluye el suplemento «Insight: signalling in cancer», donde hay interesantes artículos como el de Benson J. D. et al. sobre la validación de nuevas dianas para ensayo de compuestos antitumorales.

Antes de acabar esta parte introductoria, queremos comentar brevemente el uso de modelos animales para el estudio de enfermedades y algunas mejoras en el diagnóstico médico, desde un punto de vista general.

### Modelos animales

En muchos casos se han intentado reproducir algunos aspectos patológicos de diversas enfermedades utilizando modelos animales que minifiquen todas o algunas características de la enfermedad. Estos modelos van desde el gusano al ratón, pasando por la mosca. Fundamentalmente, los estudios en los que se ha utilizado ratones como modelos, han servido para usar estos modelos como dianas terapéuticas para probar fármacos, como primer paso para su utilización posterior en la clínica. El uso de modelos de ratón ha sido reconocido con la concesión del Premio Nobel de Medicina en 2007.

### La mejora en el diagnóstico médico

Sin embargo, aparte de los modelos, es muy importante conocer qué pasa específicamente en el cuerpo de un ser humano enfermo. En este sentido se ha aumentado en gran proporción el conocimiento en el diagnóstico médico. Éste se puede obtener tras analizar los componentes

de fluidos como sangre, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo; pero quizás el mayor avance puede haber sido el desarrollo de nuevas técnicas de imagen, como por ejemplo la resonancia magnética de imagen funcional, que está aportando una excelente información de zonas difíciles de analizar en un ser humano, como es el cerebro (Kerr y Denk 2008, 195).

Como hemos indicado anteriormente, vamos a enfocar fundamentalmente nuestro trabajo a comentar, más específicamente, algunos aspectos sobre procesos neurodegenerativos o problemas de metabolismo.

### La enfermedad de Alzheimer

Como ejemplo de proceso neurodegenerativo comentamos la enfermedad de Alzheimer, una demencia senil que se caracteriza, inicialmente, por una pérdida de memoria a la que sucede, con el progreso de la enfermedad, una gran desorientación, demencia, del paciente (Alzheimer 1907, 146).

El envejecimiento es el mayor riesgo para padecer la enfermedad de Alzheimer. Su prevalencia se duplica cada cinco años, a partir de los 65 años de edad. Casi un 2,5% de personas de 65 años la padecen, mientras la incidencia es entre 40 y 50% en personas mayores de 85 años.

Alrededor de la enfermedad surgen diferentes problemas que se añaden al esencial, la pérdida de memoria, el entendimiento y la voluntad del paciente. Como consecuencia de este deterioro se requiere el cuidado del paciente por otras personas, generalmente los familiares más próximos que, posiblemente, son los más perjudicados por la enfermedad. Éstos son los problemas fundamentales, a los que se les añaden otros de ámbito social y económico.

Datos de la Organización Mundial de la Salud, de 2001 (Vas 2001), estimaban que la enfermedad de Alzheimer afectaba a 18 millones de personas en el mundo. Datos aproximados del año 2006, subían a 26 millones de personas el número de enfermos a nivel mundial. Se ha estimado que esta cifra podría multiplicarse por tres en el año 2050, dada la mayor longevidad del actual ser humano y al hecho de que el mayor riesgo para padecer la enfermedad es el envejecimiento, según lo publicado en la página web de la Alzheimer's Association con el título *Alzheimer's Disease Facts and Figures* en 2007 ([http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_facts\\_figures.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_facts_figures.asp)). En este sentido se ha sugerido también que en personas centenarias la probabilidad de padecer demencia senil pudiera ser mayor del 50%. Es decir, la neurodegeneración podría considerarse como un proceso normal, que ocurriría a edades muy avanzadas.

Desde un punto de vista económico, en Estados Unidos se ha calculado que el cuidado de 4,5 millones de pacientes puede tener un coste mínimo de cien mil millones de dólares (Glennier y Wong 1984, 1131, Masters, Simms, Weinman et al. 1985, 4245). Por otra parte, datos de 2006, indican un gasto en fármacos paliativos, los únicos que existen actualmente al carecer de curativos, de 4.600 millones de dólares.

Así pues, es una enfermedad crónica, devastadora y con un gran coste humano, social y económico. Una enfermedad que, además, va aumentando su prevalencia, debido al incremento de la edad media de la población.

Desde el año 1907, en el que A. Alzheimer descubrió el primer caso de la enfermedad, hasta la década de lo ochenta del siglo xx, lo que se conocía de la enfermedad de Alzheimer fundamentalmente derivaba del comportamiento anómalo de los pacientes y de los estudios histopatológicos de sus autopsias. La autopsia del cerebro de un paciente de Alzheimer indica una abundancia poco usual de dos tipos de estructuras aberrantes, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Además, las autopsias de los pacientes muestran una gran mortandad de neuronas, principalmente en el hipocampo, la zona límbica y en la corteza cerebral.

A partir de los años ochenta del siglo pasado, se ha empezado a estudiar qué sucede en los cerebros de los pacientes de Alzheimer que conduce a la formación de placas seniles e, independientemente, de los ovillos neurofibrilares. Se descubrió que el componente mayoritario de las placas seniles era un péptido (Glenner y Wong 1984, 1131), del que se obtuvo su secuencia de aminoácidos y, dado que las placas seniles tienen forma de agregados de amiloide, al péptido se le denominó como péptido beta amiloide. Posteriormente, se encontró que este péptido era un fragmento de una proteína (Masters, Simms, Weinman et al. 1985, 4245), a la que se denominó proteína precursora del amiloide, APP. Esta proteína está oblicuamente presente en distintos tipos celulares, pero el péptido beta amiloide sólo produce agregados aberrantes en el sistema nervioso. Estudiando las características del péptido amiloide se llegó a la conclusión de que los cortes que tenían lugar en la proteína APP para producirlo, no eran los usuales que tenían lugar en esta proteína en situaciones no patológicas. En esas situaciones, APP, cuya localización celular es la membrana plasmática, seguía unida a la membrana o se desligaba mediante el corte de una proteasa, denominada secretasa  $\alpha$ , pues tras el corte, el fragmento mayoritario se secreta al medio extracelular. Sin embargo, en condiciones patológicas (Price, Tanzi, Borchelt et al. 1998, 461), en vez de cortarse la proteína APP por la secretasa  $\alpha$ , se corta por otra proteasa, denominada secretasa  $\beta$ , y posteriormente por otra proteasa, secretasa  $\gamma$ . El corte de APP por las secretasas  $\alpha$  y  $\beta$  da lugar al péptido amiloide, que, cuando se acumula, da lugar a diferentes tipos de agregados siendo los de mayor tamaño las placas seniles. Mientras el corte debido a la beta secretasa es específico, y se produce entre dos aminoácidos determinados, el corte de APP por la secretasa  $\gamma$  es impreciso, dentro de una región determinada de la proteína. Dada esta imprecisión, se obtienen péptidos beta amiloide de diferente tamaño, siendo los más usuales los péptidos que contienen 40,  $A\beta_{40}$ , y 42,  $A\beta_{42}$ , residuos. El segundo posee una mayor capacidad de agregación que el primero. Así pues,  $A\beta_{42}$  se le considera

