

# Resultados preliminares del estudio de la muerte neuronal y de la expresión de la proteína bcl-2 en la enfermedad de Alzheimer.

E. Erro, T. Tuñón

*Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de Navarra.*

**RESUMEN.** La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso degenerativo del sistema nervioso que junto a los cambios histopatológicos clásicamente conocidos de formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares se acompaña de una variable pérdida de neuronas. Se ha postulado que esta muerte neuronal puede ocurrir por un mecanismo de apoptosis. Las células en apoptosis pueden identificarse añadiendo mediante la enzima terminal-deoxinucleotidil-transferasa (Tdt) nucleótidos marcados a los terminales 3'-OH que se liberan al fragmentarse el ADN a nivel internucleosomal. Con esta técnica se han identificado neuronas en apoptosis en cerebros de 5 pacientes con EA con más frecuencia que en controles de edades correlativas. También se han estudiado por técnicas de inmunohistoquímica la expresión de la proteína antiapoptótica bcl-2 y no se ha encontrado inmunorreactividad en neuronas pero sí un aumento de la misma en astrocitos en cerebros de pacientes con EA con respecto a los controles. La elevada expresión de bcl-2 en células gliales en la EA contribuiría a su propia supervivencia y podría a su vez influir en la pérdida neuronal.

**SUMMARY.** Alzheimer's disease (AD) is a degenerative central nervous system disorder where beside the histopathologic features of senile plaques and neurofibrillary tangles there is an important neuronal loss. It has been suggested that this neuronal death occurs via an apoptotic mechanism. Recognition of apoptotic cells is possible by an in situ end-labeling technique which identify the 3'-OH termini of DNA strands breaks through the incorporation of labeled nucleotides with the enzyme terminal-deoxinucleotidyl transferase (Tdt). We have applied this technique and high densities of apoptotic cells were found in 5 AD brains compared to 5 age-matched normal samples. We studied by immunohistochemical analyses the expression of the antiapoptotic protein bcl-2. We

have not found neuronal bcl-2 immunoreactivity and we found an increased expression of bcl-2 by astrocytes compared to controls, this fact may aid glial survival or may have a deleterious effect on neuronal viability.

(*Rev Med Univ Navarra* 1997; 41: 28-33).

## Palabras clave

Enfermedad de Alzheimer. Apoptosis. Bcl-2. Neuronas. Astrocitos.

## Key words

Alzheimer's disease. Apoptosis. Bcl-2. Neurons. Astrocytes.

## Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso degenerativo del sistema nervioso que se manifiesta clínicamente por demencia. Las características patológicas que la definen son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Además de estos hallazgos en la EA se produce una importante pérdida neuronal cuyo desencadenante y mecanismo intrínseco se desconocen (1). Una hipótesis que ha surgido recientemente es que esta muerte neuronal se produzca por apoptosis (2).

La apoptosis es un tipo de muerte celular en la que la célula juega un papel activo en su propia destrucción, se produce en células individualizadas, no desencadena reacción inflamatoria y requiere la expresión de genes y la síntesis de proteínas (3,4). Se ha identificado con frecuencia con la muerte celular programada (MCP) aunque no son el mismo proceso. La MCP es una forma de apoptosis que tiene lugar durante el desarrollo embrionario (5,6). El término apoptosis hace referencia a las características morfológicas

del proceso y que consisten en: condensación y marginación de la cromatina, integridad de la membrana y organelas celulares y fragmentación en cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas (7,8). Se produce en condiciones fisiológicas como en el "turn-over" celular normal del adulto o en la delección de células T y en situaciones patológicas como la muerte de células infectadas por virus (9).

Durante la apoptosis se produce una fragmentación del ADN por endonucleasas a nivel internucleosomal liberando terminales 3'-OH que pueden señalarse añadiéndoles mediante la enzima Tdt nucleótidos marcados que se revelan por un método colorimétrico. Esta técnica (TUNEL) permite identificar células en apoptosis in vivo con bastante especificidad (10).

