

**Evaluación del proceso autofágico y
activación del complejo inflamasoma
como mecanismos implicados en la
fisiopatología de Tay-Sachs**

**Grupo de investigación etiológica y patogenia
periodontal, patología oral y enfermedades
musculares**
Universidad de Sevilla

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Tay-Sachs es una enfermedad de herencia genética que afecta al sistema nervioso central. Con un perfil clínico caracterizado por una neurodegeneración progresiva, la enfermedad es incurable y los pacientes generalmente fallecen antes de los cinco años de vida. La prevalencia en la población general es de 1 cada 360.000 nacimientos, pero se ha demostrado que 1 de cada 250 personas es portadora de la enfermedad. La enfermedad se produce por la ausencia de una enzima llamada Beta-hexosaminidasa cuya principal función es descomponer los residuos tóxicos (gangliosidósidos) que la actividad cerebral va dejando, para que la célula pueda reciclarlos dentro de un área de depósito, el aparato lisosomal. Esto conlleva una progresiva acumulación de basura celular que provocará un incremento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, la muerte celular y neuroinflamación.

En este sentido, adquieren especial relevancia dos eventos que se producen a nivel celular y que podrían estar involucrados en la fisiopatología de la enfermedad: la autofagia y el complejo inflamasoma. El presente proyecto, autoría del Grupo de Investigación de Medicina Oral y Enfermedades Neuromusculares de la Universidad de Sevilla, propone el estudio y modulación del proceso autofágico y la activación del complejo inflamasoma como mecanismos implicados en la enfermedad, así como su corrección mediante diferentes compuestos en modelos celulares de fibroblastos de piel procedentes de pacientes con Tay-Sachs y Sandhoff.

Para ello, mediante el uso de fibroblastos de piel aislados de pacientes con Tay-Sachs y Sandhoff, se evaluará el mecanismo autofágico mediado por las rutas mTOR y AMPK. Además, se estudiará la activación del complejo NLRP3-inflamasoma mediante el estudio de las proteínas NLRP3, caspasa 1 y las formas activas de IL-1 β e IL-18, el estrés oxidativo y disfunción mitocondrial así como la biogénesis mitocondrial. Por último, se evaluará el efecto de la modulación mediante inductores de la autofagia, la fosforilación de AMPK y biogénesis mitocondrial que permitan a la célula la correcta degradación de basura celular y remodelación mitocondrial así como la inhibición de NLRP3 en los cultivos celulares.

2. ANTECEDENTES

La enfermedad de Tay-Sachs está causada por la ausencia de una enzima llamada **Beta-hexosaminidasa** (Hex A). Esta enzima se compone de dos subunidades α y β que interactúan con la proteína activadora de GM2. El gen HEXA localizado en el cromosoma 15 codifica la subunidad α (la enfermedad de Sandhoff tiene una fisiopatología similar, pero en su caso el gen HEXB localizado en el cromosoma 5 codifica las subunidades α y β). Su principal función es descomponer los residuos tóxicos (**gangliosidósidos**) que la actividad cerebral va dejando, para que la célula pueda absorberlos y reciclarlos dentro del **aparato lisosomal**. Al no realizarse esa

absorción, las zonas donde se acumulan se van hinchando y esa inflamación celular provoca que las células empiecen a fallar y mueran, causando un daño irreversible en el sistema nervioso central.

En base a esto, los dos principales problemas en esta enfermedad son: que carece o no produce la suficiente cantidad de la enzima y que poco a poco va acumulando muchas toxinas del tipo GM2. En este último caso, adquieren especial relevancia dos eventos que se producen a nivel celular y que podrían estar involucrados en la fisiopatología de la enfermedad: la autofagia y el complejo inflamasoma.

La **autofagia** es un proceso catabólico (proceso metabólico de degradación de sustancias) que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular (autorregulación de la célula para mantener sus condiciones estables) mediante la limpieza y reciclaje de la célula por la vía lisosomal, en la cual, los compuestos en exceso o aquellos deteriorados son englobados y liberados al interior del lisosoma, donde son digeridos para eliminarlos. Este constituye el principal mecanismo metabólico por el que las células reciclan sus componentes. El proceso genera una estructura llamada autofagosoma cuya membrana se fusiona con la del lisosoma (proceso conocido como flujo autofágico), formando un autolisosoma, en el que tanto la membrana del autofagosoma como todo su contenido, son degradados.