el péptido amiloide con mayor potencial tóxico. Una vez formados los péptidos beta amiloide, éstos pueden ser degradados por proteasas como la neprelisina o la enzima que degrada la insulina, IDE, que, al degradar a estos péptidos beta amiloide, previene su agregación aberrante, que puede ser tóxica. Esta toxicidad ha sido observada cuando el péptido se añade a un cultivo de células neuronales. La toxicidad del péptido beta amiloide agregado puede ser debida a que facilite la entrada de calcio al citoplasma celular, y/o a actuar como antagonista en algunas vías de señalización en las neuronas. Además, se ha sugerido una acción sobre las células de microglia, que facilitaría la secreción, por estas células de glia, de citoquinas y otros factores, que provocarían un proceso inflamatorio que podría concluir con muerte neuronal.

Adicionalmente, se ha sugerido que para que el efecto tóxico del péptido amiloide tenga lugar en neuronas, se requiere, en dichas neuronas, la presencia de la proteína tau (véase abajo).

El componente mayoritario de los ovillos neurofibrilares es una proteína asociada a los microtúbulos, denominada tau (Grundke-Iqbal, Iqbal, Tung et al. 1986, 4913). Esta proteína, modificada por hiperfosforilación está presente en los denominados filamentos apareados helicoidales, PHF, cuyos agregados son los ovillos neurofibrilares. Utilizando la proteína tau aislada, se pudo comprobar que ella sola era suficiente para producir agregados similares a los PHF (Montejo de Garcini, Serrano y Avila 1986, 790). Por otra parte se ha descrito que diferentes proteína quinasas pueden modificar, fosforilar, a la proteína tau, siendo la que modifica más residuos de la proteína tau la quinasa conocida como GSK3 (Avila, Lucas, Pérez et al. 2004, 361). Se sugiere que tanto la proteína tau fosforilada como los agregados que se forman a partir de la proteína tau, pueden ser tóxicos para las células en donde estén presentes.

Más recientemente, se ha sugerido que tras la muerte neuronal, tau intracelular pasa al medio extracelular y que este tau extracelular puede ser tóxico para las neuronas cercanas, contribuyendo, de esta manera, a la propagación de la patología (Gómez-Ramos, Díaz-Hernández, Rubio et al. 2008, 673).

La enfermedad de Alzheimer se ha dividido en dos tipos, la de origen genético o enfermedad de Alzheimer familiar, y la de origen esporádico. La primera tiene muy poca incidencia, posiblemente menos del 1% del total de los casos de la enfermedad son de origen familiar, por lo que el tipo más usual de la enfermedad es el esporádico.

Sin embargo, el conocimiento del mecanismo de la enfermedad de Alzheimer familiar ha dado importantes pistas sobre la enfermedad en general. Éste es un hecho importante ya que si se conoce el proceso de cómo se forman las placas y los ovillos se podrán, posiblemente, diseñar terapias para combatir la enfermedad.

Los casos familiares de la enfermedad de Alzheimer se deben a mutaciones en tres genes diferentes que codifi-

can tres proteínas: APP, la proteína precursora del péptido amiloide, presenilina 1, PS-1, y presenilina 2, PS-2. Las mutaciones de la proteína APP, que inducen el desarrollo de la enfermedad, facilitan su corte por las secretasas beta y gamma, y dificultan el corte por la secretasa  $\alpha$ . En todos estos casos, se facilita la formación del péptido beta amiloide (Price, Tanzi, Borchelt et al. 1998, 461).

Por otra parte, se analizó la naturaleza de la  $\gamma$  secretasa, observándose que está formada por un complejo de cuatro proteínas, una que posee la capacidad catalítica proteasa, y tres proteínas adicionales que regulan la actividad catalítica. La proteína con la actividad catalítica es PS-1 o PS-2, que pueden intercambiarse, y, mayoritariamente, las mutaciones en PS-1 y en PS-2, que inducen la aparición de la enfermedad, dan lugar a una ganancia en la función proteolítica de estas proteínas. Es decir, las mutaciones que se encuentran en PS-1 o PS-2, en pacientes con la enfermedad de Alzheimer de origen familiar, favorecen la aparición del péptido beta amiloide (Price, Tanzi, Borchelt et al. 1998, 461).

Como en casi todos los casos las mutaciones en APP, PS-1 o PS-2 dan lugar a un aumento en la producción del péptido beta amiloide, se sugirió, en la «hipótesis de la cascada del amiloide» (Hardy y Selkoe 2002, 353), que el primer paso para el desarrollo de la aparición de la enfermedad era la presencia, en una determinada cantidad, del péptido amiloide, que, tras agregar, podría originar los procesos patológicos posteriores, pudiéndose encontrar entre estos procesos posteriores la hiperfosforilación y agregación de la proteína tau. Sin embargo, el análisis a nivel de anatomía patológica del desarrollo de la enfermedad no apoyó esta hipótesis pues, aparentemente, la patología relacionada con la proteína tau y no la relacionada con la proteína amiloide parece que se correlacionan más con el proceso patológico de la enfermedad (Braak y Braak, 1991, 239, Arriagada, Growdon, Hedley-Whyte et al. 1992, 631). Por ello, se analizó si el resultado de las mutaciones en APP, PS-1 y PS-2 pudiera converger en la modificación de alguna otra proteína. Una posible proteína es la proteína quinasa GSK3, pues mutaciones en APP, que dan lugar a la aparición del péptido beta amiloide, facilitan la activación de la actividad quinasa de GSK3, ya que el péptido beta amiloide actúa como antagonista de vías de señalización, insulina o wnt, que dan lugar a una inactivación de la GSK3 (Avila, Lucas, Pérez et al. 2004, 361). Por otra parte, mutaciones en PS-1 o PS-2 que dan lugar a un aumento en la cantidad del péptido amiloide pueden tener iguales consecuencias a las indicadas para APP mutada, mientras aquellas mutaciones en PS1/PS2 que no dan lugar a un aumento en la producción del péptido beta amiloide pueden, por otras vías, aumentar la actividad de GSK3 (Baki, Shioi, Wen et al. 2004, 2586).

Dada la confluencia de las mutaciones de APP, PS-1 y PS-2 en un efecto de activación de GSK3, se desarrolló un modelo de ratón transgénico que sobreexpresaba la quinasa en aquellas zonas, hipocampo y corteza, más afectadas en

la enfermedad de Alzheimer (Lucas, Hernández, Gómez-Ramos et al. 2001, 27). Este ratón reproducía algunos aspectos de la patología de tau y, además, mostraba déficits de memoria (Hernández, Borrell, Guaza et al. 2002, 1529), por lo que se ha utilizado como diana para probar fármacos que pudieran inhibir la actividad quinasa y que, como consecuencia, pudieran reparar el déficit cognitivo. En estos ratones modificados genéticamente, la lesión más evidente es la degeneración del giro dentado (Engel, Lucas, Gómez-Ramos et al. 2006, 1258), algo que sucede también en los enfermos de Alzheimer, y que puede ser la responsable de la pérdida de memoria observada, tanto en el modelo animal como en los pacientes de Alzheimer.