Por otro lado es posible estudiar los genes y proteínas que regulan la apoptosis. Así, el bcl-2 es un proto-oncogen cuyo producto es una proteína de 26 kD que se asocia a varias membranas celulares, entre ellas la membrana interna mitocondrial (11). Se expresa en varios tejidos postmitóticos incluyendo el sistema nervioso sobre todo en neuronas simpáticas y otros tipos neuronales que dependen de factores tróficos para su supervivencia (12). Se ha comprobado que el bcl-2 impide la muerte celular programada de linfocitos y contribuye a la oncogénesis bloqueando la apoptosis (13). También se ha demostrado en cultivos celulares de neuronas simpáticas de rata que la inyección de RNA-m de bcl-2 impide la muerte neuronal que se deriva de la privación de factores de crecimiento, aunque el mecanismo por el que bloquea la apoptosis se desconoce (14,15).

El papel fisiológico del bcl-2 no está claro. Es posible que contribuya a regular la muerte celular en las enfermedades degenerativas (12)

En este trabajo se ha estudiado la expresión de la proteína bcl-2 en hipocampo y neocórtex de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y se ha comparado su expresión con la de cerebros normales. Además se ha buscado signos de apoptosis mediante el marcaje del ADN fragmentado in situ (TUNEL).

## Material y Métodos

### Tejido humano

Se estudian 5 cerebros de pacientes con clínica de demencia y con diagnóstico confirmado neuropatológicamente de EA según los criterios CERAD (Consorcio para establecer un registro de la EA)(12). La edad de estos pacientes oscilaba entre 75 y 88 años

con un tiempo postmortem medio de 5 horas (entre 2 y 12 horas).

Los casos control tenían edades que oscilaban entre 54 y 82 años con un tiempo postmortem medio de similar a los casos con EA (entre 30 minutos y 13 horas). No tenían historia conocida de demencia.

Los cerebros se extrajeron según los métodos habituales. Fueron fijados en formol tamponado al 10% durante 3 semanas e incluidos en parafina. Los cortes de cerebro estudiados han sido hipocampo y neocórtex y fueron previamente examinados con plata metenamina y técnicas de inmunohistoquímica para el beta-amiloide, proteína tau y ubiquitina.

### Inmunohistoquímica

Se utilizó como anticuerpo primario Bcl-2 oncoprotein monoclonal de ratón de Menarini (MU 287-UC) a una dilución 1/40. Se utilizó el Kit supersensitive BIOGENEX. Los cortes se trataron con el potenciador de antígenos Antigen Retrieval Citra 10X concentrate de Biogenex en autoclave a 125° durante 10 minutos. Los lavados posteriores se realizaron a temperatura ambiente en buffer PBS (Buffer salino fosfatado pH=2). Se bloquea la peroxidasa endógena con el Peroxide Block del kit durante 8'. Se incuba con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incluye como control positivo una amígdala palatina humana. Después de lavados en buffer se aplica el anticuerpo secundario biotilado (Multilink) durante 20' a temperatura ambiente y después de nuevos lavados en buffer se incuba con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Label) durante 20' a temperatura ambiente. Posteriormente se aplica la solución sustrato con diaminobencidina durante 10' y se contrasta con hematoxilina de Mayer.

### Marcaje con Tdt de las terminales 3'-OH del ADN fragmentado (TUNEL)

El marcaje con Tdt se basa en la técnica de Gavricli el al. Se utilizó el Apop-Tag peroxidase kit (Oncor) para detectar residuos de nucleótidos-digoxigenin añadidos por la enzima Tdt a las terminales 3'-OH del ADN fragmentado. Los cortes desparafinados fueron tratados con proteínasa K a 20 microgr/ml durante 15' a temperatura ambiente. Las secciones de tejido se incuban en el buffer de equilibración durante 30' y después en el buffer de reacción formado por la enzima Tdt más digoxigenin-deoxiuridin trifosfato (dUTP) durante 1 hora a 37°. Después se lavan durante 30' a 37° y se incuban con el anticuerpo antidigoxigenin conju-

gado con peroxidasa. El complejo se visualiza mediante la reacción con DAB que da un producto de color pardo oscuro. Como controles positivos se incluye amígdala palatina humana con folículos linfoides en cuyos centros germinales hay apoptosis y a los controles negativos se les añade agua destilada en lugar de la enzima.

