



Universidad Zaragoza

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO



**LA MELATONINA Y SU PAPEL EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

MELATONIN AND ITS ROLE IN ALZHEIMER'S DISEASE



Jorge Hernando Sacristán

Tutor: Joaquín García García

Curso 2018-2019

**Departamento de Fisiología y
Farmacología**

ÍNDICE

1- Abreviaturas.....	Página 3
2- Resumen y palabras clave.....	Página 4
3- Objetivo y métodos.....	Página 5
4- Metabolismo y regulación de la melatonina.....	Página 6
5- Estrés oxidativo y radicales libres.....	Página 8
6- Efectos nocivos de los radicales libres en los tejidos.....	Página 10
7- La melatonina como antioxidante.....	Página 11
8- La enfermedad de Alzheimer.....	Página 13
9- Etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer.....	Página 14
9.1 Hipótesis de la cascada amiloide.....	Página 14
9.2 Hipótesis colinérgica.....	Página 14
9.3 Hipótesis mitocondrial.....	Página 15
9.4 Papel del estrés oxidativo.....	Página 16
10-La melatonina contra la progresión de la enfermedad de Alzheimer.....	Página 18
11-Conclusiones.....	Página 23
12- Bibliografía.....	Página 24

1. ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AFMK: N₁-acetil-N₂-formil-5-metoxikinuramina
- AMCC: 3-acetamidometil 1-6 metoxicinolina
- AMK: N₁-acetil-5-metoxikinuramina
- AMNK: N-acetil-5-metoxi-3-nitrokinuramina
- AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
- ApoE: Apolipoproteína E
- APP: Proteína precursora amiloidea
- ATP: Adenosín trifosfato
- Bcl-2: Linfoma de célula B tipo 2
- C-3HOM: 3-hidroximelatonina cíclica
- CAT: Catalasa
- COX-2: Ciclooxygenasa 2
- GPX: Glutación peroxidasa
- GSH: Glutación reducido
- GSK 3: Glucógeno sintasa quinasa 3
- GSSG: Glutación disulfuro
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HAT: Histona acetil-transferasa
- HIOMT: Hidroxi-indol-O-metiltransferasa
- 4-HNE: 4-Hidroxinonenal
- IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenasa
- IL-1β: Interleuquina 1 beta
- IP3: Inositol trifosfato
- 5-LOX: 5 lipooxygenasa
- LRP-1: Proteína 1 asociada al receptor de lipoproteínas de baja densidad
- Mel: Melatonina
- NAT: N-acetiltransferasa
- NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico
- NO: Óxido nítrico
- •OH: Radical hidroxilo
- ONOO⁻: peroxinitrito
- PGE2: Prostaglandina 2
- PHOX: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato fagocítica-oxidasa
- PKB: Proteín kinasa B
- PTPm: Poros proteicos de transición de permeabilidad mitocondrial
- R•: Radical
- RH: Agente reducido
- RNS/ENO: Especies reactivas derivadas del nitrógeno
- ROS/ERO: Especies reactivas derivadas del oxígeno
- SOD: Superóxido dismutasa
- TLR2: Receptores tipo Toll 2
- TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

2. RESUMEN

La melatonina es una indolamina conocida principalmente por su función de sincronización del ritmo circadiano, pero que posee otras acciones esenciales, como la antioxidante y la anti-inflamatoria, que le confieren un gran potencial en el tratamiento y prevención de numerosas enfermedades, y en especial las enfermedades neurodegenerativas, entre las que destaca la enfermedad de Alzheimer. Esta patología es la principal causa de demencia en las personas de avanzada edad, entre las cuales es altamente prevalente, y que actualmente no tiene ningún tratamiento que modifique la evolución natural de la enfermedad. Existen varias hipótesis que intentan explicar su etiopatogenia, como la acumulación del péptido β -amiloide, la destrucción de neuronas colinérgicas, el papel del calcio en la excitotoxicidad y la cascada mitocondrial, y en la mayor parte de ellas existe una participación importante de la neuroinflamación y del estrés oxidativo. En esta revisión nos centramos en el papel potencial de la melatonina en estos mecanismos etiopatogénicos, pudiendo así ser un aliado terapéutico eficiente, retrasando la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

Melatonin is an indolamine mainly known for its circadian rhythm synchronization function, but it has other essential actions, such as antioxidant and anti-inflammatory, which give melatonin a great potential in the treatment and prevention of numerous diseases, specially neurodegenerative diseases, among which Alzheimer's disease stands out. This pathology the main cause of dementia in the elderly people, among which it is highly prevalent, and currently there is no treatment that modifies the natural evolution of the disease. There are various hypotheses that try to explain its etiopathogenesis, such as the accumulation of β -amyloid peptide, the destruction of cholinergic neurons, the role of calcium in excitotoxicity and the mitochondrial cascade, and in most of them there is an important participation of neuroinflammation and of oxidative stress. In this review we focus on the potential role of melatonin in these etiopathogenic mechanisms, thus being able to be an efficient therapeutic ally, delaying the progression of Alzheimer's disease.

