

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS EDAD-DEPENDIENTES

Félix F. Cruz-Sánchez

Director del Institut de Ciències Neurològiques y Gerontològiques
Universitat Internacional de Catalunya



Introducción

El cerebro es un conjunto singular de estructuras nerviosas que rigen los actos de nuestra vida. Esta masa esponjosa de menos de kilo y medio de materia nerviosa que se encuentra situada en la cavidad craneal, es la estructura viva más complicada que conocemos en el universo. El cerebro controla las actividades corporales, motoras y sensoriales, da forma a nuestros pensamientos, esperanzas, ilusiones e imaginación.

Como complejo biológico, el cerebro y sus componentes tisulares están expuestos a diversos procesos nosológicos que alteran sus funciones provocando una gran variedad de enfermedades neurológicas. Efectivamente, las más de mil afecciones del cerebro se traducen en más hospitalizaciones que otro grupo de enfermedades incluyendo las cardiopatías y el cáncer. Así por ejemplo, las enfermedades neurológicas afectan anualmente a más de 50 millones de americanos y cuestan más de 120.000 millones de dólares. Dentro de las enfermedades que afectan el cerebro, existen un grupo de ellas que, además del coste directo destinado a su diagnóstico y tratamiento, tienen un coste social igual o más importante. Ellas son las enfermedades neurodegenerativas edad-dependientes y aquellas relacionadas a enfermedad cerebrovascular.

La edad biológica constituye uno de los mecanismos básicos que sirven a la sociedad para establecer diferentes estados y roles a sus integrantes. Clásicamente se define al envejecimiento en relación con el periodo social de la vida unido al deterioro biológico. Sin embargo, el periodo biológico de los seres humanos se altera con los cambios sociales, o sea que están sujetos a determinantes sociológicos. Cruz-Sánchez (1).

La vida se divide tradicionalmente en periodos diferentes denominados "etapas vitales". Sin embargo, actualmente este agrupamiento está íntimamente relacionado con parámetros sociales y económicos.

En el caso de la ancianidad, es verdaderamente difícil aceptar una edad específica y un estado social específico como es la jubilación o el retiro de la actividad laboral.

Santiago Ramón y Cajal (2), en una excelente visión desde sus 80 años que fue publicada inmediatamente después de su muerte, en 1934, propuso que "Se es verdaderamente anciano, psicológica y físicamente, cuando se pierde la curiosidad intelectual, y cuando, con la torpeza de las piernas, coincide la torpeza y la premiosidad de la palabra y del pensamiento". Esta situación, de acuerdo con S. Ramón y Cajal, produce un aislamiento social.

Se ha sugerido que las condiciones biológicas y sociales son determinantes en el envejecimiento fisiológico. Sin embargo, a pesar de la situación biológica o social, el envejecimiento esta íntimamente relacionado al comportamiento que el anciano tuvo en periodos anteriores de su vida.

Las enfermedades neurodegenerativas edad-dependientes son aquellas en las que el envejecimiento cerebral guarda algún tipo de relación con los mecanismos de producción de estas enfermedades y que debido al incremento de las expectativas de vida tienden a incrementarse progresivamente.

Enfermedad de Alzheimer: Uno de los más aterradores y devastadores de todos los trastornos neurológicos es la demencia causada por la enfermedad de Alzheimer. Así, por ejemplo, se calcula que afecta a unos 4 millones de americanos provocando un coste anual de 80.000 millones de dólares. Esta enfermedad suele empezar a los 60 años y deja a sus

víctimas incapaces de valerse por sí solos desde sus fases iniciales. Esta razón hace que el coste social sea aún mayor. Tanto la causa como su tratamiento están aún en fase de investigación.

Enfermedad de Parkinson: trastorno cerebral, principalmente de la vejez, que se caracteriza por temblor, rigidez muscular, movimientos lentos, y trastornos de la marcha que produce una pérdida progresiva de la independencia de quien padece esta enfermedad dependiendo de otras personas para poder realizar muchas de sus actividades vitales básicas. Siguiendo con los datos que hacen referencia a los EE.UU., esta enfermedad afecta a 500.000 americanos y le cuesta a su administración 2.000 millones de dólares anuales.

Esclerosis lateral amiotrófica: Esta enfermedad afecta cada año a 5000 americanos y el 50% de los pacientes mueren entre los tres y cinco años del diagnóstico. Es la enfermedad más corriente que afecta el movimiento y supone a los americanos un gasto de unos 300 millones de dólares al año.

El envejecimiento cerebral

El envejecimiento cerebral es un proceso fisiológico en el que las funciones cerebrales superiores y el control motor sufren un deterioro perceptible y progresivo. La desestructuración o alteraciones morfológicas de los sistemas de control cognitivo y motor, podrían guardar íntima relación con los fenómenos de regresión observados en la vejez.

Estudios dirigidos a conocer las alteraciones morfológicas en cerebros de pacientes con edades superiores a los 65 años y sin enfermedad neurológica o psiquiátrica reconocidas, han demostrado la presencia de alteraciones morfológicas tanto a nivel macroscópico como microscópico (3, 4). Sin embargo la causalidad de las mismas en relación con las manifestaciones clínicas evidenciadas en estos pacientes aparecen controvertidas. Tal es el caso de la atrofia cortical o la dilatación marcada de los ventrículos cerebrales conceptos concebidos como de atrofia cerebral cortical, subcortical o córtico-subcortical. Pacientes con edades avanzadas pueden mostrar atrofia cere-

bral marcada tanto sea cortical, subcortical o global sin presentar deterioro neurológico importante.

Otro aspecto es la presencia de alteraciones histológicas que comprometen las neuronas de la corteza cerebral o en el asta anterior de la médula espinal, nos referimos a la presencia de cambios tales como la degeneración neurofibrilar, degeneración gránulo-vacuolar, y a la presencia de algunos cuerpos de inclusión como los denominados cuerpos de Hirano. Estos cambios han sido reconocidos en pacientes seniles sin alteraciones neurológicas (5), además de la entidades neurológicas en las que fueron primariamente descritos.

Un importante grupo de demencias de etiología oscura caracterizadas por la degeneración del sistema nervioso central, guardan una íntima relación con el envejecimiento cerebral fisiológico. La enfermedad descrita por Alois Alzheimer en 1907 (6) es el mejor ejemplo de lo expresado anteriormente. El sustrato morfológico de esta entidad es la atrofia cerebral y, desde el punto de vista microscópico, la presencia de abundantes placas seniles en el neuropilo de la corteza cerebral así como la degeneración neurofibrilar de sus neuronas.

Otros procesos que también cursan con demencia, aunque con patrones neuropsicológicos diferentes, muestran sustratos morfológicos específicos aunque algunos de ellos pueden ser observados en el envejecimiento cerebral fisiológico. Tal es el caso de la entidad descrita por Arnold Pick (7, 8) definida como demencia con atrofia lobar, y posteriormente reconocida histológicamente por la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos en las áreas corticales de atrofia, denominados cuerpos de Pick, y de células balonadas o células de Pick.

Recientemente, Braak y Braak (8, 9) describieron un proceso que cursa con demencia y que presenta como sustrato morfológico cuerpos argirófilos no somáticos, es decir sólo en el neuropilo, que acompañan a la atrofia cortical difusa.

Entidades neurológicas que afectan el sistema de control motor involuntario, pueden presentar en algún momento de su evolución un cuadro de demencia de diferente grado y en

algunos casos severa como por ejemplo en la Enfermedad de Parkinson. En los últimos años se han descrito algunos pacientes con Enfermedad de Parkinson y demencia que mostraban, a la hora de su estudio neuropatológico, cuerpos argirófilos corticales de diferentes características o tipología como son: degeneración neurofibrilar, placas seniles y cuerpos de Lewy. La interpretación de estos hallazgos es controvertida (11, 12).

De forma inversa, otras entidades como la Parálisis Supranuclear Progresiva presentan como sustrato morfológico la presencia de degeneración neurofibrilar en el sistema nervioso central aunque con una distribución diferente a la de la Enfermedad de Alzheimer. La Parálisis Supranuclear Progresiva es una entidad causada por la degeneración de núcleos subcorticales especialmente del tronco cerebral (13).

Algunos casos de Parálisis Supranuclear Progresiva afectando la corteza cerebral también han sido descritos (14). Sin embargo, la demencia no aparece como una manifestación preponderante en esta enfermedad y ha sido considerada como leve y con características neuropsicológicas de demencia "subcortical" (15).

La entidad conocida como Angiopatía Congofílica o Angiopatía Amiloidea Cerebral se caracteriza por la presencia de amiloide en la pared de arterias pequeñas y medianas intracerebrales o leptomeníngeas, en pacientes con historia de hemorragias cerebrales no traumáticas y sin historia de hipertensión arterial (16, 17). La presencia de placas seniles y neuronas con degeneración neurofibrilar es un hecho común que acompaña el cuadro neuropatológico de la Angiopatía Amiloidea Cerebral. (14, 16, 17). Un síndrome de demencia puede estar presente en pacientes con Angiopatía Congofílica lo que hace aún más estrecha su relación con la Enfermedad de Alzheimer (18). Depósito de sustancia amiloide en pacientes de edad avanzada y sin manifestaciones clínicas de enfermedad neurológica ha sido descrito (19).