**Resultados**

**Inmunohistoquímica.**

Se ha observado que el bcl-2 se expresa en las células endoteliales y en algunas células del músculo liso vascular. También expresan bcl-2 algunos astrocitos y células

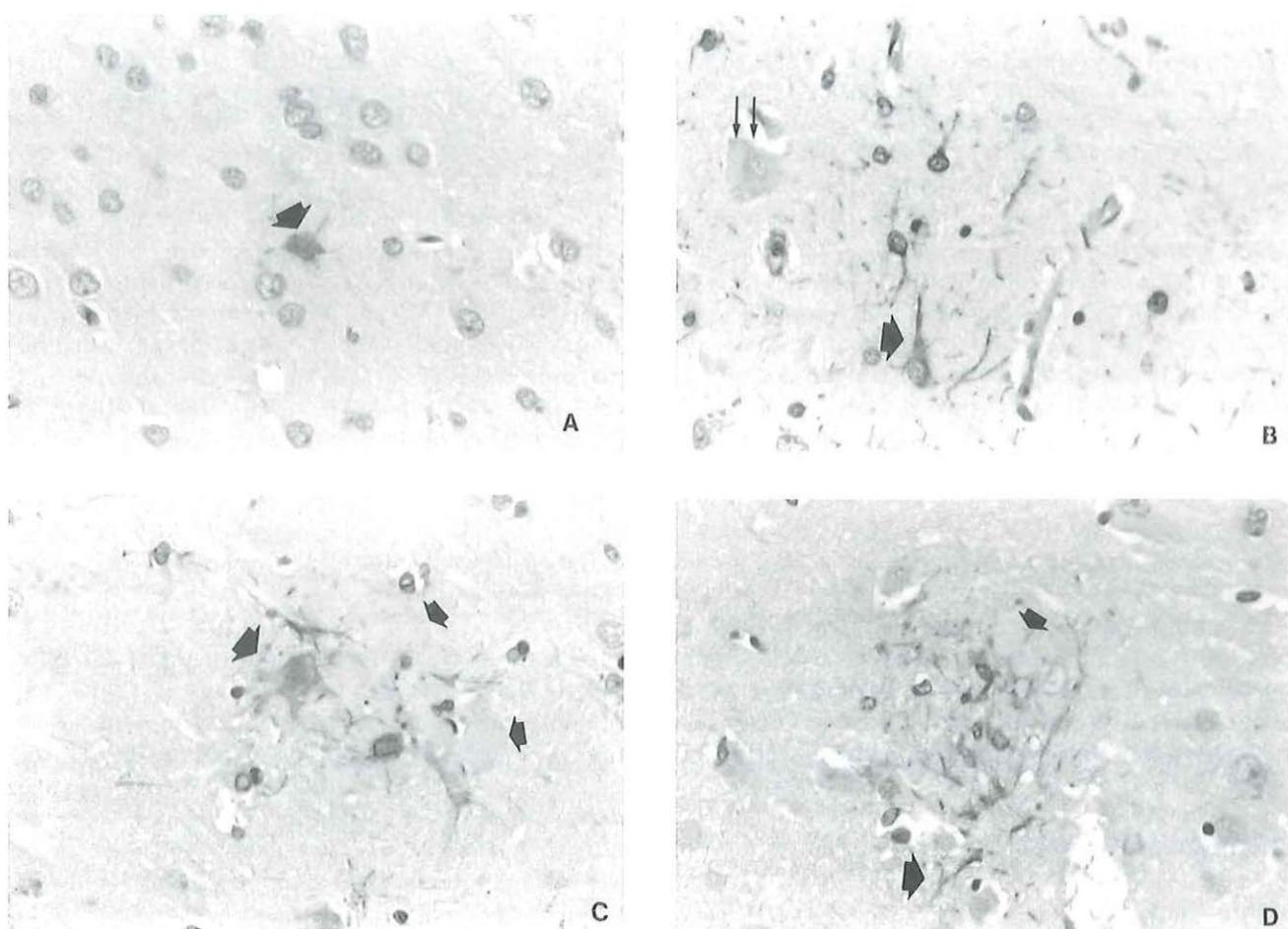
de la microglía. No se ha detectado expresión neuronal de bcl-2 ni en los cerebros con EA ni en los controles. El pigmento que aparece en el citoplasma neuronal corresponde a lipofuscina o pigmento de desgaste.