Clínicamente los enfermos tienen, inicialmente, una pérdida creciente de memoria, deterioro cognitivo leve, que se ha relacionado con lesiones en la región hipocámpal, donde se localiza el giro dentado. Posteriormente, la patología se extiende por la zona límbica del lóbulo temporal, y más tarde a la corteza frontal, dando lugar a problemas de consolidación de la memoria, de comportamiento y de lenguaje. Después se puede observar muerte neuronal en la corteza parietal, lo que puede dar lugar a problemas visual-espaciales o de desorientación, por ejemplo, en el uso de utensilios, o a problemas de incapacidad para tomar decisiones, en donde junto con la corteza parietal también interviene la corteza frontal. Todos estos problemas relacionados con desorientación dan lugar a lo que, clínicamente, se conoce como demencia. Así pues, la enfermedad podría dividirse, de una forma muy general, en dos grandes estadios; uno inicial relacionado con la pérdida de memoria y otro posterior relacionado con la aparición de la demencia. Los dos problemas son de suma importancia, pero el segundo requiere una mayor atención por parte de los cuidadores de los pacientes.

En la transición entre el siglo xx y el xxi se ha producido un gran avance en el conocimiento, a nivel básico, de la enfermedad. Sin embargo, todavía no hay una buena aplicación terapéutica de estos conocimientos que permita combatir la enfermedad.

Como posibles terapias, hasta el presente se han utilizado fármacos paliativos más que curativos o modificadores. Estos fármacos retrasan tímidamente el desarrollo de la enfermedad que, desgraciadamente, finalmente progresa. Los fármacos, aprobados por la Agencia Norteamericana del Medicamento, FDA, son: tacrina, donepezilo, galantamina, rivastigmina y memantina. Sólo la venta anual del donepezilo ronda los 1.000 millones de dólares, mientras que las ventas de memantina, el más recientemente incorporado al mercado, son de alrededor de los 500 millones de dólares (Mount y Downton 2006, 780, Stephen Salloway 2008, 65). Los cuatro primeros son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (Stephen Salloway 2008, 65). Esta enzima degrada el neurotransmisor acetilcolina, requerido para la perfecta transmisión neuronal. En la enfermedad de Alzheimer hay un daño prefe-

rencial de las neuronas colinérgicas, aquellas que utilizan acetilcolina como neurotransmisor. Con objeto de intentar mantener altos los niveles del neurotransmisor es por lo que se emplean estos fármacos, aunque el primero, tacrina, se cayó de la lista debido a su toxicidad. La memantina es un antagonista del receptor de otro neurotransmisor, el glutamato. Se ha observado que en neuronas de personas de la tercera edad, hay una excesiva activación de un tipo de receptores del glutamato, los receptores NMDA, activación que puede ser tóxica, dañando a la neurona. Con objeto de proteger a las neuronas de estas personas mayores se les administra memantina, que es un antagonista de los receptores NMDA (Parsons, Danysz y Quack 1999, 735) (Reisberg, Doody, Stoffler et al. 2003, 1333).

Éstos son los fármacos actuales. A continuación comentaremos brevemente algunos métodos de diagnóstico y cuáles son los posibles fármacos futuros.

Como biomarcadores de la enfermedad se pueden determinar los niveles de la proteína tau, con diferentes niveles de fosforilación, y del péptido beta amiloide, en el líquido cefalorraquídeo. Más recientemente, se han determinado los niveles de hasta 18 componentes del plasma como posibles indicadores de la enfermedad (Ray, Britschgi, Herbert et al. 2007, 1359), pero quizás los métodos diagnósticos que han recibido más atención han sido los relacionados con las técnicas de imagen como el PET (Blennow y Zetterberg 2006, 753) y la resonancia magnética funcional (Logothetis 2008, 869). Con estas técnicas se puede seguir el agrandamiento de los ventrículos, tras la muerte neuronal, que aqueja a los enfermos de Alzheimer. De las dos técnicas indicadas, la resonancia magnética funcional parece tener algunas ventajas. Esta técnica mide cambios hemodinámicos en diferentes puntos del cerebro y tiene las ventajas de no ser invasiva y de tener una buena resolución espacio-temporal, que puede mostrar un resultado que se correlaciona con una actividad específica realizada por un individuo (Logothetis 2008, 869).

Los fármacos que están ya, o muy próximos a estar, en ensayos clínicos y que pueden ser modificadores (Stephen Salloway 2008, 65) y no paliativos de la enfermedad, es decir los posibles fármacos del futuro para esta enfermedad, tienen un mecanismo basado en las diferentes observaciones realizadas, a nivel básico, sobre la patología de la enfermedad. Así pues se están desarrollando fármacos que reduzcan los niveles del péptido beta amiloide. De este modo se están desarrollando anticuerpos específicos, vacunas, contra el péptido amiloide –el producto se denomina Bapineuzumab–. Por otra parte, se están desarrollando inhibidores contra la beta y gamma secretasa; algunos de ellos moduladores de la  $\gamma$  secretasa, buscando reducir la relación  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ; y algunos muestran además un posible efecto antiinflamatorio, flurizan y tarenflumol. Sin embargo, noticias recientes muestran datos negativos para el flurizan. Hay otros compuestos que previenen la agregación del beta amiloide, clioquinol, o extractos de

polifenoles que también pueden prevenir la oligomerización del péptido beta amiloide (Wang, Ho, Zhao et al. 2008, 6388) (Stephen Salloway 2008, 65); o que pueden mantener altos los niveles de aquellas enzimas, como la enzima que degrada insulina, IDE, que pueden degradar al péptido amiloide. Entre estos compuestos está un agonista del PPAR $\gamma$ , rosiglitazone (Pedersen, Mcmillan, Kulstad et al. 2006, 265). Adicionalmente, se han buscado inhibidores que no se unan directamente a la  $\gamma$  secretasa, sino a su sustrato, impidiendo el corte proteolítico de la enzima en dicho sustrato, pero no en otros (Kukar, Ladd, Bann et al. 2008, 925).

Por otra parte, se ha mostrado que el efecto tóxico de la excesiva actuación de los receptores NMDA puede incrementar los niveles del péptido beta amiloide (Harkany, Abraham, Timmerman et al. 2000, 2735) y de la proteína tau (Amadoro, Ciotti, Costanzi et al. 2006, 2892), por lo que aparte de la memantina se están buscando otros antagonistas de los receptores NMDA, siendo el dimebon uno de ellos. En otro tipo de estudios, no se han conseguido grandes logros en la búsqueda de antioxidantes que pudieran actuar como neuroprotectores.