Desde el punto de vista del control motor voluntario, es evidente que el proceso del envejecimiento provoca un deterioro del sistema locomotor de origen central tales como la

pérdida de fuerza muscular y atrofia muscular progresiva observada en los pacientes seniles. Muchos de los hallazgos tanto clínicos como electrofisiológicos o morfológicos demuestran que el deterioro motor es debido a una afectación de las células motoras del asta anterior de la médula espinal denominadas neuronas motoras. Muchas de las características de esta afectación de las neuronas motoras son similares a las alteraciones encontradas en la Esclerosis Lateral Amiotrófica y, por otro lado, se ha demostrado que la Esclerosis Lateral Amiotrófica en pacientes de avanzada edad es clínicamente más severa (20). La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad progresiva del sistema motor la cual puede ocurrir de forma esporádica, familiar o en grupos poblacionales bien localizados (21). El diagnóstico neuropatológico de la Esclerosis Lateral Amiotrófica incluye pérdida neuronal de células del asta anterior de la médula espinal (neuronas motoras), degeneración del haz piramidal y la consecuente alteración neurógena de las fibras musculares. Aunque en la Esclerosis Lateral Amiotrófica no existen alteraciones citoesqueléticas específicas como en otras enfermedades neurodegenerativas como las arriba mencionadas, la Esclerosis Lateral Amiotrófica muestra algunos cambios que comprometen al cuerpo neuronal similares a los hallados en esas enfermedades.

Morfología del envejecimiento cerebral normal y patológico

Pérdida neuronal El concepto de pérdida neuronal asociada al incremento de la edad fue propuesto por primera vez por Hodge (22). No hay duda que estudios morfométricos directos dan la mejor evidencia del grado de lesión lo cual ha sido demostrado en diversos estudios (23, 24, 25, 26, 27, 28). El principal interés en esta línea de investigación es buscar una posible contribución del factor envejecimiento en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas edad-dependientes, como por ejemplo la Enfermedad de Parkinson. Sin embargo, el interés despertado por la pérdida neuronal en la sustancia negra debida al envejecimiento, ha disminuido desde que se ha avan-

zado en el conocimiento de los mecanismos íntimos de la neurodegeneración.

McGeer y cols. (23) encontraron un descenso en el número de neuronas nigrales que era directamente proporcional con la edad, con el 48% de pérdida a los 60 años, (aproximadamente un 7% por década), en series de 28 casos sin enfermedad neurológica. A pesar de la sucinta descripción del material y método utilizados, este trabajo aún se mantiene como un punto de referencia importante, dónde apoyar el concepto de pérdida neuronal con el incremento de la edad.

Mann y cols. (24) estudiaron el número de neuronas en la sustancia negra a nivel del origen del III° nervio craneal, en 67 "controles" con edades comprendidas entre los 11 y los 97 años. Ellos encontraron un 35% de pérdida neuronal a los 90 años de edad. Thiessen y cols. (27) cuantificaron las neuronas nigrales al mismo nivel de la sustancia negra en 22 controles rurales y 12 urbanos y encontraron un mayor descenso (células pigmentadas y no pigmentadas) en la población urbana (34% vs. 17%). Este estudio sugirió que factores ambientales podrían haber estado operando en las diferencias de los resultados.

Fearnley y Lees (28), en un cuidadoso estudio de 36 casos control con edades comprendidas entre los 21 y los 91 años, encontraron un descenso lineal del 33% de las neuronas de la sustancia negra con la edad.

Es evidente que todos estos estudios convergen en que hay una pérdida neuronal asociada con la edad, pero los hallazgos en relación al grado de pérdida neuronal son bastante variables, y los casos seleccionados como controles pueden no estar libres de otro tipo de patología.

Alteraciones de las prolongaciones neuronales y de sus terminaciones.

Varios autores han descrito cambios morfológicos asociados al envejecimiento en varias regiones del SNC con el método de Golgi. Cruz Sanchez (29). Esta técnica es valiosa para demostrar la citoarquitectura del SNC y una de las mejores y más elegantes formas de mostrar con claridad y delineación la forma y

la distribución espacial de los axones y las dendritas (30, 31). Muchos autores han descrito anomalías morfológicas relacionadas con el envejecimiento en las neuronas corticales e hipocámpales con esta técnica (32, 33, 34, 35). Estos cambios son una distorsión del perfil del cuerpo celular y las dendritas. Machado-Salas y cols. (37) describieron cambios en la médula espinal y en el tronco cerebral bajo en el envejecimiento del ratón. Cruz-Sanchez y cols. (29) estudiaron los cambios en el envejecimiento humano en neuronas de la sustancia nigra impregnadas con plata. Tres tipos de neuronas fueron encontradas de acuerdo con la forma y el tamaño: tipo I (las más grandes en la pars compacta), tipo II (tamaño medio, en la pars reticularis) y tipo III (las más pequeñas, en la pars reticularis). Los hallazgos observados durante el envejecimiento en estas neuronas son distorsiones del perfil del cuerpo celular y pérdidas de espinas y dendritas que son más pronunciadas en la distancia más larga del cuerpo celular, hinchazón y dendritas arrosariadas. Estos cambios fueron observados más frecuentemente en el grupo de mayor edad (de 70 a 93 años). A pesar de los descubrimientos comunes a los descritos anteriormente, nosotros hemos encontrado que diferentes tipos de neuronas están comprometidas pero con un compromiso predominante en las neuronas tipo I. Por otro lado, anomalías citoesqueléticas no han podido ser demostradas en un estudio inmunohistoquímico de muestras de estas series. Algunos de los hallazgos morfológicos encontrados, llamados nodulaciones y dendritas arrosariadas, mostraban semejanzas con los observados anteriormente en sustancia nigra de ratones tratados con metil -4- fenilpiridina (MPTP), pero no se encontraron cambios citoesqueléticos (37, 38). Patt y cols. (39) también describieron cambios dendríticos en las neuronas tipo I de la sustancia nigra en Enfermedad de Parkinson, sin embargo, estos fueron atribuidos a cuerpos de inclusión, cuerpos de Lewy. El mecanismo patofisiológico subyacente a los cambios morfológicos observados en los impregnados de plata de humanos ancianos permanece desconocido, pero puede ser atribuido a mecanismos similares a los de la toxicidad por MPTP.