Los astrocitos que expresan bcl-2 son más numerosos y con citoplasma más amplio en los cerebros con EA que en los controles. Es interesante el hallazgo alrededor de las placas seniles de astrocitos marcados así como de algunas neuritis distróficas (Figura 1).

**Tunel.**

El hallazgo más importante ha sido el marcaje de núcleos neuronales aislados emitiendo cuerpos apop-

**Figura 1**



**Imágenes histológicas de la corteza en un caso de un paciente con EA en tejido de autopsia. Expresión de Bcl-2 en astrocitos corticales (A y B) y en placas seniles (C y D). A y B: los astrocitos corticales expresan Bcl-2 (flecha) pero no lo expresan las neuronas (doble flecha).**

**C y D: se observa mayor intensidad de tinción en los astrocitos (flecha grande) que rodean las placas seniles centradas por amiloide (flecha pequeña).**

tóticos por lo que podemos afirmar que corresponden a neuronas en apoptosis. Se han identificado estas células como neuronas por su morfología y porque se encuentran adyacentes a una célula satélite de oligodendroglía (Figura 2). Se marcan también los núcleos de otros tipos celulares: astrocitos y oligodendrocitos; en estos núcleos se marca o bien la cromatina condensada alrededor de la membrana nuclear o bien todo el núcleo pero es raro encontrar cuerpos apoptóticos. Se observa marcaje nuclear y citoplasmático de los pericitos vasculares (Figura 2)

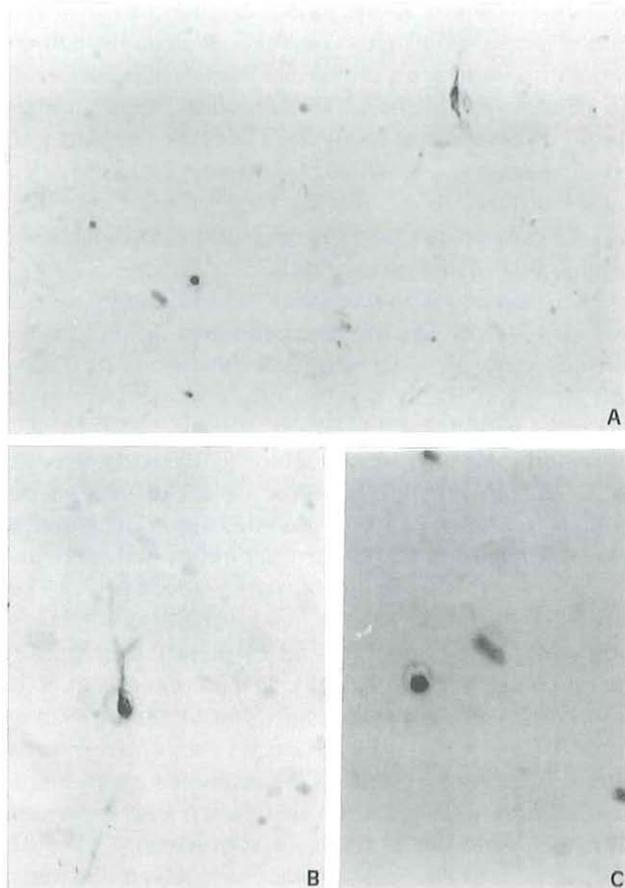
En los cerebros de pacientes con EA se encuentran neuronas en apoptosis en mayor número que en los controles. Es más frecuente encontrarlas en hipocampo que en neocórtex. Se localizan sobre todo en la capa piramidal del hipocampo en CA1 fundamentalmente y en neocortex, en el fondo y laterales de los surcos. En dos casos control que fallecen por tromboembolismo pulmonar masivo (TEP) encontramos numerosas neuronas en apoptosis en estas zonas.