Por último, referente a la patología relacionada con la proteína de tau, se están buscando inhibidores específicos de aquellas quinasas que, como GSK3, mayoritariamente modifican a dicha proteína tau. Más recientemente, se ha descrito que el azul de metileno, un antiagregante de la proteína tau, podría tener un efecto terapéutico.

Éstos son algunos ejemplos que pueden ser indicativos del tremendo esfuerzo que se está realizando para prevenir esta terrible enfermedad.

### La enfermedad del hígado graso no-alcohólico

La enfermedad del hígado graso no-alcohólico –abreviado NAFLD, del inglés *non-alcoholic fatty liver disease*– es la causa más frecuente de enfermedad hepática en los países occidentalizados y, consecuentemente, un problema de salud mundial. Afecta a alrededor de 20 millones de personas en Estados Unidos, y a un número similar en la Unión Europea (Adams y Lindor 2007; Ahmed y Byrne 2007). NAFLD es frecuente en pacientes con obesidad, diabetes, hiperlipidemia e hipertensión (Abdelmalek y Diehl 2007). El incremento de la obesidad en los países occidentalizados justifica el creciente interés en el estudio de NAFLD. Aproximadamente el 50% de los individuos obesos tienen NAFLD (Angulo 2007). NAFLD es un término clínico-patológico que se emplea para describir un amplio rango de situaciones que van desde la simple acumulación de grasa en el hígado –esteatosis no-alcohólica– a la esteatohepatitis no-alcohólica –NASH, acumulación de grasa con inflamación, necrosis y fibrosis–. NAFLD es en general una enfermedad asintomática, aunque en una minoría de los pacientes con NAFLD la enfermedad progresa hasta desarrollar cirrosis, fallo hepático y carcinoma hepatocelular –HCC–. Aproximadamente el 10% de los pacientes con

NAFLD desarrollan NASH; y de éstos, entre el 10 y el 20% desarrollan cirrosis y HCC. El consumo excesivo de alcohol también produce hígado graso y, al igual que ocurre en NAFLD, también en este caso la enfermedad hepática puede progresar hasta la aparición de esteatohepatitis, cirrosis y HCC. No obstante lo anterior, es importante hacer hincapié en que NAFLD y la enfermedad hepática inducida por el consumo excesivo de alcohol son dos enfermedades distintas. NASH es también diferente de otras formas de hepatitis causadas por la infección con diversos virus, como el virus de la hepatitis B o C. Mientras que el diagnóstico clínico de NAFLD está basado en la elevación de las transaminasas en sangre, en el índice de masa corporal –IMC, se calcula dividiendo el peso de un individuo en kilogramos por la altura en metros al cuadrado; los valores entre 18,5 y 25 se consideran normales–, en la evidencia mediante ecografía o resonancia magnética de la acumulación hepática de grasa, y en la presencia de otros factores como obesidad, diabetes, hipertensión e hiperlipidemia; para confirmar la presencia de NASH y el grado de fibrosis y necrosis es necesario realizar una biopsia hepática.

A pesar de ser NAFLD un problema de salud mundial, no se sabe por qué en algunos individuos la enfermedad progresa a NASH y en otros no. Existen varias hipótesis. La principal tiene que ver con que son necesarios dos *hits*: el primer *hit* es la acumulación de grasa en el hígado, pero la naturaleza del segundo *hit* es una incógnita, aunque los estudios realizados en los últimos años empleando modelos animales genéticamente modificados han proporcionado nuevas claves sobre el segundo *hit*. Tampoco se sabe por qué en algunos pacientes NASH progresa a cirrosis y HCC, y en otros no.

Aproximadamente el 25% de la población adulta estadounidense es obesa, y un 55% adicional tiene sobrepeso (Sturm 2002). Aunque estos números son algo mejores en la población adulta europea, la obesidad en la Unión Europea es también un problema de salud pública. La obesidad está causada, fundamentalmente, por un exceso en la ingesta de calorías relativo al consumo de energía. A nivel individual, la obesidad puede ser más compleja e implicar factores genéticos que regulan el metabolismo y almacenamiento de los lípidos, el control por el cerebro de los hábitos de alimentación y de ejercicio, u otros factores desconocidos. Es cierto que en algunos individuos hay factores genéticos que influyen de manera determinante su disposición a acumular grasa o que favorecen la sensación de hambre frente a la de saciedad. Para estos individuos controlar el peso es muy difícil, pero para la mayoría de la población los factores genéticos son menos determinantes y pueden ser compensados, más fácilmente, mediante cambios en los hábitos de alimentación. Cualquier individuo obeso perderá peso si es forzado a mantener una dieta baja en calorías en combinación con la realización de ejercicio. Sabemos que esta afirmación es cierta, porque los pacientes que son sometidos a un *by-pass* gástrico

–mediante esta técnica quirúrgica el tamaño del estómago se reduce drásticamente desde alrededor de 1 litro hasta tan sólo 30-60 mililitros– reducen marcadamente la cantidad de grasa del tejido adiposo.

Para la mayoría de los individuos, el tejido adiposo no es más que una masa inerte de grasa pero, desde mediados de los años noventa, sabemos que es un tejido biológicamente muy activo. En 1994, Friedman y colaboradores identificaron la hormona leptina y descubrieron que su deficiencia era la causa de la obesidad extrema observada en un ratón mutante denominado *obeso* (Zhang y cols 1994). Estos ratones son enormes. Mientras que un ratón normal pesa alrededor de 30 gramos, los ratones *obesos* llegan a pesar 90. Estos ratones tienen elevados los niveles de lípidos en sangre y desarrollan hígado graso. La leptina se sintetiza en el tejido adiposo. En los animales normales, la cantidad de leptina en sangre es proporcional a la cantidad de tejido adiposo. Mediante este mecanismo, el tejido adiposo se comunica con el cerebro para informarle de que la ingesta de alimentos ha sido suficiente. Los animales *obesos* tienen una mutación en el gen de la leptina, de manera que sintetizan una hormona que no es biológicamente activa y, por consiguiente, el cerebro de estos animales no recibe la señal adecuada para dejar de comer. Desafortunadamente, en la mayoría de los individuos obesos la concentración de leptina se encuentra anormalmente elevada, no disminuida. Pero los pocos pacientes obesos que tienen una deficiencia genética de leptina responden bien al tratamiento con esta hormona reduciendo la acumulación de grasa en el cuerpo.