Si bien es cierto que no existen datos científicos sobre el estado del proceso autofágico en la enfermedad de Tay-Sachs, puesto que no se ha evaluado, en las enfermedades lisosomales sí se han realizado avances al respecto que avalan la hipótesis de una desregulación de este proceso en este grupo de patologías. Existen distintas rutas de señalización que regulan la autofagia. En esta vía convergen hormonas, factores de crecimiento y aminoácidos, y se ha comprobado que su bloqueo con determinados inhibidores conduce a un aumento en los niveles de autofagia. Esta ruta será la de mayor interés para este estudio.

Además, estas rutas se encuentran relacionadas con la **disfunción mitocondrial** (la mitocondria es la parte de la célula encargada de generar la energía necesaria para mantener la vida) mediante la eliminación autofágica de las mitocondrias disfuncionales (mitofagia) así como la producción de nuevas mitocondrias, siendo ambos mecanismos estudiados en otras patologías raras. Esta misma ruta se ha visto relacionada con la síntesis de antioxidantes.

Paralelamente la autofagia, así como estas rutas, se encuentran relacionadas con el **complejo inflamasoma**, un complejo multiproteico que comprende un sensor intracelular, responsable de la activación de los procesos inflamatorios. Su activación conduce al procesamiento de sus sustratos. La sobre-activación del inflamasoma ha sido descrita en patologías con características neurodegenerativas y neuroinflamatorias. La activación del complejo inflamasoma a nivel del sistema nervioso central se ha observado sobreactivada en muestras postmortem de pacientes con Tay-Sachs. Paralelamente, existen evidencias de altos niveles de marcadores

inflamatorios de pacientes con Tay-Sachs. Recientemente, se ha descrito una activación del complejo inflamasoma en un modelo celular de gangliosidosis GM1.

Por tanto, en base al conocimiento sobre la fisiopatología descrita en las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff, en este presente proyecto se propone el estudio del proceso autofágico y disfunción mitocondrial así como la activación del complejo inflamasoma como mecanismos implicados en las enfermedades, así como su corrección mediante diferentes compuestos en modelos celulares de fibroblastos de piel procedentes de pacientes con Tay-Sachs y Sandhoff.

3. OBJETIVOS

Los objetivos de esta investigación son:

1. La evaluación del estado del proceso autofágico como mecanismo de limpieza celular para la eliminación de desechos en las células de Tay Sachs así como de las rutas mTOR y AMPK y su relación con la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.
2. La evaluación de la posible activación del complejo NLRP3-inflamasoma como responsables de la muerte celular y neuroinflamación en Tay Sachs.
3. El cribado y selección farmacológica de compuestos que puedan restaurar el correcto estado metabólico de la célula y reducir la activación del complejo inflamasoma.

4. METODOLOGÍA

El estudio se realizará cumpliendo la Declaración de Helsinki y las Conferencias Internacionales de Armonización y Guía sobre buenas prácticas clínicas.

El abordaje se llevará a cabo mediante el uso de fibroblastos y muestras sanguíneas de más de una decena de pacientes con diagnóstico genético de Tay-Sachs o Sandhoff y mediante consentimiento informado firmado por el paciente o tutor legal donde se le explicará el objetivo, la finalidad del trabajo y el uso de los datos aportados. La selección de pacientes será coordinada por los miembros del comité de la Asociación Acción y Cura para Tay-Sachs (ACTAYS) y la información clínica será proporcionada por el médico del paciente.

Se procederá a la recogida ambulatoria de biopsias de piel en condiciones de esterilidad, mediante un punch de 4 mm de diámetro que abarcará epidermis y dermis. Los pacientes procederán de la base de datos de ACTAYS. La biopsia se realizará en las unidades de neuropediatría correspondientes a cada paciente, tras la cual se enviará la biopsia para su posterior tallado y procesado para la obtención de

cultivos de fibroblastos. Las biopsias cutáneas se recibirán en el laboratorio de cultivo celulares en las primeras 24 horas de su extracción.

Los parámetros de inflamación e inflamasoma se estudiarán también en muestras de sangre de los pacientes así como grupos control. Se procederá a la recogida ambulatoria de las muestras de sangre en condiciones de esterilidad, mediante vacutainer en tubos con anticoagulante EDTA. Se tomarán 16 ml de sangre por paciente

Además de las muestras de los pacientes, se incluirán las de igual número de personas sanas que servirán como control y que tendrán las mismas características en cuanto a edad y sexo, serán seleccionadas por los clínicos y tras firmar el correspondiente consentimiento informado.