La sinaptofisina (Sph) es una proteína de membrana abundante en las vesículas

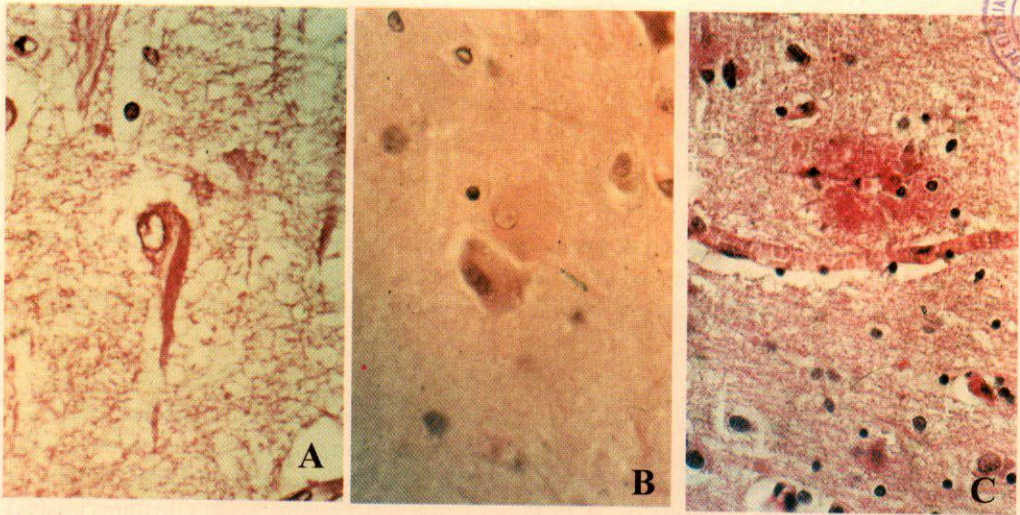


Figura 1

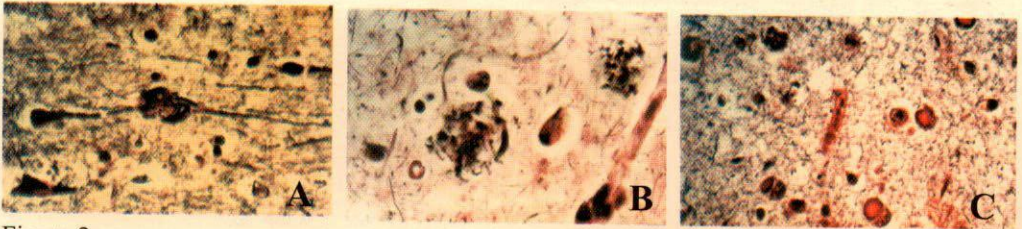


Figura 2

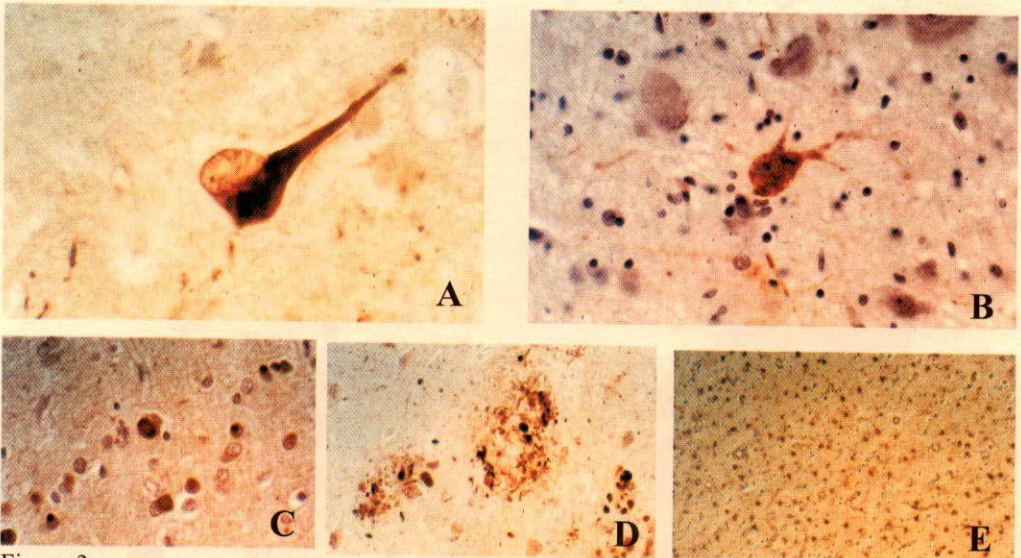


Figura 3

Fig. 1: Alteraciones celulares y del neurópilo puestos en evidencia por técnicas histológicas clásicas. A) Degeneración neurofibrilar en una célula piramidal. C) Neuronas corticales en las que se puede ver rechazo del núcleo celular a la periferia desplazado por masas intracelulares pálidas con aspecto de cuerpo de inclusión (cuerpos de Pick). D) Placa senil cortical. (A,B y C teñidos con H&E; reacción de P.A.S)

Fig. 2: Alteraciones celulares y del neurópilo puestos en evidencia por técnicas histológicas de precipitados de plata. A) Degeneración neurofibrilar en una neurona piramidal. B) Dos placas seniles corticales. C) Cuerpos de inclusión citoplasmáticos (cuerpos de Pick) (Técnica de Bielschowsky)

Fig. 3: Alteraciones celulares y del neurópilo puestas de manifiesto utilizando técnicas inmunocitoquímicas. A) Degeneración neurofibrilar cortical. B) Degeneración neurofibrilar en neurona del tronco cerebral. C) Cuerpos de Pick. D) Placas seniles corticales. E) Gliosis astrocitaria córtico-subcortical. (A, B, C, D anti-tau; E anti-proteína ácida de fibras gliales)

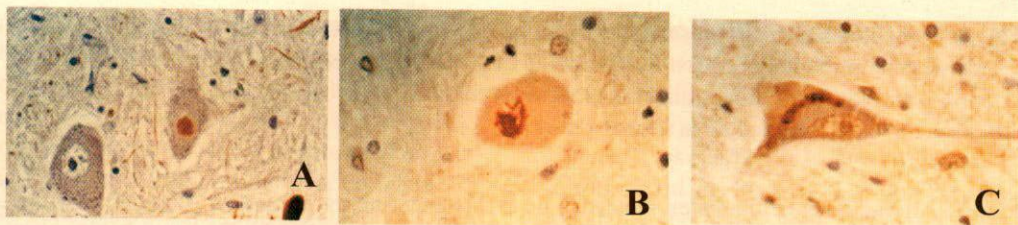


Figura 4

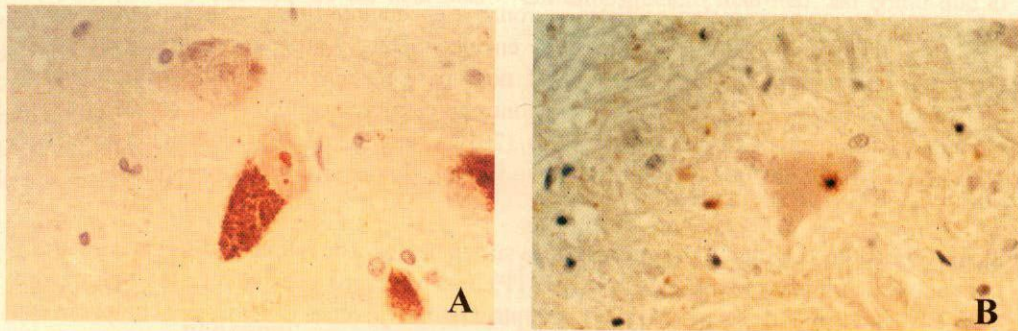


Figura 5

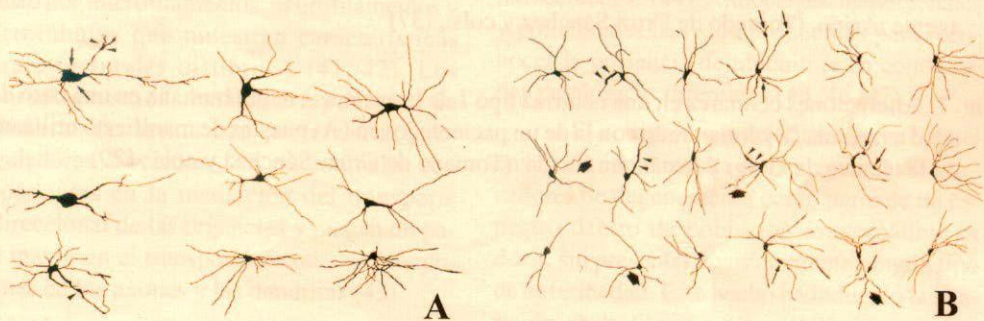


Figura 6



Figura 7

Fig. 4: Inclusiones intracitoplasmáticas positivas para anticuerpos antiubiquitina utilizados en técnicas inmunocitoquímicas. A) Cuerpo de Lewy (sustancia negra). B y C) Cuerpo de inclusión positivos para ubiquitina en neuronas motoras de la médula espinal característicos en casos de la enfermedad de la neurona motora.

Fig. 5: Alteraciones celulares en neuronas de la sustancia negra humana a diferentes edades puestas de manifiesto utilizando la técnica de Golgi y la cámara lúcida. En la sustancia negra humana existen 3 tipos de células, a saber, Tipo I. consistentes en neuronas grandes pigmentadas con neuromelanina. Estas neuronas se encuentran en la sustancia negra compacta y son las que más sufren el proceso de envejecimiento y procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Parkinson. Tipo III: neuronas pequeñas distribuidas difusamente en la sustancia negra. Obsérvense las alteraciones en el cuerpo celular como en los procesos celulares. (Tomado de Cruz-Sánchez y cols.,(29) A- Neurona motora pigmentada de sustancia nigra- Ubiquitina 200x B Neurofilamento fosforilado (Neurona motora espinal).

Fig. 6: Alteraciones celulares en neuronas de la sustancia negra de ratones a diferentes edades y tratados con un neurotóxico selectivo (MPTP). Los hallazgos se estudian a las 24 horas y a los 10 días después de suspender el tratamiento a ratones jóvenes y viejos, y se comparan con controles utilizando el método de Golgi y la cámara lúcida. Obsérvense las alteraciones del cuerpo celular y de sus procesos celulares así como la capacidad disminuida que muestran los ratones viejos para recuperarse a los 10 días después de suspender la administración del agente tóxico. (Tomado de Cruz-Sánchez y cols., (37)

Fig. 7: Alteraciones celulares en una neurona tipo I de la sustancia negra humana en un caso de edad avanzada (B) comparado con la de un paciente joven (A) puestas de manifiesto utilizando la técnica de Golgi y la cámara lúcida. (Tomado de Cruz- Sánchez y cols., (29)

presinápticas que ha sido utilizada como un útil marcador de sinapsis (40). Algunos autores han demostrado un descenso de Sph con el incremento de la edad en diferentes áreas del sistema nervioso como, por ejemplo, en el asta anterior de la médula espinal. En un intento de detectar los posibles cambios sinápticos en la vía nigroestriatal en el envejecimiento, la inmunoreactividad por Sph de las neuronas nigrales fue estudiada en nuestras series de casos control y se observó poca reactividad en los casos más viejos. Este descenso de la inmunoreactividad de la Sph podría confirmar el compromiso de los terminales dendríticos en la sustancia negra durante el envejecimiento.

Alteraciones del citoesqueleto neuronal

El citoesqueleto neuronal está compuesto por microfilamentos, neurofilamentos y microtúbulos que muestran características ultraestructurales distintivas (41, 42). Los microfilamentos están compuestos de polímeros de actina con proteínas actinoreguladoras asociadas. Los microtúbulos son importantes en la mediación del transporte bidireccional de las organelas y juegan un papel mayor en el transporte de nuevos componentes en los axones y las dendritas (43).