Aunque el descubrimiento de la leptina no condujo a la curación de la obesidad, sí cambió para siempre la manera de pensar acerca de la fisiopatología de la obesidad. Desde el descubrimiento de la leptina, se han descubierto otras hormonas y citoquinas –proteínas cuya actividad principal es el control de la inflamación– que tienen su origen en el tejido adiposo y que regulan el apetito y/o el metabolismo de los lípidos, como la adiponectina –una hormona sintetizada por el tejido adiposo que favorece la oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa y cuyos niveles en sangre son inversamente proporcionales al IMC–, resistina –una hormona sintetizada por el tejido adiposo relacionada con la inflamación y la diabetes– y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  –TNF- $\alpha$ , una citoquina involucrada en la regulación de la muerte, diferenciación y proliferación celular, que juega un importante papel en la etiología de diversas enfermedades, incluida la diabetes–. Es decir, el tejido adiposo no funciona exclusivamente como un depósito de grasa, sino que desempeña también un papel fundamental en el control del apetito y del metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono.

Las señales que impulsan a comer deben estar en equilibrio con el centro de control del apetito del cerebro, de manera que éste pone en marcha el deseo de comer de nuevo cuando se produce un balance energético negativo.

Los estudios llevados a cabo durante los últimos quince años con ratones genéticamente modificados han permitido identificar nuevos genes de la obesidad. La mayoría de los animales genéticamente manipulados que desarrollan obesidad lo hacen porque comen más. Su obesidad extrema está causada por mutaciones que afectan sus hábitos de alimentación. Es el aumento en la ingesta de alimentos, y no la capacidad de metabolizar la grasa, lo que causa la obesidad. Es decir, la mayoría de los genes de la obesidad regulan el apetito, no el metabolismo lipídico. Así, un ratón mutante obeso, que ha recibido el nombre de ratón *diabético*, es deficiente en el receptor de leptina. El problema de este ratón es que la falta de un receptor de leptina biológicamente activo hace imposible que la leptina pueda informar a las células del cerebro de que hay que parar de comer. Otro ratón obeso, conocido como el ratón *amarillo*, tiene una mutación que afecta a la ruta de la pro-opiomelanocortina (POMC), que es importante para reducir el apetito. La mutación de estos genes de la obesidad produce la acumulación de grasa en los ratones, con independencia de la existencia de otros factores genéticos o ambientales. En general, la situación en humanos es más compleja y resulta poco frecuente que la obesidad se produzca como consecuencia de la mutación de un único gen. En humanos, lo más frecuente es que haya más de un gen implicado en el desarrollo de la obesidad y que el medio ambiente desempeñe también un importante papel en la acumulación de grasa en el cuerpo. Es decir, a nivel individual los hábitos de alimentación son la principal causa que llevan a un individuo a ser obeso, aunque las características genéticas del individuo pueden jugar un papel importante en ese comportamiento.

Los ácidos grasos son los componentes grasos de las moléculas de triglicéridos. Los triglicéridos son el principal componente de la grasa en el tejido adiposo y en los alimentos. Además de provenir de los alimentos, los ácidos grasos también pueden ser sintetizados a partir de los hidratos de carbono, principalmente en el hígado. Los ácidos grasos son una importante reserva de energía, no sólo porque tienen una mayor densidad calórica por gramo que los azúcares o las proteínas, sino porque son hidrófobos, es decir, no atraen agua sino que la repelen y, por consiguiente, pueden almacenarse en el cuerpo de manera más compacta que los carbohidratos o las proteínas, que si atraen agua. Así, mientras que la densidad calórica de la grasa es de 9 kcal por gramo, la de los azúcares y las proteínas es de alrededor de 4 kcal por gramo. Pero, además, mientras que las grasas no acumulan agua, los carbohidratos acumulan 2 gramos de agua por gramo de azúcar. Es decir, hay aproximadamente seis veces más energía almacenada por gramo de grasa que por gramo de azúcar. O dicho de otra manera, si el cuerpo humano almacenase energía en forma de carbohidratos en lugar de en forma de grasa, un individuo necesitaría almacenar cerca de 100 kilos de glucógeno para tener la energía equivalente a 15

kilos de grasa, que es, aproximadamente, la cantidad de grasa que tiene un individuo adulto no obeso.

Cuando los triglicéridos de los alimentos entran en el estómago, los ácidos estomacales, las sales biliares y las enzimas digestivas, conocidas como lipasas, rompen estos triglicéridos en sus dos componentes: ácidos grasos y glicerol. Las lipasas son sintetizadas por el páncreas y las sales biliares provienen del hígado a través de la vesícula biliar. Una vez liberados de los triglicéridos, los ácidos grasos entran dentro de las células que forman la pared intestinal para ser convertidos, de nuevo, en triglicéridos y formar, junto a ésteres de colesterol, fosfolípidos y proteínas unas nano-partículas denominadas quilomicrones. Los quilomicrones son transportados a la sangre a través del sistema linfático. Una vez en la sangre, los quilomicrones intercambian triglicéridos por ésteres de colesterol con otras lipoproteínas denominadas lipoproteínas de alta densidad. A su paso, a través de los capilares sanguíneos, por el tejido adiposo, los músculos, el corazón y otros tejidos no hepáticos, los quilomicrones van perdiendo su carga de ácidos grasos mediante la acción de la enzima lipoproteína lipasa. Los ácidos grasos así generados se oxidan para producir la energía que cada uno de estos tejidos requiere para cumplir su función biológica, o se acumulan en forma de triglicéridos. Finalmente, el remanente de quilomicrones en la sangre, prácticamente liberados totalmente de su carga de triglicéridos, es transportado al interior de las células del hígado para ser metabolizados.

La ingesta de alimentos también induce la secreción de insulina. La secreción de insulina por las células b del páncreas estimula la síntesis de glucógeno en el músculo y en el hígado. En el tejido adiposo, la insulina también estimula el metabolismo de la glucosa y la síntesis de glicerol, la molécula a la que se unen los ácidos grasos para formar triglicéridos. También en el hígado, la insulina suprime la gluconeogénesis –síntesis de glucosa y glucógeno– y acelera la glicolisis –metabolismo de la glucosa–, lo cual aumenta la síntesis de ácidos grasos que se acumulan en forma de triglicéridos. Si de forma crónica la ingesta de grasa e hidratos de carbono es superior a su consumo, el exceso de energía se acumula en forma de triglicéridos, principalmente en el tejido adiposo, causando obesidad. Parte de este exceso de grasa acumulado en el tejido adiposo es transportado hacia el hígado, a través de la sangre, en forma de ácidos grasos libres unidos a la albúmina. Finalmente, estos ácidos grasos se acumulan en forma de triglicéridos en el hígado, produciendo NAFLD.

Sabemos, desde hace por lo menos 500 años, que cuando se sobrealimentan patos y ocas desarrollan hígado graso. En 1570, Bartolomé Scappi, cocinero del papa Pío V, publicó un libro de cocina titulado *Opera* en el que escribía que «el hígado de las ocas domésticas criadas por lo judíos alcanzaba un tamaño extremo de 3 libras». La sobrealimentación no sólo produce NAFLD en las aves. En el laboratorio, la sobrealimentación de ratas y ratones con

una dieta rica en ácidos grasos y carbohidratos, para inducir la generación de hígado graso sigue siendo un método experimental de uso muy extendido.

Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos diez años empleando ratones genéticamente modificados han sido fundamentales para demostrar que, cuando se inactivan ciertas enzimas que son clave para la síntesis hepática de los ácidos grasos y triglicéridos, tales como la acetil-coenzima A carboxilasa, diacilglicerol aciltransferasa, elongasa de ácidos grasos de cadena larga, glicerol 3-fosfato aciltransferasa mitocondrial y esteroil-coenzima A desaturasa, se previene la formación de hígado graso inducida por una dieta rica en grasa y carbohidratos (Postic y Girard 2008). Estos datos sugieren que la disminución de la síntesis hepática de triglicéridos es, potencialmente, una importante diana terapéutica para el tratamiento de NAFLD. Sin embargo, es importante hacer hincapié en que la acumulación de triglicéridos en el hígado no es necesariamente tóxica, sino que es quizás una forma de proteger al hígado de la toxicidad causada por los ácidos grasos libres, es decir, los ácidos grasos que no están unidos a moléculas de glicerol formando triglicéridos. Por ejemplo, en los ratones *obesos* la inhibición de la síntesis de triglicéridos mejora la esteatosis pero empeora el daño hepático –necrosis, inflamación y fibrosis– (Yamaguchi y cols. 2007). Los ácidos grasos libres, si no se oxidan para producir energía, son metabolizados por el sistema microsomal denominado citocromo P450 2E1 –CYP2E1 es particularmente activo en el hígado y, además de metabolizar sustancias exógenas como el alcohol, drogas y pro-carcinógenos, también participa en el metabolismo del colesterol, ácidos biliares y ácidos grasos–. El metabolismo de los ácidos grasos a través de CYP2E1 genera sustancias citotóxicas, como las sustancias reactivas del oxígeno (ROS) y lípidos peroxidados, que producen inflamación y necrosis hepática.

En el hígado, las moléculas de triglicéridos se acumulan en el citoplasma de los hepatocitos formando pequeñas gotas de lípidos. Estas gotas de lípidos no son una simple acumulación de triglicéridos, como las que se forman cuando se mezcla aceite con agua, sino que son organelos que requieren, para formarse, de la presencia de ciertas proteínas específicas. Una de estas proteínas recibe el nombre de ADFP. Los ratones deficientes en ADFP no desarrollan NAFLD cuando se sobrealimentan con una dieta rica en grasa (Chang y cols 2006). Aunque ADFP es potencialmente una diana terapéutica para el tratamiento de NAFLD, se desconoce si la inhibición de la acumulación de triglicéridos en animales *obesos* mediante la inhibición de ADFP puede aumentar el daño hepático. Otra aproximación experimental, que ha sido empleada para prevenir NAFLD, es bloquear la actividad de ciertos factores de transcripción –proteínas que se unen al DNA y que regulan la expresión de genes específicos– que controlan la síntesis de lípidos. Uno de estos factores de transcripción,

que recibe el nombre de SREBP-1c, media el efecto de la insulina sobre la expresión de las enzimas que regulan la síntesis de ácidos grasos. Los ratones *obesos* deficientes en SREBP-1c mejoran la esteatosis (Yahagi y cols. 2002), aunque se desconoce si a largo plazo la inhibición de SREBP-1c puede aumentar el daño hepático. En resumen, aunque la inhibición de la síntesis de triglicéridos o de su acumulación en forma de vesículas en el hígado son, teóricamente, buenas aproximaciones terapéuticas para prevenir NAFLD, es importante recordar que estos procedimientos no están exentos de posibles efectos secundarios que pueden producir daño hepático y, por consiguiente, su aplicación clínica no es obvia.

Sorprendentemente, la desnutrición puede también provocar hígado graso. El mecanismo por el que la desnutrición provoca NAFLD no es del todo conocido, aunque los estudios realizados en los últimos años, empleando animales genéticamente modificados, han proporcionado nuevos datos sobre la importancia de ciertos nutrientes en el desarrollo de NAFLD.

En 1930, Banting y Best, los descubridores de la insulina, observaron que los perros diabéticos tratados con insulina desarrollaban hígado graso y que esta situación podía ser corregida mediante la administración de colina –la colina es un micro-nutriente precursor de la síntesis de metionina–. Unos años más tarde, Best, Du Vigneaud y otros grupos de investigación observaron que, cuando se alimenta a ratas o ratones con una dieta deficiente en metionina y colina, en unas pocas semanas también desarrollan esteatosis que progresa a NASH, e incluso en algunos animales a HCC, si esta dieta se mantiene. Estos animales alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina no sólo no son *obesos* sino que, en general, pesan menos que los ratones alimentados con una dieta normal. Estos experimentos, además de relacionar la esteatosis con la diabetes, proporcionaron evidencia, por primera vez, sobre la importancia de un grupo de micronutrientes denominados donantes de grupos metilo –colina, metionina, betaina, y ácido fólico– en la prevención de la esteatosis (Mato y cols. 2008).

En mamíferos, incluidos los humanos, la metionina es un aminoácido esencial, es decir, no puede ser sintetizado por el cuerpo sino que tiene que ser suministrado con los alimentos. Cuando se administra metionina a una persona por vía oral, los niveles en sangre de este aminoácido aumentan de manera transitoria recuperando los niveles basales en dos o tres horas. La velocidad a la que una persona recupera los niveles basales de metionina después de su ingesta es un indicador del metabolismo de este aminoácido por el cuerpo. En pacientes cirróticos, el metabolismo de la metionina es marcadamente más lento que en individuos con función hepática normal. El primer paso en el metabolismo de la metionina es su conversión a S-adenosilmetionina –S-AMe–, una molécula descubierta por Giulio Cantoni en 1953 (Cantoni 1975). La S-AMe ocupa

un lugar especial en la biología debido a la capacidad que tiene de modificar, mediante la adición de un grupo metilo –se denomina grupo metilo a un átomo de carbono que tiene unidos tres átomos de hidrógeno–, a otras moléculas, tales como el DNA, las proteínas y los fosfolípidos, modificando su actividad biológica. Esta reacción, conocida con el nombre general de metilación, puede hacer que ciertos genes no se expresen, es decir, puede causar el mismo resultado que una mutación genética pero el mecanismo no es genético sino epigenético.