Una vez iniciada la investigación en laboratorio se buscará determinar los niveles de proliferación celular, los niveles de coenzima Q (CoQ), el análisis de la cadena respiratoria mitocondrial, la producción mitocondrial de oxígeno reactivo (ROS), la peroxidación lipídica, se hará un análisis de la autofagia y la actividad lisosomal, entre otros procesos, para llegar a un análisis estadístico que relacione los niveles bioquímicos con las valoraciones clínicas y así deducir su significancia.

5. PLAN DE TRABAJO

En los dos primeros trimestres de trabajo se ha procedido a plantear el proyecto y contrastar su viabilidad, elaborar el proyecto para el Comité de Ética de Andalucía (aprobación obtenida en octubre 2015) así como establecer su presupuesto, y firmar el convenio entre los representantes legales designados de la Universidad de Sevilla y ACTAYS. El siguiente paso de esta etapa inicial será el de la selección de pacientes y obtención y aislamiento de fibroblastos y muestras necesarias.

PLAN DE TRABAJO							
TRIM 1	TRIM 2	TRIM 3	TRIM 4	TRIM 5	TRIM 6	TRIM 7	TRIM 8
Selección de pacientes y aislamiento de fibroblastos		OBJETIVO 1			OBJETIVO 2		OBJETIVO 3

El **Objetivo 1** se realizará en los trimestres 3, 4 y 5. Los estudios bioquímicos y moleculares en esta fase los realizarán los doctores Mario Cordero, Pedro Bullón y el equipo de doctorandos del grupo. El investigador principal supervisará todas las tareas.

En esta fase se van a estudiar todos los procesos que tienen lugar en la célula para la eliminación de los residuos celulares, así como el daño mitocondrial y estrés oxidativo que esto provoca, de forma que los investigadores puedan analizar que rutas de eliminación tienen las células de Tay-Sachs, activas o alteradas, y cómo establecer su compensación.

El **Objetivo 2** se realizará en los trimestres 5, 6 y 7. Los estudios bioquímicos y moleculares en esta fase los realizarán los doctores Mario Cordero y Elisabet Alcocer y el equipo de doctorandos del grupo. El investigador principal supervisará todas las tareas.

En esta fase se va a estudiar todo el mecanismo de activación del complejo inflamasoma y otras eventuales rutas inflamatorias que posiblemente estén activas en estas células como consecuencia de la acumulación de basura celular.

El **Objetivo 3** se realizará en los trimestres 6, 7 y 8. El screening o cribado farmacológico en esta fase lo realizarán los doctores Mario Cordero, Pedro Bullón y Elisabet Alcocer y el equipo de doctorandos del grupo. El investigador principal supervisará todas las tareas.

En esta fase, una vez localizadas todas las rutas de las estudiadas previamente que estén alteradas, así como todos aquellos elementos del inflamasoma que están provocando daño a la célula, se probará el efecto de diferentes compuestos y fármacos para ver cuál de ellos puede restaurarlo.

Todas las tareas experimentales se realizarán en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

6. RESULTADOS ESPERADOS

Dadas las escasas investigaciones que existen alrededor de esta patología, este estudio propone un nuevo enfoque en los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff. Este proyecto pretende dilucidar el mecanismo de regeneración de la célula y las consecuencias que provoca la acumulación de basura desde el punto de vista neuroinflamatorio. Por tanto, se espera por un lado desarrollar nuevas estrategias terapéuticas enfocadas a la inhibición del complejo inflamasoma, activado en patologías que cursan con mecanismo acumulativos similares como el alzheimer, y por tanto reducir la neuroinflamación y los acúmulos celulares.

En este sentido, este proyecto propone el uso de compuestos ya existentes que modulen los campos genómicos y proteómicos propuestos. Esto es de vital importancia dado que en la actualidad los pocos proyectos existentes en Reino Unido y Australia en esta patología están enfocados en la terapia génica. Este sistema

propondrá una óptima terapia sustitutoria en estos pacientes, pero su puesta en práctica se prevé a largo plazo, por tanto, se requieren terapias que planteen un tratamiento a corto/medio plazo. Este proyecto aportará nuevos compuestos y mecanismos para el abordaje clínico y terapéutico de estos pacientes.

En resumen, se espera con este proyecto una mejora significativa en el abordaje diagnóstico y terapéutico de los procesos que abordan estas enfermedades a través de un mayor conocimiento de sus bases moleculares.

Acción y Cura para Tay-Sachs se dedica a la lucha contra las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff en España. Sus principales cometidos son captar fondos para la investigación, apoyar a las familias afectadas y crear conciencia sobre estas enfermedades

www.acciontaysachs.org

El Consorcio Europeo de Tay-Sachs (ETSCC) representa una voz unificada en Europa en la lucha contra las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff.

www.etfcc.org