Los neurofilamentos son predominantemente elementos neuronales estructurales que están modificados durante su vida por una sucesión de proteínas kinasa. La plasticidad aparente de la red de neurofilamentos en el perikarion pueden dar algún dato sobre la vulnerabilidad de algunas regiones específicas en enfermedades con cambios neurofibrilares. Estudios inmunohistoquímicos demostraron que un importante número de anticuerpos son específicos para demostrar elementos estructurales del sistema nervioso central tales como los componentes proteicos del citoesqueleto neuronal. Cruz-Sanchez (41, 42). Estudios de la misma naturaleza han permitido saber que los cambios neuronales observados en enfermedades neurodegenerativas edad-dependientes contienen componentes del citoesqueleto que por mecanismos fisiopatogénicos, se modifican y, generalmente, se acumulan como

cuerpos de inclusión citoplasmáticos. De este modo, sabemos que las placas seniles, la degeneración neurofibrilar, la degeneración gránulo-vacuolar (presentes en la Enfermedad de Alzheimer); los cuerpos de Lewy (presentes en la Enfermedad de Parkinson) y las células balonadas y cuerpos de Pick (presentes en la Enfermedad de Pick) contienen componentes del citoesqueleto neuronal, así como que el acúmulo de una sustancia refringente en vasos cerebrales y en placas seniles (en la Enfermedad de Alzheimer y en la Angiopatía Amiloidea) contienen una proteína denominada beta-amiloide.

Un polipéptido de 8,6 kD denominado ubiquitina ha sido asociado con diferentes respuestas celulares de stress y muchas veces relacionados con anomalías del citoesqueleto. Ubiquitina está implicada en la degradación no lisosomal de proteínas anormales y en otros mecanismos proteolíticos intracelulares. (44). Anticuerpos monoclonales y policlonales han sido producidos para reconocer la presencia de ubiquitina en condiciones patológicas diferentes (45, 46, 47).

El compromiso del citoesqueleto en el envejecimiento resulta en la presencia de marcadores de degeneración como parte de un espectro dentro de población asintomática, es decir, sin presentar aparentemente ningún tipo de enfermedad. Este hecho ha inducido la aparición en la literatura de categorizaciones y subcategorizaciones relacionadas con la evolución de una importante variedad de condiciones neurodegenerativas, haciendo limítrofes y poco definidos las diferencias entre envejecimiento y estadios tempranos de enfermedad neurodegenerativa.

En este sentido, Braak y Braak, (10), han definido 4 estadios de Enfermedad de Alzheimer basándose en la presencia de degeneración neurofibrilar, hilos neuropílicos y componente neuríticos en el sistema nervioso central con una topografía específica en cada uno de los estadios. Estos cambios han sido observado primariamente en la región transentorrinal, y desde aquí el proceso se extiende de una manera especial a través de la corteza entorrinal, hipocampo y neocorteza. Los estadios I y II son definidos como pre-clínicos, donde los cambios degenerativos son focales.

De acuerdo con Vickers y cols. (48) los cambios relacionados con la edad que comprometen los neurofilamentos ocurren en neuronas del hipocampo y están relacionadas con alteraciones filamentosas y con degeneración neurofibrilar que han sido descritos en subpoblaciones de neuronas parahipocámpales en los mismos individuos.

Placas seniles neocorticales han sido encontradas en individuos de edades avanzadas y no demenciados (49). Yasuhara y cols (50) describieron 2 tipos de neuritas de diferentes características morfológicas. Tipo 1 tenían un perfil elongado y se coloreaban con anticuerpos contra proteína A68, diferentes tipos de tau, epítopes de proteínas precursoras de amiloide y a ubiquitina. Tipo 2, globulosas y que se coloreaban con anticuerpos para cromogranina A y C, precursores de amiloide y con ubiquitina. La neocorteza normal en pacientes de edades avanzadas tienen algunas placas seniles donde solo se observan el tipo 2.

Los cuerpos de Lewy son reconocidos como marcadores de Enfermedad de Parkinson pero también han sido descritos en un 12 % de pacientes asintomáticos en la 7ª década de la vida, alcanzando un 17 % en la 8ª década (51). El hallazgo ocasional de cuerpos de Lewy en la sustancia negra en individuos asintomáticos podría sugerir formas de enfermedad de Parkinson en estadios pre-clínicos (52).

Cambios gliales

A pesar de que clásicamente siempre se hace referencia a proliferación de glia astrocitaria durante el envejecimiento, este es un hecho poco estudiado en el hombre. El envejecimiento en las ratas provoca un aumento relativo en el número de astrocitos en todas las regiones. Estos astrocitos muestran características de astrocitos reactivos (53) y la cantidad de proteína de fibras gliales aumenta con la edad en los cerebros de ratas de más de 18 meses de edad reflejando una gliosis reactiva generalizada.

El envejecimiento cerebral y los procesos neurodegenerativos edad-dependientes

El común denominador en todos los procesos antes mencionados incluido el envejecimiento cerebral, parece ser la presencia de alteraciones citoesqueléticas en el sistema nervioso central. Muchas preguntas surgen al respecto y que pueden resumirse en cuanto a los mecanismos fisiopatogénicos de producción de las alteraciones citoesqueléticas, y por otro lado, la ausencia de deterioro cognitivo o motor acentuado y presencia de alteraciones cerebrales o medulares como en el caso de envejecimiento cerebral. Este hecho ha llevado a algunos investigadores a definir extremadamente al envejecimiento fisiológico como un estado patológico sin expresión clínica (5), o al menos, podemos añadir, sin manifestaciones severas de afección clínica. También otra cuestión es la influencia del envejecimiento para el desarrollo, evolución o severidad de procesos neurodegenerativos como la Enfermedad de Alzheimer, Parkinson o en la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

El estudio de los componentes estructurales de estas alteraciones puede ser de gran utilidad para reconocer posibles vías en formación o al menos para el reconocimiento de la estructura molecular de las mismas. En este sentido, en los últimos años se han demostrado diferentes tipos de proteínas específicas e inespecíficas relacionadas con el citoesqueleto o de función desconocida o poco estudiadas (45, 54, 55, 56).

La pérdida neuronal es un hecho histológico reconocido que acompaña el envejecimiento cerebral fisiológico (57). Sin embargo, ésta no sería uniforme. Así por ejemplo, núcleos como el de Meynert o el hipocampo han sido descritos como áreas que muestran una importante pérdida neuronal durante la vejez y otras son más resistentes. Hanley (58) concluyó que la pérdida neuronal en el envejecimiento es un efecto "universal", refiriéndose al conjunto del sistema nervioso central. Sin embargo, este autor, agrega que algunas áreas pueden ser especialmente vulnerables. Nosotros hemos encontrado que áreas como la corteza cerebral y la sustancia negra muestran una importante pérdida neuronal con

el aumento de la edad.. Gibb y Lees (59) encuentran una pérdida neuronal marcada en la sustancia negra la cual se incrementa con la edad. De acuerdo con estos autores encontramos que la pérdida neuronal en la sustancia negra es más marcada en los núcleos dorso-mediales.

La asociación de pérdida neuronal en la corteza cerebral y atrofia de ésta es poco clara y controvertida en la literatura (58). Posiblemente la asociación de otros factores tales como, pérdida de neuropilo, es decir, de procesos neuronales (axones y dendritas), deban tenerse en cuenta al valorar la atrofia. En los casos de enfermedades neurodegenerativas la asociación de atrofia y pérdida neuronal es más clara. La pérdida neuronal cortical y en áreas límbicas juega un importante papel en el desarrollo de demencia en los procesos neurodegenerativos aunque no así en el envejecimiento fisiológico. Del mismo modo la pérdida neuronal en otras áreas como la sustancia negra juega un papel importante en desarrollar alteraciones en enfermedades neurodegenerativas como en el caso de la Enfermedad de Parkinson (59). La relación de esta pérdida en el envejecimiento fisiológico permanece incierta.

Un hecho constante es el incremento de lipofuscina intraneuronal a medida que se incrementa la edad. Algunas áreas parecen ser más vulnerables a esta acumulación pigmentaria. Mann y Yates (60) demostraron que estos acúmulos pueden conducir a la muerte celular. Sin embargo estudios relacionando el aumento de lipofuscina intraneuronal y el desarrollo de demencia, no han demostrado una relación firme. El aumento de lipofuscina se correlaciona con la pérdida neuronal especialmente en la corteza cerebral.

La proliferación de astrocitos es un hecho bastante común en el sistema nervioso que acompaña cualquier proceso que lo lesione comportándose, por lo tanto, como un fenómeno reactivo (61). Así por ejemplo en enfermedades neurodegenerativas la gliosis astrocitaria reactiva es un hecho común y especialmente en las áreas más afectadas.

En el caso de envejecimiento cerebral, la gliosis acompaña la pérdida neuronal en la corteza cerebral, especialmente en las capas

más profundas, en los ganglios basales y en los núcleos dorso-mediales de la sustancia negra. Recientemente, Cruz-Sánchez y cols. (21, 37, 62, 63) demostraron proliferación astrocitaria difusa en ratones viejos. Para estos autores, la proliferación glial estaría relacionada a los fenómenos de pérdida neuronal, alteraciones del neuropilo y al aumento de MAO-B tisular. Algunos autores han demostrado que MAO-B es una enzima relacionada con los fenómenos oxidativos que se encuentra especialmente en los astrocitos (64). La proliferación de estos o los requerimientos aumentados de esta enzima durante el proceso de envejecimiento cerebral, son fenómenos íntimamente relacionados y presentes en el envejecimiento cerebral fisiológico. Cruz-Sánchez (21, 37, 62, 63).