**Discusión**

La hipótesis reciente de que las neuronas en las enfermedades degenerativas desaparecen por un mecanismo de apoptosis surge porque en estos procesos la muerte celular ocurre de forma individualizada y sin desencadenar reacción inflamatoria (4,10,17). Por otro lado, se ha demostrado in vitro que el  $\beta$ -amiloide, uno de los principales componentes de las placas seniles de la EA, implicado además en la patogénesis de la enfermedad, produce muerte celular con características de apoptosis (18). Mediante la técnica del marcaje del ADN fragmentado in situ (TUNEL) se han estudiado cerebros con EA obteniéndose resultados variables. Hay trabajos que encuentran neuronas en apoptosis en las zonas más afectadas en la EA en número mayor que en los cerebros de control (19,20). Sin embargo en el estudio realizado por Migheli y cols.(21) los resultados son negativos. Hay que señalar que los cerebros de este último estudio fueron fijados en paraformaldehído que no se considera un buen fijador de ácidos nucleicos.

En nuestro estudio se ha encontrado marcaje aislado de núcleos neuronales con morfología de apoptosis. También se ha visto marcaje de núcleos de varios tipos celulares (astrocitos y oligodendrocitos) en número variable. Para afirmar que una célula marcada con la técnica TUNEL está en apoptosis es necesario que la célula presente la morfología propia de este tipo de muerte celular que describimos en la introduc-

**Figura 2**



**Valoración de la apoptosis en un cerebro de autopsia de un paciente con EA mediante la técnica TUNEL.**

**A:** imagen de la corteza, los pericitos y algunas neuronas se encuentran teñidos.

**B y C:** dos neuronas muestran tinción nuclear y retracción citoplasmática sugestiva de muerte por apoptosis.

ción (4,8). Podemos decir por tanto que se han identificado neuronas en apoptosis y que además son más numerosas en los cerebros con EA que en los controles. Estamos de acuerdo con estudios previos que afirman que no todos los núcleos marcados con la técnica TUNEL corresponden a células en apoptosis y que es posible que esta técnica marque núcleos con ADN dañado por diversos factores como la hipoxia durante el fallecimiento o la autólisis celular postmortem (18,22). Es posible además que las neuronas de los cerebros con EA sean más susceptibles a sufrir muerte celular por estos factores. Dos casos control presentan numerosas neuronas corticales en apoptosis aunque estos pacientes fallecieron con hipoxia cerebral como

consecuencia de un TEP masivo. Por lo tanto la apoptosis puede desencadenarse por diversos mecanismos. Con respecto a la técnica concluimos que la fijación en formol no enmascara el marcaje nuclear y la inclusión en parafina es adecuada. Es interesante señalar el hallazgo de un marcaje tanto nuclear como citoplasmático de pericitos vasculares. El marcaje citoplasmático indicaría que estas células fagocitan cuerpos apoptóticos. Es posible que esto sea así, aunque la función de estas células está poco definida.

Con respecto a la expresión de bcl-2 nuestros resultados indican que no hay expresión de esta proteína en neuronas. Este hallazgo contradice los de Satou y cols. (23) Es posible que esto se deba a la diferente metodología utilizada. Nuestro hallazgo más importante ha sido un aumento en la expresión de bcl-2 en astrocitos en cerebros con EA respecto a los controles. Los astrocitos de los cerebros con EA tienen el citoplasma más amplio, lo cual indica que están activados. Es frecuente encontrarlos alrededor de las placas seniles. Este hallazgo es similar al de O'Barr y cols. (24). Puede haber una relación entre la extensión de la expresión del bcl-2 y la susceptibilidad a la apoptosis. La ausencia de expresión de bcl-2 por parte de las neuronas sugiere que no están protegidas y que son más susceptibles a los estímulos apoptóticos. Los astrocitos sin embargo que tienen una expresión aumentada de bcl-2, no sólo sobreviven a los estímulos nocivos sino que además se vuelven reactivos.

Estos resultados concuerdan con los hallazgos de muerte neuronal por apoptosis mediante la técnica TUNEL en los cerebros con EA y la relativa indemnidad de los astrocitos incluso alrededor de las placas seniles y con los hallazgos en cultivos celulares que demuestran que la exposición a beta-amiloide produce muerte de neuronas pero no de astrocitos (18,25). Los astrocitos tienen como funciones retirar excitotoxinas, producir matriz extracelular y proteínas de adhesión, restaurar el medio iónico y son un componente esencial de la barrera hematoencefálica (26). Un aumento en la actividad de los astrocitos a través del aumento en la expresión de bcl-2 podría tener un efecto beneficioso aumentando las actividades previas o podría tener también un efecto adverso ya que pueden segregar citoquinas como el factor de necrosis tumoral y componentes del complemento (27). Los astrocitos también pueden segregar proteína precursora del amiloide (28).