La síntesis de SAMe se encuentra marcadamente reducida en el hígado de los pacientes cirróticos (Duce y cols. 1988), y el tratamiento con SAMe aumenta la supervivencia en pacientes con cirrosis alcohólica (Mato y cols. 1999), lo cual confirma el importante papel de la alteración del metabolismo de la metionina en la progresión de la enfermedad hepática. Consecuentemente, los ratones deficientes en la síntesis hepática de SAMe, aunque no son obesos y tienen un tamaño normal, desarrollan esteatosis, NASH y HCC (Lu y cols. 2001). En los ratones deficientes en la enzima glicina N-metiltransferasa, la principal enzima que metaboliza SAMe en el hígado, la concentración hepática de SAMe es alrededor de 40 veces más elevada que en los ratones normales (Martínez-Chantar y cols. 2008). Sorprendentemente, estos ratones «super-SAMe», aunque tienen un tamaño normal y no son obesos, también desarrollan esteatosis, NASH y HCC. Estos resultados indican que, tanto la deficiencia como el exceso hepático de SAMe inducen NAFLD, e incluso la aparición de HCC, en ausencia de obesidad, lo cual pone de manifiesto la importancia del metabolismo de los grupos metilo en la regulación de la función hepática, y complican la utilización terapéutica de esta molécula.

La actividad CYP2E1 hepática está aumentada en los pacientes con NASH, en los diabéticos y en los individuos que han ayunado prolongadamente. La actividad CYP2E1 hepática también está aumentada en los pacientes con esteatohepatitis alcohólica, una enfermedad muy similar a NASH. Además, la actividad CYP2E1 hepática está incrementada en los animales que han sido alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina, y en los ratones deficientes en la síntesis hepática de SAMe. Estos y otros resultados han demostrado la importancia del estrés oxidativo generado por la peroxidación de lípidos vía CYP2E1

en la patogénesis de NASH, es decir, en la progresión de esteatosis a NASH. Sorprendentemente, la deficiencia de CYP2E1 en ratones no previno el desarrollo de NASH inducido por una dieta deficiente en metionina y colina, ni evitó la peroxidación de lípidos, indicando la existencia de un sistema de peroxidación lipídica alternativo que actúa en ausencia de CYP2E1 (Leclercq y cols. 2000). Estos autores también observaron que en los ratones deficientes en CYP2E1, tratados con una dieta deficiente en metionina y colina, la expresión hepática de CYP4A10 y CYP4A14 está inducida y que estas dos enzimas son las responsables de la peroxidación lipídica y generación de ROS en estos animales. CYP4A10 y CYP4A14 forman parte de la familia de enzimas microsomales conocida con el nombre genérico de CYP 450 y de la que CYP2E1 es también uno de sus miembros. Es decir, otros miembros de la familia CYP 450, que en condiciones normales son poco activos, pueden sustituir a CYP2E1 en la peroxidación de lípidos cuando la actividad de esta enzima se encuentra inhibida o mutada. Esto es lo que les ocurre a los ratones «super-SAMe». SAMe es un inhibidor de la expresión hepática de CYP2E1 y, por consiguiente, su expresión está inhibida en los ratones «super-SAMe» aunque hayan desarrollado NAFLD. En estos ratones, como en los animales deficientes en CYP2E1 alimentados con una dieta deficiente en metionina y colina, es la expresión de CYP4A10 y CYP4A14 la que se encuentra estimulada y cataliza la peroxidación de lípidos y formación de ROS.

Una conclusión importante de estos estudios es que las aproximaciones terapéuticas que tienen como diana una única enzima del sistema microsomal CYP P450 no son eficaces para prevenir la generación de ROS y la peroxidación de lípidos y, por consiguiente, bloquear la iniciación y progresión de NASH. Una de las características principales de la biología es la redundancia de las rutas bioquímicas que controlan funciones biológicas esenciales, como la proliferación celular o la defensa contra agentes externos citotóxicos. La ventaja evolutiva de haber desarrollado un sistema complejo, como el CYP 450, integrado por decenas de enzimas cuya misión es proteger al hígado de la acción citotóxica de innumerables xenobióticos, es obvia; a cambio, la redundancia de las enzimas del complejo CYP 450 es una desventaja cuando se persigue neutralizar este sistema y así evitar sus efectos secundarios, como es la progresión a NASH en individuos con esteatosis.

## Bibliografía

- Abdelmalek M. F. y A. M. Diehl. «Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance». *Journal Med. Clin. North Am* 91 (noviembre 2007): 1.125.
- Adams L. A. y K. D. Lindor. «Nonalcoholic fatty liver disease». *Journal Ann. Epidemiol* 17 (noviembre 2007): 863.
- Ahmed M. H. y Byrne C. D. «Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)». *Journal Drug Discovery Today* 12 (septiembre 2007): 740.
- «Alzheimer». *Psych. genchtl Med* 64 (1907): 146.
- Amadoro, G., M. T. Ciotti, M. Costanzi, V. Cestari, P. Calissano y N. Canu. «NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation». *Journal Proc Natl Acad Sci USA* 103 (febrero 2006): 2892.
- Angulo P. «Obesity and nonalcoholic fatty liver disease». *Journal Nutr. Rev.* 65 (junio 2007): S57.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte y B. T. Hyman. «Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease». *Journal Neurology* 42 (marzo 1992): 631.
- Avila, J., J. J. Lucas, M. Pérez y F. Hernández. «Role of tau protein in both physiological and pathological conditions». *Journal Physiol Rev.* 84 (abril 2004): 361.
- Baki, L., J. Shioi, P. Wen, Z. Shao, A. Schwarzman, M. Gama-Sosa, R. Neve y N. K. Robakis. «PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations». *Journal Embo* 23 (julio 2004): 2.586.
- Blennow, K. y H. Zetterberg. «Pinpointing plaques with PIB». *Journal Nat Med* 12 (julio 2006): 753.
- Braak, H. y E. Braak. «Neuropathological staging of Alzheimer-related changes». *Journal Acta Neuropathol* 82 (1991): 239.
- Brittberg, M., A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson y L. Peterson. «Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation». *Journal N Engl J Med* 331 (octubre 1994): 889.
- Cantoni G.L. «Biochemical methylations: selected aspects». *Journal Ann. Rev. Biochem.* 45 (1975): 285-306.
- Chang B. H.-J., J. Li, A. Paul, S. Taniguchi, V. Nanegari, W. C. Herid y L. Chan. «Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein». *Journal Mol. Cell. Biol.* 26 (febrero 2006): 1.063.
- Duce A. M., P. Ortiz, C. Cabrero y J. M. Mato. «S-Adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis». *Journal Hepatology* 8 (enero-febrero 1988): 1.530.
- Engel, T., J. J. Lucas, P. Gómez-Ramos, M. A. Morán, J. Avila y F. Hernández. «Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration». *Journal Neurobiol Aging* 27 (septiembre 2006): 1.258.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver y C. C. Mello. «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*». *Journal Nature* 391 (febrero 1998): 806.
- Glenner, G. G. y C. W. Wong. «Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein». *Journal Biochem Biophys Res Commun* 122 (agosto 1984): 1.131.
- Gómez-Ramos, A., M. Díaz-Hernández, A. Rubio, M. T. Miras-Portugal y J. Avila. «Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells». *Journal Mol Cell Neurosci* 37 (abril 2008): 673.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski y L. I. Binder. «Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology». *Journal Proc Natl Acad Sci USA* 83 (julio 1986): 4.913.
- Hardy, J. y D. J. Selkoe. «The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics». *Journal Science* 297 (julio 2002): 353.
- Harkany, T., I. Abraham, W. Timmerman, G. Laskay, B. Toth, M. Sasvari, C. Konya, et al. «Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis». *Journal Eur J Neurosci* 12 (agosto 2000): 2.735.
- Hernández, F., J. Borrell, C. Guaza, J. Avila y J. J. Lucas. «Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments». *Journal J Neurochem* 83 (diciembre 2002): 1.529.
- Kennedy, D. «Breakthrough of the year». *Journal Science* 318 (diciembre 2007): 1.833.
- Kerr, J. N. y W. Denk. «Imaging in vivo: watching the brain in action». *Journal Nat Rev Neurosci* 9 (marzo 2008): 195.
- Kukar, T. L., T. B. Ladd, M. A. Bann, P. C. Fraering, R. Narlawar, G. M. Maharvi, B. Healy, et al. «Substrate-targeting gamma-secretase modulators». *Journal Nature* 453 (junio 2008): 925.
- Kurtzberg, J., M. Laughlin, M. L. Graham, C. Smith, J. F. Olson, E. C. Halperin, G. Ciocci, et al. «Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients». *Journal N Engl J Med* 335 (julio 1996): 157.
- Leclercq I. A., G. C. Farell, J. Field, D. R. Bell, F. J. González y G. H. Robertson. «CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis». *Journal J. Clin. Invest.* 105 (abril 2000): 1.067.
- Logothetis, N. K. «What we can do and what we cannot do with fMRI». *Journal Nature* 453 (junio 2008): 869.
- Lu S. C., L. Álvarez, Z. Z. Huang, L. Chen, W. An, F. J. Corrales, M. A. Avila, et al. «Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation». *Journal Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (mayo 2001): 5.560.
- Lucas, J. J., F. Hernández, P. Gómez-Ramos, M. A. Morán, R. Hen y J. Avila. «Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice». *Journal Embo* 20 (enero 2001): 27.
- Mato J. M., M. L. Martínez-Chantar y S. C. Lu. «Methionine metabolism and liver disease». *Journal Annu. Rev. Nutr.* 28 (agosto 2008): 273.
- Mackman, N. «Triggers, targets and treatments for thrombosis». *Journal Nature* 451 (febrero 2008): 914.
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks et al. «The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells». *Journal Cell* 133 (mayo 2008): 704.
- Martínez-Chantar M. L., M. Vázquez-Chantada, U. Ariz, N. Martínez, M. Varela, Z. Luka, A. Capdevila et al. «Loss of glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice». *Journal Hepatology* 47 (abril 2008): 1.191.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald y K. Beyreuther. «Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome». *Journal Proc Natl Acad Sci USA* 82 (junio 1985): 4.245.