El estudio inmunohistoquímico utilizando diferentes anticuerpos para proteínas previamente reconocidas en el sistema nervioso de mamíferos incluido el hombre, ha permitido reconocer diferentes cambios histológicos en el sistema nervioso de un grupo de pacientes seniles con y sin enfermedad neurológica.

El análisis de los resultados nos permite especular sobre el significado de los diferentes componentes moleculares en los cambios histológicos en cada una de las entidades clínico-patológicas incluyendo los casos considerados como de envejecimiento cerebral fisiológico.

La presencia de proteínas relacionadas con neurofilamentos parece ser un hecho común en las alteraciones histológicas estudiadas (placas seniles, degeneración neurofibrilar, cuerpos de Pick y Lewy, etc.).

Estudios ultraestructurales han demostrado que los neurofilamentos de los mamíferos están compuestos por cuatro protofilamentos y estructuras globulares conectadas por bandas longitudinales (65, 66) adquiriendo una configuración helicoidal. Desde el punto de vista molecular, los neurofilamentos son filamentos proteicos oligoméricos y constituyen el principal elemento del citoesqueleto neuronal (55). Están compuestos de tres polipéptidos principales con pesos moleculares de aproximadamente 200, 150 y 70 kD. Estos polipéptidos se unen a una estructura central de configuración helicoidal a través de regiones de enlace lo que contribuye a la formación de filamentos de 10 nm de diámetro (55). Los

terminales hidroxilicos (-OH) de estos polipéptidos pueden ser separados en fragmentos y seguir una vía de solubilización a través de quimiotriptinización (54). Estudios que miden el contenido de fosfatos en los neurofilamentos han determinado que los polipéptidos de 200 y 150 kD son altamente fosforilados y que la desfosforilación de los mismos altera la movilidad de los polipéptidos (55, 67). De todo ello se deduce que la fosforilación es un mecanismo esencial del recambio proteico relacionado con los neurofilamentos. Anticuerpos especialmente clonados para las diferentes subunidades de neurofilamentos se unen a las fracciones o subunidades mencionadas. Esta característica antigénica nos permite reconocer parte del citoesqueleto neuronal. La distribución de neurofilamentos varía en relación a la función, así pues se han descrito neurofilamentos en el cuerpo celular de un peso molecular diferente al de los axones o terminales (68).

Otro componente importante del citoesqueleto neuronal son las proteínas asociadas a microtúbulos (conocidas como MAP en la literatura inglesa), muchas de ellas relacionadas con la tubulina. Estas proteínas encontradas fundamentalmente en axones y terminales son altamente inestables químicamente y ante el calor. De acuerdo a estas características y a su peso molecular se han separado dos grupos de MAP: 1) de 50 a 70 kD y 2) de 200 a 250 kD (68). Las primeras son conocidas como tau (69). Anticuerpos contra estas proteínas permiten reconocer su presencia utilizando técnicas inmunohistoquímicas. Tau son fosfoproteínas que se unen y desunen con otras proteínas como la tubulina y la actina. La fosforilación es el mecanismo principal de la función de muchas de estas proteínas (68) relacionada en muchos casos al intercambio proteico y al transporte axonal. No obstante la identificación de tau en estructuras indemnes del sistema nervioso utilizando técnicas inmunohistoquímicas es difícil debido a su inestabilidad y a la baja concentración de las mismas debido a su constante intercambio (68).

En diferentes estudios, los anticuerpos para subunidades de neurofilamentos utilizados reconocen las subunidades fosforiladas de 210 y 155 kD (69, 70). Este hecho nos lleva a concluir que las alteraciones histológicas des-

critas contienen o están compuestas por una alta concentración de neurofilamentos fosforilados.

La utilización de 2 anticuerpos (69 y 55 kD) clonados para proteínas tau ha permitido reconocer la presencia de esta proteínas en las placas seniles y la degeneración neurofibrilar en algunas de las entidades estudiadas e incluso en los casos control.

La presencia de altas concentraciones de neurofilamentos fosforilados y de otro tipo de fosfoproteínas como la tau 1 y 2 demostraría que mecanismos relacionados con la fosforilación proteica intervienen en la formación de algunas de las alteraciones histológicas descritas especialmente en el caso de la degeneración neurofibrilar y las placas seniles.

Perry y cols. (71, 72, 73) demostraron que los filamentos helicoideos presentes en la degeneración neurofibrilar de la enfermedad de Alzheimer contenían componentes normales del citoesqueleto neuronal. También se ha demostrado que las neuritas distróficas en las placas seniles contienen filamentos helicoideos anormales (74, 75, 76) las cuales muestran inmunoreactividad para tau (77). La fosforilación aberrante de los neurofilamentos podría ser una de las causas en la formación de muchos de estos filamentos (54) así como la anormal producción y almacenamiento de proteínas tau en el citoplasma de las neuronas como producto de una anormal fosforilación (78).

Otras proteínas tal como la ALZ50 han sido identificadas como constituyentes de la degeneración neurofibrilar. En nuestro estudio esta proteína fue reconocida en las placas seniles y la degeneración neurofibrilar especialmente en los casos de Enfermedad de Alzheimer. Para algunos autores, esta proteína guardaría relación con algún tipo de proteína fosforilada como la tau.

En los últimos años se ha reconocido la presencia de un polipéptido de 8.6 kD como producto proteico relacionado con la degradación proteolítica a través de una vía no lisosomal ATP dependiente (56, 79, 80). Esta proteína, denominada ubiquitina, está relacionada con las respuesta al "stress" celular como limitante del daño celular conjugando con proteínas anormales y trasportándolas a una vía de degradación rápida. (81) Mecanismos en el

que interviene el 3, 5 AMP ciclo podrían ser los responsables de la trasmisión del mensaje inductor para la síntesis de ubiquitina. La presencia de ubiquitina en los filamentos helicoides de la degeneración neurofibrilar en la Enfermedad de Alzheimer ha sido documentada (46, 73, 82). Nosotros hemos detectado ubiquitina en alteraciones histológicas distintas y en diferentes entidades neurológicas. Sin embargo, diferencias en cuanto a la distribución y caracterología de la reacción fueron reconocidas.

Otras estructuras como los cuerpos de Lewy han sido marcados con los anticuerpos para las proteínas tau 1 y 2 y ALZ50. En cambio sí fueron reconocidos en su formación las subunidades de neurofilamentos utilizadas y ubiquitina.

Los cuerpos de Lewy son inclusiones citoplasmáticas eosinófilas y rodeadas por un halo pálido inicialmente descritas en la sustancia negra y en el locus coeruleus de pacientes con Enfermedad de Parkinson. Ultraestructuralmente están formados por agregados filamentosos de 7-15 nm de diámetro ordenados radialmente (83). En nuestro estudio hemos identificado 2 tipos de estructuras con similares componentes moleculares. Uno de ellos bien definido con un patrón de tinción fuertemente periférico y otro más débil, difuso y homogéneo. Para algunos autores (59) la diferencia entre ambos tipos estaría determinado por la forma en que se agrupan los agregados filamentosos; es posible que el tiempo en su formación juegue un papel importante en la estructuración de los mismos (47). Estas características nos lleva a concluir que los cuerpos "pálidos" encontrados en diferentes estudio corresponden a cuerpos de Lewy incompletos o "inmaduros".

Otras alteraciones histológicas tales como células balonadas o células que muestran degeneración gránulo-vacuolar expresan algunos de los anticuerpos usados. Así pues, muchas de estas células son positivas para las subunidades de neurofilamentos y algunas también para ubiquitina pero no así para tau o ALZ50. Este hecho hablaría a favor de que otras vías fisiopatogénicas están presentes en este tipo de degeneración celular. Otra explicación sería la de que los mecanismos de degeneración o de respuesta celular aparecen antes que

el acúmulo de proteínas fosforiladas como la tau. Contrariamente en algunas células con degeneración neurofibrilar evidenciadas inmunohistoquímicamente con tau, no reaccionan con ubiquitina, demostrando que una proteína anormal (tau) se acumulaba antes de que ubiquitina fuese detectada (47). Estos hechos nos lleva a pensar que en el mecanismo de desarrollo de cambios histológicos, diferentes vías de degeneración pueden ocurrir, las cuales pueden estar relacionadas con los factores etiopatogénicos, el tiempo de evolución del fenómeno patológico y la población celular afectada.

En relación al producto gen proteica PGP 9.5, hemos podido comprobar que esta proteína inespecífica estudiada en tumores cerebrales está presente en algunas alteraciones histológicas como: células balonadas, células de Pick y en el citoplasma de las células con cuerpos de Lewy y en células normales. No así en la degeneración neurofibrilar. Este hecho permite especular que el acúmulo proteico o la fosforilación aberrante que ocurre en estas células, altera la síntesis de una proteína relacionada con la función celular hasta hoy poco conocida.

Comentario

Aunque los posibles mecanismos en la formación de algunas de las alteraciones histológicas estudiadas podrían ser interpretadas después de todo lo hasta aquí expuesto, se deben hacer algunas consideraciones relativas a las entidades y a la composición molecular de las alteraciones histológicas.