En conclusión, nuestro trabajo apoya la hipótesis de que la apoptosis puede ser un mecanismo de muerte neuronal en la EA y que el aumento en la expresión de bcl-2 detectado en estos cerebros puede tener o bien un efecto protector de reacción frente al desencadenante desconocido de la enfermedad o bien por el contrario contribuir a la muerte neuronal.

**Agradecimientos**

A Laura Saldise y a Julia Lorda por su colaboración.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Mendez M.F., Mastri A.R., Sung J.H., Frey W.H., Clinically diagnosed Alzheimer disease; neuropathologic findings in 650 cases. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1992; 6: 35-43

2. Dickson D.W. Apoptosis in the brain. *Physiology and pathology. Am J Pathol* 1995; 146: 1040-1044.

3. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 16-19.

4. Vaux D.L., Haecker G. and Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-779.

5. Schwartz L.M. and Osborne B.A. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 1993; 14: 582-590.

6. Raff M.C., Barres B.A., Burne J.F., Coles H.S., Ishizaki Y. and Jacobson M.D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; 262: 695-700

7. Cohen J.J. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130

8. Díaz-Cano S.J. y Wolfe H.J. Apoptosis: de la morfología a los mecanismos. *Patología* 1995; 38: 295-297

9. Bredesen D.E. Neural apoptosis. *Ann Neurol* 1995; 38: 839-851

10. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*

1992; 119: 493-501

11. Hockenbery D., Núñez G., Millman C., Schreiber R.D. and Korsmeyer S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336

12. Castrén E., Ohga Y., Berzaghi M.P., Tzimagiorgis G., Thoenen H. and Lindholm D. Bcl-2 messenger RNA is localized in neurons of the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 1994; 61: 165-177

13. Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F., Longnecker R., Kieff E. and Rickinson A. Induction of bcl-2 expreson by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-1115

14. García I, Martinou I, Tsujimoto Y. and Martinou J.C. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogen. *Science* 1992; 258: 302-304
15. Allsopp T.E., Wyatt S., Paterson H.F. and Davies A.M. The proto-oncogen bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993; 73: 295-307
16. Mirra S.S., Heyman A., Mc Keel D., et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease (CERAD). Part III. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 41: 479-486
17. Lees G. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 1993; 54: 287-322
18. Watt J.A., Pike C.J., Walencewicz-Wasserman A.J. and Cotman C.W. Ultrastructural analysis of beta-amyloid-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *Brain Research* 1994; 661: 147-156
19. Anderson A.J., Su J.H. and Cotman C.W. DNA damage and apoptosis in Alzheimer disease: colocalization with c-jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J Neurosci* 1996; 16(5): 1710-1719
20. Lassmann H., Bancher C., Breitschopf H., Wegiel J., Bobinski M., Jellinger K. and Wisniewski H.M. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* 1995; 89: 35-41
21. Miguéli A., Cavalla P., Marino S. and Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 606-616
22. Portera-Cailliau C., Hedreen J.C. Price D.L. and Koliatsos V.E. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animals models. *J Neurosci* 1995; 15(5): 3775-3787
23. Satou T., Cummings B.J. and Cotman C.W. Immunoreactivity for Bcl-2 protein within neurons in the Alzheimer's disease brain increases with disease severity. *Brain Research* 1995; 697: 35-43
24. O'Barr S., Schultz J. and Rogers J. Expression of the protooncogen bcl-2 in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 1996; 17: 131-136
25. Loo D.T., Copani A., Pike C.J., Whittemore E.R., Walencewicz A.J. and Cotman C.W. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 7951-7955
26. Abbott N.J. Revest P.A. and Romero I.A. Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology. *Neuropathol Appl. Neurobiol.* 1992; 18: 424-433
27. Robbins D.S., Shirazi Y., Drysdale B.E., Lieberman A., Shin H.S. and Shin M.L. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J. Immun* 1987; 139: 2593-2597
28. Siman R., Card J.P., Nelson R.B., Davis L.G. Expression of beta-amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage. *Neuron* 1989; 3: 275-285