- Mato J. M., J. Camara, J. Fernández de Paz, L. Caballería, S. Coll, A. Caballero, L. García-Buey, et al. «S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrosis: a randomized placebo-controlled, double-blind, multicenter clinical trial». *Journal J. Hepatol.* 30 (junio 1999): 1.081.
- Montejo de Garcini, E., L. Serrano y J. Avila. «Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease». *Journal Biochem Biophys Res Commun* 141 (diciembre 1986): 790.
- Mount, C. y C. Downton. «Alzheimer disease: progress or profit?». *Journal Nat Med* 12 (julio 2006): 780.
- O'Connor, N. E., J. B. Mulliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde y H. Green. «Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells». *Journal Lancet* 8.211 (enero 1981): 75.
- Parsons, C. G., W. Danysz y G. Quack. «Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data». *Journal Neuropharmacology* 38 (junio 1999): 735.
- Pedersen, W. A., P. J. McMillan, J. J. Kulstad, J. B. Leverenz, S. Craft y G. R. Haynatzki. «Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice». *Journal Exp Neurol* 199 (junio 2006): 265.
- Postic, C. y J. Girard. «Contribution of de novo fatty acid sintesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice». *Journal J. Clin. Invest.* 118 (marzo 2008 ): 829.
- Price, D. L., R. E. Tanzi, D. R. Borchelt y S. S. Sisodia. «Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models». *Journal Annu Rev Genet* 32 (1998): 461.
- Rader, D. J. y A. Daugherty. «Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis». *Journal Nature* 451 (febrero 2008): 904.
- Ray, S., M. Britschgi, C. Herbert, Y. Takeda-Uchimura, A. Boxer, K. Blennow, L. F. Friedman et al. «Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins». *Journal Nat Med* 13 (noviembre 2007): 1.359.
- Reisberg, B., R. Doody, A. Stoffer, F. Schmitt, S. Ferris y H. J. Mobius. «Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease». *Journal N Engl J Med* 348 (abril 2003): 1.333.
- Segers, V. F. y R. T. Lee. «Stem-cell therapy for cardiac disease». *Journal Nature* 451 (febrero 2008): 937.
- Stephen Salloway, J. M., F. W. Myron, y J. L. Cummings. «Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease». *Journal/Alzheimer's Et Dementia* 4 (2008): 65.
- Sturm, R. «The effects of obesity, smoking and drinking on medical problems and costs». *Journal Health Affaire* 21 (marzo-abril 2002): 245.
- Takahashi, K. y S. Yamanaka. «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors». *Journal Cell* 126 (agosto 2006): 663.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall y J. M. Jones. «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Journal Science* 282 (noviembre 1998): 1.145.
- Vas, C. J. «Alzheimer's disease: The brain killer». World Health Organization (2001).
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith et al. «The sequence of the human genome». *Journal Science* 291 (febrero 2001): 1.304.
- Wang, J., L. Ho, W. Zhao, K. Ono, C. Rosensweig, L. Chen, N. Humala, D. B. Teplow y G. M. Pasinetti. «Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease». *Journal J Neurosci* 28 (junio 2008): 6.388.
- Wernig, M., J. P. Zhao, J. Pruszak, E. Hedlund, D. Fu, F. Soldner, V. Broccoli et al. «Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease». *Journal Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (abril 2008): 5.856.
- Wold, B. y R. M. Myers. «Sequence census methods for functional genomics». *Journal Nat Methods* 5 (enero 2008): 19.
- Yahagi N., H. Shimano, A. H. Hasty, T. Matsuzaka, T. Ide, T. Yoshikawa, M. Amemiya-Kudo et al. «Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep (ob/Lep(ob) mice». *Journal J. Biol. Chem.* 277 (mayo 2002): 19.353.
- Yamaguchi K., L. Yang, S. McCall, J. Huang, X. X. Yu, S. K. Pandey, S. Bhanot et al. «Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis». *Journal Hepatology* 45 (junio 2007): 1.366.
- Zhang Y., M. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold y J. M. Friedman. «Positional cloning of the mouse gene obese and its human homologue». *Journal Nature* 372 (diciembre 1994): 425.