En el envejecimiento cerebral fisiológico existe la formación de placas seniles y degeneración neurofibrilar como ha sido referido por otros autores (5, 84) Estas estructuras reconocen algunos de los anticuerpos utilizados. Sin embargo, algunas formas de tau y ubiquitina no han sido reconocidas en estas estructuras o al menos no de forma reiterada. Tras lo expresado más arriba, este hecho implicaría que en el envejecimiento cerebral existirían también alteraciones en la fosforilización proteica que lleva al acúmulo de proteínas tales como los neurofilamentos y algún tipo de tau, pero no la proteína de 68 kD conocida como ALZ50 y relacionada con una forma di-

ferente de tau. Así también, se deduce que los mecanismos de respuesta a través de la producción de ubiquitina estarían ausentes ante la formación de placas seniles y degeneración neurofibrilar en el envejecimiento cerebral fisiológico.

En la Enfermedad de Alzheimer, hemos podido comprobar que existe un gran número de neuronas degeneradas que muestran acúmulos de proteínas fosforiladas tales como neurofilamentos y tau incluida la proteína ALZ50. De acuerdo con otros autores, (85, 86) la ubiquitina ha sido positiva en un alto porcentaje de casos mostrando la relación directa entre la reacción celular ante el fenómeno degenerativo de acumulación de proteínas posiblemente tras un mecanismo de fosforilación aberrante (67, 78). Es decir que aquí existiría primero un fenómeno de fosforilación aberrante y, después, otro de "ubiquitinación" que intentaría limitar o destruir el resultado del primero a través de una degradación de proteínas anormales vía no-lisosomal ATP-dependiente.

En la Parálisis Supranuclear Progresiva también se ha podido reconocer numerosas neuronas que muestran un acúmulo proteico anormal desarrollando estructuras tales como la degeneración neurofibrilar. Sin embargo algunas diferencias relacionadas con la distribución de las mismas han sido comprobadas así como diferencias en el contenido molecular de las mismas.

Según criterios clásicos (13) en la Parálisis Supranuclear Progresiva la degeneración neurofibrilar fue encontrada mayoritariamente en el tronco cerebral. Casos con compromiso cortical en esta entidad han sido descritos (87, 88), estos casos han sido considerados como diseminación del proceso patológico hacia el sistema límbico. Hauw y cols. (89) describieron la afectación de la neocorteza en pacientes con Parálisis Supranuclear Progresiva y establecieron las diferencias en cuanto al tipo de neuronas afectadas en comparación con la Enfermedad de Alzheimer. Para algunos autores (14, 89, 90, 91) la Parálisis Supranuclear Progresiva cuando afecta la corteza cerebral lo hace en neuronas grandes de capas profundas (V y VI), en cambio en la Enfermedad de Alzheimer la degeneración neurofibrilar afecta neuronas medianas en capas más superficiales (III y V).

En 2 de nuestros casos, se encontraron numerosas neuronas con degeneración neurofibrilar afectando neuronas medianas y pequeñas en las capas III y V. Estos casos presentaban, además, numerosa placas seniles en la corteza cerebral e hipocampo lo que de acuerdo con los criterios de Khachaturian (92) permite el diagnóstico de Parálisis Supranuclear Progresiva asociada con Enfermedad de Alzheimer. Otros casos presentaban degeneración neurofibrilar cortical pero afectando capas profundas y sin otro tipo de hallazgos patológicos.

Inmunohistoquímicamente y de acuerdo con otros autores (74, 93, 94, 95, 96) la degeneración neurofibrilar en la Parálisis Supranuclear Progresiva muestra el acúmulo de neurofilamentos y tau 1. No así, tau 2, ALZ50 y ubiquitina. Estos hechos demostrarían que en la formación de la degeneración neurofibrilar en la Parálisis Supranuclear Progresiva existiría una fosforilación aberrante con acúmulo de neurofilamentos y algunas proteínas asociadas a microtúbulos como las de 69 kD y no otras. Por otro lado, no existiría una respuesta del mecanismo de conjugación con la ubiquitina. Es decir que la "ubiquitinación" estaría ausente. Estos hechos nos hablarían de mecanismos fisiopatogénicos diferentes en la formación de la degeneración neurofibrilar en la Enfermedad de Alzheimer y en la Parálisis Supranuclear Progresiva los cuales pueden estar relacionados con factores etiopatogénicos o evolutivos. Un hecho similar ocurre si analizamos las características histológicas de la angiopatía congófila y las de la enfermedad de Alzheimer. En ambas entidades placas seniles, degeneración neurofibrilar y acúmulo de sustancia amiloide en la pared de los vasos han sido descritas. Estas alteraciones presentan similares determinantes antigénicos cuando se los estudia con la beta-proteína A4 (16, 17). Sin embargo, como hemos podido comprobar en nuestros casos, ubiquitina no se une a los depósitos de amiloide de vasos intracerebrales o leptomeníngeos en los casos de Enfermedad de Alzheimer. Recientemente se ha demostrado la unión de ubiquitina a amiloide inducido experimentalmente por virus murina (97). Estos hechos nos demostrarían que factores etiopatogénicos tienen una gran importancia para el desarrollo de vías patológicas en las que interviene la ubiquitina.

En casos de Enfermedad de Pick, las alteraciones descritas muestran positividad para todos los anticuerpos. Clásicamente se ha descrito que los cuerpos de Pick afectan la corteza cerebral (98, 99). Sin embargo de acuerdo con Muñoz-García y Ludwin (100), algunos cuerpos de Pick pueden ser reconocidos en estructuras subcorticales. Inmunohistoquímicamente, tanto los cuerpos corticales como subcorticales muestran resultados similares.

Ultraestructuralmente, sabemos que estos cuerpos están formados por neurofilamentos agrupados en una masa juxta-nuclear y que al parecer las células de Pick muestran similares componentes ultraestructurales. Ambos cambios muestran similares componentes moleculares. Este hecho nos hace pensar que las células de Pick son forma tempranas de los cuerpos de Pick o cuerpos de Pick "inmaduros" en cuya formación y diferencias intervienen fenómenos evolutivos y no fisiopatogénicos distintos.

La entidad descrita recientemente por Braak y Braak (9) como demencia senil con cuerpos argirófilos corticales y subcorticales, muestra alteraciones en el neuropilo consistentes con acúmulos de neurofilamentos en forma de estructuras granulares o fibrilares. No existen en la literatura estudios de este tipo de casos utilizando anticuerpos para intentar conocer los componentes estructurales de tales estructuras. Tampoco existirían fenómenos de "ubiquitinación" lo que posiblemente correspondería a vías etiopatogénicas muy diferentes en relación a las otras patologías expuestas. Sin embargo, estudios con series más grandes son necesarias para llegar a conclusiones definitivas sobre esta entidad recientemente descrita.

En la Enfermedad de Parkinson y en los casos de demencia asociada con la presencia de cuerpos de Lewy corticales, estos cuerpos son intensamente positivos para los neurofilamentos y la ubiquitina. Indicando una similitud en la posible vía fisiopatogénica.

La Enfermedad de Lewy fue descrita por Kosaka y cols. (101), sin embargo antes de estos autores se habían descrito cuerpos de Lewy corticales (11). Ha sido el desarrollo de la inmunohistoquímica y la posibilidad de estudiar la ubiquitina que ha hecho más "accesi-

ble" al cuerpo de Lewy, sobre todo en aquellas formas "inmaduras" o cuerpos pálidos. En los últimos años, esta entidad ha sido discutida apasionantemente, existiendo seguidores de su existencia y detractores. Byrne y cols. (102, 103) la describen como una forma de demencia que puede iniciarse con trastornos motores como los de la Enfermedad de Parkinson acompañados o seguidos de demencia o inversamente. Para Hansen y cols. (12) existiría una forma pura en la que el paciente desarrolla un cuadro de demencia progresiva y severa con patrones subcorticales al inicio junto a trastornos extrapiramidales como rigidez, bradiquinesia y temblor. Esta forma se acompaña neuropatológicamente con la presencia de abundantes cuerpos de Lewy corticales y subcorticales, espongiosis cortical en capas superficiales y gliosis. La otra forma correspondería a una "variante de Enfermedad de Alzheimer" en la que clínicamente aparece parkinsonismo y en la que los cambios histológicos de ambas entidades se entremezclan.

Para Gibb y Lees (11, 59) existiría una enfermedad de "cuerpos de Lewy idiopática" que puede presentarse con o sin demencia. Existiendo abundantes cuerpos de Lewy corticales en los casos de demencia severa. Teniendo en cuenta este concepto y el mencionado sobre los cuerpos de Lewy, los casos de "variante de Enfermedad de Alzheimer" con cuerpos de Lewy pueden ser formas combinadas o asociadas de dos entidades (Alzheimer y Parkinson) o casos de Enfermedad de Alzheimer en un paciente con cuerpos de Lewy relacionados con su proceso normal de envejecimiento.

Los hallazgos inmunohistoquímicos demostrarían que en ambas entidades, Enfermedad de Parkinson y Demencia con cuerpos de Lewy corticales, la vía de producción de estos cuerpos sería la misma como indica la presencia de similares componentes estructurales. La ausencia de cualquier forma de tau incluida la proteína A-LZ50 demostraría la independencia, al menos en cuanto a la fosforilación anormal de estas proteínas, con otras entidades como la Enfermedad de Alzheimer posiblemente relacionados con mecanismos fisiopatogénicos y, por que no, etiopatogénicos diferentes.

Referencias

1. Cruz-Sanchez FF, Marin C, Rossi ML, Cardozo A, Ferrer I, Tolosa E. Ubiquitin in cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Sci*, 1992, 112:46-50.
2. Ramón y Cajal, S. El mundo visto a los ochenta años. Impresiones de un arteriosclerótico 7ma ed. Espasa- Calpe, 1960
3. Wiesniewski HM, Terry RD, Hirano A. Neurofibrillary pathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1970, 29:163 - 176
4. Wisniewski H.M., Terry R.D., Reexamination of the pathogenesis of the senile plaque. In H.M. Zimmermann (Ed.) *Progress in Neuropathology* vol. 3, Grune and Stratton, New York, London (1973, 1 - 26
5. Wiesniewski H.M., Merz G.S., Neuropathology of the aging brains and dementia of Alzheimer type, In M. Gaitz, Samayski (Eds.), *Aging, 2000: Our Health Care destiny*, Vol. 1, 1985 231-243.
6. Alzheimer A. Ueber eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zentralbl Gesarnte Neurol Psychiatr*, 1911, 4:356-385
7. Pick A. Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prag med Wchnsch*, 1892, 17:165
8. Pick A. Ueber einen weiteren symptomkomplex im Rahmen der Demencia senilis, bedingt durch umschriebene stärkere Hirnatrophie (gernischte Apraxie). *Monatsschr Psychiatr Neurol*, 1906, 19:97-108
9. Braak H, Braak E. Cortical and subcortical argyrophilic characterize a disease associated with adult onset dementia. *Neuropathol appl Neurobiol*, 1989, 15:13-26
10. Braak H, Braak E. Neurofibrillary changes confined to the entorhinal region and an abundance of cortical amyloid in cases of presenile and senile dementia. *Acta Neuropathol*, Berlin, 1990, 80:479-486
11. Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988, 51:745-752
12. Hansen L, Salmon D, Galasko D, Masliah E, Katzman KR, De Teresa R, Thal L, Pay MM, Hofstetter R, Klauber M, Rice V, Butters N, Alford M. The Lewy body variant of Alzheimer's disease: A clinical and Pathologic entity. *Neurol*, 1990, 40:1-8
13. Steele JC, Richardson JC, Olszewski J. Progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol*, 1964, 10:333-359
14. Cruz-Sánchez FF, Rossi ML, Cardozo A, Tolosa E. Clinical and pathological study of two patients with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's changes. Antigenic determinants that distinguish cortical and subcortical neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett*, 1992, 136:43-46.
15. Albert ML, Feldman RG, Willis AL. The subcortical dementia of progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psych*, 1974, 37:121-130
16. Vinters HV, Gilbert JJ. Cerebral amyloid angiopathy: incidence and complications in the aging brain 11. The distribution of amyloid vascular changes. *Stroke*, 1983, 14:924-928
17. Vinters HV. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke*, 1987, 18:311-324
18. Glenner GG, Henry JH, Fujihara S. Congoophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann Pathol*, 1981, 1:120-129
19. Esiri MM, Willcok GK. Cerebral amyloid angiopathy in dementia and old age. *J Neurol Neurosurg Psych*, 1986, 49:1221-1226
20. Eisen A, Schulzer M, MacNeil M, Pant B, Mak E. Duration of amyotrophic lateral sclerosis in age dependent. *Muscle & Nerve* 1993, 15:27-32
21. Cruz-Sánchez FF, Moral A, Bellerocche de J, Rossi ML. Amyotrophic lateral sclerosis brain banking: a proposal to standardize protocols and neuropathological diagnostic criteria. *J Neural Transm*, 1993, 39 (suppl.):215-222
22. Hodge CF. Changes in the ganglion cells from birth to senile death. Observations on man and honey-bee. *J Physiol*, 1894, 17:129-134

23. McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS. Aging and the extrapyramidal function. *Arch Neurol*, 1977, 34:33-35
24. Mann DMA, Yates PO, Marcyniuk B. Monoaminergic neurotransmitter systems in presenile Alzheimer's disease and in senile dementia of Alzheimer type. *Clin Neuropathol*, 1984, 3:(5)199-205
25. Calne DB, Eisen A, McGeer E, Spencer P. Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Motorneuron disease: amyotrophic interaction between ageing and environment? *The Lancet*, Nov 8, 1986, pp 1067-1070
26. Calne DB, Peppard PF. Aging of the nigrostriatal pathway in humans. *Can J Neurol Sci*, 1987, 14:424-427
27. Thiessen B, Rajput AFI, Laverty W, Desai H. Age, environments and the number of substantia nigra neurons. In: *Adv in Neurol 53: Parkinson's disease: Anatomy, Pathology, and Therapy*. Streifler MB, Korczyn AD, Melamed E, Youdim MBUI (eds). Raven Press, New York, 1990, pp 201-206
28. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 1991, 114:2283-2301
29. Cruz-Sánchez FF, Cardozo A, Tolosa E. Neuronal changes in the substantia nigra with aging: a Golgi study. *J Neuropath Exp Neurol*, 1995, 54:74-81
30. Valverde F. The Golgi method. A tool for comparative structural analyses. In: *Nauta WJH, Ebbesson SOE, eds. Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. Springer-Verlag, New York, 1970, pp 12-31
31. Ramón-Moliner E. The Golgi-Cox technique. In: *Nauta WJH, Ebbesson SOE, eds. Contemporary Research methods in Neuroanatomy*. Springer-Verlag, New York, 1970 pp 32-55
32. Scheibel ME, Scheibel AB. The rapid Golgi method. Indian summer or renaissance? In: *Nauta WJH, Ebbesson SOE (eds). Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. Springer-Verlag, New York, 1970, pp 1-11
33. Scheibel ME, Lindsay RD, Tomiyasu U, Scheibel AB. Progressive dendritic changes in the aging human limbic system. *Exp Neurol*, 1976, 47:392-403
34. Scheibel ME, Lindsay RD, Tomiyasu U, Scheibel AB. Progressive dendritic changes in the aging human limbic system. *Exp Neurol* 1976; 53:420-430
35. Scheibel ME, Lindsay PD, Tomiyasu U, Scheibel AB. The aging human Betz cell. *Exp Neurol*, 1977, 56:598-609
36. Machado-Salas J, Scheibel ME, Scheibel AB. Neuronal changes in the aging mouse: Spinal cord and lower brain stem. *Exp Neurol*, 1977, 54:504-512
37. Cruz-Sánchez FF, Cardozo A, Ambrosio S, Tolosa E, Mahy N. Plasticity of the nigrostriatal system in MPTP-treated mice. *Mol Chem Neuropathol*, 1993, 19:163-176
38. Boatell LI, Mahy N, Cardozo A, Ambrosio S, Tolosa E, Cruz-Sanchez FF. Neuronal changes in the nigrostriatal pathway of 1-methyl-4-phenylpyridine-treated mice. *Methods and Experimental Findings in Clinical Pharmacology*, 1992, 14 (10):781-787
39. Patt S, Gertz HJ, Lieselote G, Cervós-Navarro J. Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: A Golgi study. *Histol Histopathol*, 1991, 6:373-380
40. Wiedenmann B, Franke W. Identification and location of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,00 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 1985, 41:1017-1028
41. Cruz-Sánchez FF. Antigenic determinant properties of neurofibrillary tangles. Relevance to progressive supranuclear palsy. In *Tolosa E, Duvoisin R & Cruz-Sánchez FF (eds). Progressive supranuclear palsy: diagnosis, pathology and therapy*. Springer-Verlag Wien New York, 1994, pp 165-178
42. Cruz-Sánchez FF. Antigenic determinant properties of neurofibrillary tangles. Relevance to progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm (suppl)*, 1994, 42:165-178

43. Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA. The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell. *Brain Res Rev*, 1988, 13:77-101
44. Rechsteiner M. Natural substrate of the ubiquitin proteolytic pathway. *Celi*, 1991, 66:615-618
45. Lowe J, Blanchard A, Morrel K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ. Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 1988, 155:9-15
46. Manno V, Perry G, Tabaton M, Mulvihill P, Fried VA, Smith HT, Gambetti P, Autulio-Gambetti L. Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristics of neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1988, 85: 4501-4505.
47. Leigh PN, Probst A, Dale GE, Power DP, Brion J-P, Dodson A and Anderton BH. New aspects of the pathology of neurodegenerative disorders as revealed by ubiquitin antibodies. *Acta Neuropathol*, 1989, 79:61-72
48. Vickers JC, Riederer BM, Marugg RA, Buée-Scerrer V, Buée L, Delacourte A, Morrison JH. Alterations in Neurofilament protein immunoreactivity in human hippocampal neurons relates to normal aging and Alzheimer's disease. *Neurosci*, 1994, 62:(1)1-13
49. Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology*, 1992, 42:1681-1688
50. Yasuhara O, Kawamata T, Yoshinari A, McGeer EG, McGeer PL. Two types of dystrophic neurites in senile plaques of Alzheimer's disease and elderly nondemented cases. *Neurosci Lett*, 1994, 171: 73-76
51. Daniel SE. Parkinson's disease. In: Cruz-Sánchez FF, Ravid R, Cuzner ML (eds). *Neuropathological Diagnostic Criteria for Brain Banking*. IOS Press Amsterdam, 1995, 10:72-79
52. Gibb WRG, Lees AJ. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg and Psych*, 1991, 54: 388-396
53. Landfield PW, Rose G, Sandles L, Wohlstadter TC, Lynch G. Patterns of astroglial hypertrophy and neuronal degeneration in the hippocampus of aged, memory-deficient rats. *J Gerontol*, 1994, 32: 3-12
54. Sternberger NH, Sternberger LA, Ulrich J. Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1985, 82:4274-4276
55. Carden MJ, Schlaepfer WW, Y-Lee VM. The structure, biochemical properties, and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. *J Biol Chem*, 1985, 260: 9805-9817
56. Haas AL, Bright PM. The immunochemical detection and quantification of intracellular ubiquitin-protein conjugases. *J Biol Biochem*, 1985, 260:12464-12473.
57. Brody U. An examination of cerebral cortex and brain stem aging. In *Aging: Neurobiology of Aging*. Teny RD and Gershon S (eds). Raven Press, New York, 1976, 3:177-183
58. Hanley T. Neuronal fall-out in the ageing brain: a critical review of the quantitative data. *Age and ageing*, 1974, 3: 133-151
59. Gibb WRG, Lees AJ. The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathol appl Neurobiol*, 1989, 15:27-44.
60. Mann DMA, Yates PO. Lipoprotein pigments-Their relationship to ageing in the human nervous system. 11 The melanin content of pigmented nerve cells. *Brain*, 1974, 97:489-498
61. Duchen LW. General pathology of neurons and neuroglia. In Hurne Adams J, Corsellis JAN and Duchen LW (eds). *Greenfield's Neuropathology*, 4th ed, Edward Arnold, London, 1984, pp 11 -23

62. Cruz-Sánchez FF, Cardozo A, Ambrosio S, Tolosa E, Mahy N. Plasticity of the nigrostriatal system in MPTP-treated mice: a biochemical and morphological correlation. *Molr. Chem Neuropathol.* 1993, 19:163-176
63. Cruz-Sánchez FF, Rossi ML. Cytoskeletal abnormalities in central neurodegenerative diseases. In *Molecular pathology of the nervous system.* Coria F and Cruz-Sánchez FF (eds). Ediciones Ergon S.A., Barcelona, 1993, pp 53-68
64. D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. *Science*, 1986, 231:987-989
65. Wen GY, Wisniewski HM. Substructures of neurofilaments. *Acta Neuropathol*, Berlin, 1984, 64:339-343
66. Schlaepfer WW. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987, 46: 117-129
67. Sternberger LA, Sternberger NH. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and non-phosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1983, 80:6126-6130
68. Selkoe DJ. Deciphering Alzheimer's disease: the pace quickens. *TINS*, 1987, 10:181-184
69. Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlison BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature*, 1982, 298:84-86
70. Dickson DW, Kress Y, Crowe A, Yen S-H. Monoclonal antibodies to Alzheimer neurofibrillary tangles. 2. Demonstration of a common antigenic determinant between ANT and neurofibrillary degeneration in PSP. *Am J Pathol*, 1985, 120:292-303
71. Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer's disease brains. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1985, vol 84, pp. 3033-3036.
72. Perry G, Rizzuto N, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Paired helical filaments from Alzheimer disease patients contain cytoskeletal components. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1985, 82:3916-3920
73. Perry G, Mulvihill P, Manetto V, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Immunocytochemical properties of Alzheimer straight filaments. *J Neurosci*, 1987, 7:3736-3738.
74. Schmidt ML, Lee VM-Y, Hurtig H, Trojanowsky JQ. Properties of antigenic determinants that distinguish neurofibrillary tangles in PSP and Alzheimer's disease. *Lab Inv*, 1988, 59:4:460-465
75. Schmidt ML, Gur RE, Gur RC and Trojanowski JQ. Intraneuronal and extracellular neurofibrillary tangles exhibit mutually exclusive cytoskeletal antigens. *Ann Neurol*, 1988, 23:184-189
76. Barcikowska M, Wisniewski HM, Bancher C, Grunke-Iqbal I. About the presence of paired helical filaments in dystrophic neurites participating in the plaque formation. *Acta Neuropathol*, 1989, 78: 225-231
77. Delaere P, Duychaerts C, Brion JP, Poulain V, Hauw J-J. Tau, paired helical filaments and amyloid in the neuro cortex: a morphometric study of 15 cases with graded intellectual status in aging and senile dementia of Alzheimer type. *Acta Neuropathol*, 1989, 77:645-653
78. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan H, Wisniewski HM. Abnormal phosphorylation of the microtubule associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Ntl Acad Sci, USA*, 1986, 83:4913-4917
79. Hersko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with the multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1980,77:1783-1786
80. Lowe J, Lennox G, Jefferson D et al, Morrell K, McQuire D, Gray T, Landon M, Doherty FJ, Mayer RJ. A filamentous inclusion body within anterior horn neurons in motor neuron disease defined by immunocytochemical localisation to ubiquitin. *Neurosci Lett*, 1988, 94:1-2 and 203-210

81. Bond U, Schlesinger MJ. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, May, 1985, pp 949-956
82. Mori H, Kondo J, Ihara Y. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*, 1987, 235:1641-1644
83. Duffy PE, Tennyson VM. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1965, 24:398-414
84. Cock L C, Powers RE, Selkoe DJ, Davies P, Geyer JJ, Price DL. Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47:629-641
85. Pappolla M A, Omar R, Saran B. The nonnal brain. Abnormal ubiquitinated deposits highlight an age-related protein change. *Am J Pathol*, 1989, 135:585-591
86. Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Chronopoulos S, Ali-kan Z. Alzheimer's disease brain-derived ubiquitin has amyloid-enhancing factor activity: Behavior of ubiquitin during accelerated amyloidogenesis. *Acta Neuropathol*, Berlin, 1991, 81:280-286
87. Matsushita M, Ito J, Omayagi S, Uchikoshi T, Yshiko T, Kase M, Kosaka K. An autopsy case of progressive supranuclear palsy with massive appearance of neurofibrillary tangles in limbic system including accumbens septi and nucleus amygdala. *Cl Neuropathol*, 1980, 78:419-428
88. Takahashi H, Takeda S, Ikuta F, Homma Y. Progressive supranuclear palsy with limbic system involvement: report of a case with ultrastructural investigation of neurofibrillary tangles in various location. *Cl Neuropathol*, 1987, 6:271-276
89. Hauw J-J, Verny M, Delaère P, Cervera P, He Y, Duyckaerts C. Constant neurofibrillary changes in the neocortex in progressive supranuclear palsy. Basic differences with Alzheimer's disease and aging. *Neurosci Lett*, 1990, 119:182-186
90. Cruz-Sánchez FF, Marin C, Rossi ML, Cardozo A, Ferrer I, Tolosa E. Ubiquitin in cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Sci*, 1992, 112:46-50
91. Cruz-Sánchez FF, Marin C, Rossi ML, Cardozo A, Ferrer I, Tolosa E. Ubiquitin in cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Sci*, 1992, 112:46-50
92. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 1985, 42:1097-1105
93. Yen S-H, Horoupian DS, Terry RD. Immunocytochemical comparison of neurofibrillary tangles in senile dementia of Alzheimer type. Progressive supranuclear palsy, and post encephalitic parkinsonism. *Ann Neurol*, 1983, 13:172-175
94. Tabaton M, Perry G, Autilio-Gambetti L, Manetto V, Gambetti P. Influence of neuronal location on antigenic properties of neurofibrillary tangles. *Ann Neurol*, 1983, 23:604-610
95. Probst A, Langui D, Lautenschlager C, Ulrich J, Brion JP, Anderton BH. Progressive supranuclear palsy: extensive neuropil threads in addition to neurofibrillary tangles. Very similar antigenicity of subcortical neuronal pathology in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 1988, 77:61-68.
96. Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw J-J, Javoy-Agid F. Abnormal tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol*, 1991, 81:591-596
97. Chronopoulos S, Alizadeh-Khiavi K, Normand J, Ali-khan Z. Binding of ubiquitin to experimentally induced murine AA amyloid. *J Pathol*, 1991, 163:199-203
98. Wisniewski H.M., Coblenz J.M., Terry R.D., Pick's disease: a clinical and ultrastructural study, *Arch. Neurol.* 26 1972 97- 108.
99. Murayama S, Mori H, Ihara Y, Bouldin TW, Suzuki K, Tomonaga M. Immunocytochemical and ultrastructural studies of lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 1990, 27:137-148

100. Muñoz-García D., Ludwin S. K., Classic and generalizad variants of Pick's disease: A Clinicopathological, Ultrastructural, and Immunocytochemical Comparative Study, *Ann. Neurol.* 16 (1984) 467- 480.
101. Kosaka K, Yoshimura M, Ikeda K, Budka H. Diffuse type of Lewy body disease: Progressive dementia with abundant cortical Lewy bodies and senile changes of varying degree -A new disease? *Clin Neuropathol*, 1987, 3:185-192
102. Byrne EJ, Lennox G, Lowe J, Goodwin-Austen RB. Diffuse Lewy body disease: clinical features in 15 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1989, 52:709-717
103. Byrne EJ, Lennox G, Lowe J, Reynolds G. Diffuse Lewy body disease: the clinical features. In Streifler MB, Korczyn AD, Melamed E, Youdin MBH (eds), *Parkinson disease's: anatomy, pathology, and therapy. Advances in Neurology*, Raven Press, New York, 1990, 53:213-286.