Palabras clave: Melatonina, enfermedad de Alzheimer, radicales libres, estrés oxidativo, neurodegeneración, neuroprotección.

Key words: Melatonin, Alzheimer's disease, free radicals, oxidative stress, neurodegeneration, neuroprotection

3. OBJETIVO Y MÉTODOS

OBJETIVO:

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión de la literatura actual sobre el papel de la melatonina en la patogenia y progresión de la enfermedad de Alzheimer, recopilando y relacionando las diferentes vías sobre las que ésta puede actuar, para posteriormente poder sacar unas conclusiones claras sobre la importancia de este papel. Previo a ello, describiremos la melatonina, su síntesis y regulación, y el estrés oxidativo, radicales libres y sus efectos nocivos, y nos centraremos posteriormente en la función de la melatonina como antioxidante. Posteriormente introduciremos la enfermedad de Alzheimer y sus mecanismos etiopatogénicos, ya que son de vital importancia para poder entender la acción que la melatonina puede ejercer sobre ellos, que es lo que desarrollaremos en la última parte.

MÉTODOS

Para la recopilación bibliográfica se han utilizado motores de búsqueda como Pubmed, Google Académico y Medline, además de recurrir a los artículos citados en algunas de las revisiones encontradas. Se han incluido artículos de revistas de gran impacto como Journal of Pineal Research, Journal of Neuroscience Research y Journal of Physiology and Pharmacology.

4. METABOLISMO Y REGULACIÓN DE LA MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina secretada por la glándula pineal, también llamada epífisis, una estructura localizada en el centro del cerebro, sobre el techo del tercer ventrículo. Posee una amplia variedad de efectos neuroendocrinos, siendo el más conocido la sincronización del ritmo circadiano. Puede considerarse como “la expresión química de la oscuridad”, teniendo su pico de secreción en plasma durante la noche. La regulación de los ritmos circadianos está mediada por el núcleo supraquiasmático, a su vez conectado con el sistema simpático mediante el ganglio cervical superior, cuyas fibras terminan sinaptando con los pinealocitos. El núcleo supraquiasmático actúa como un marcapasos circadiano del ciclo luz-oscuridad (Alghamdi, 2018; Reiter et al., 2011).

Existen otras fuentes extrapineales de secreción de esta hormona, principalmente el tracto gastrointestinal, la piel y en menor medida la retina, el testículo, el ovario, la placenta, las células gliales y los linfocitos. Esta melatonina de origen extrapineal no tiene efecto en el control del ritmo circadiano, siendo su principal aportación funcional la protección contra el estrés oxidativo. (Alghamdi, 2018)

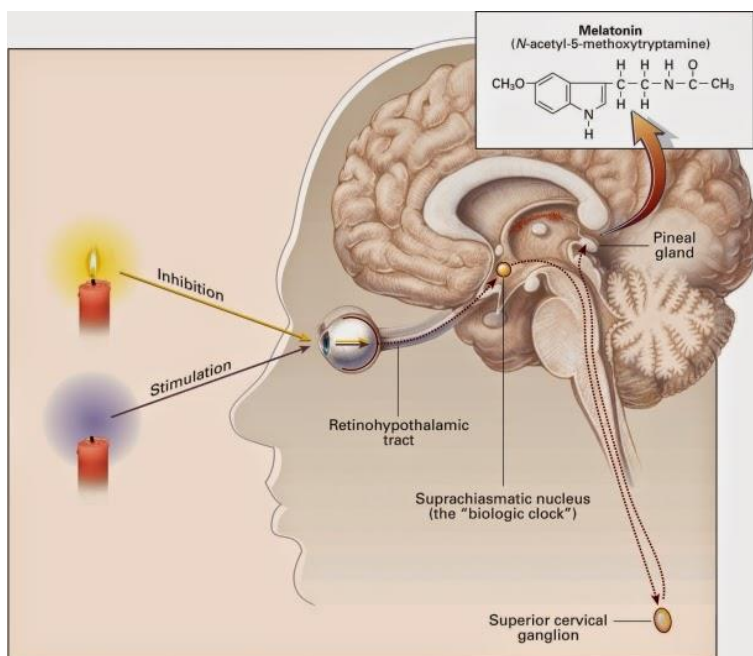
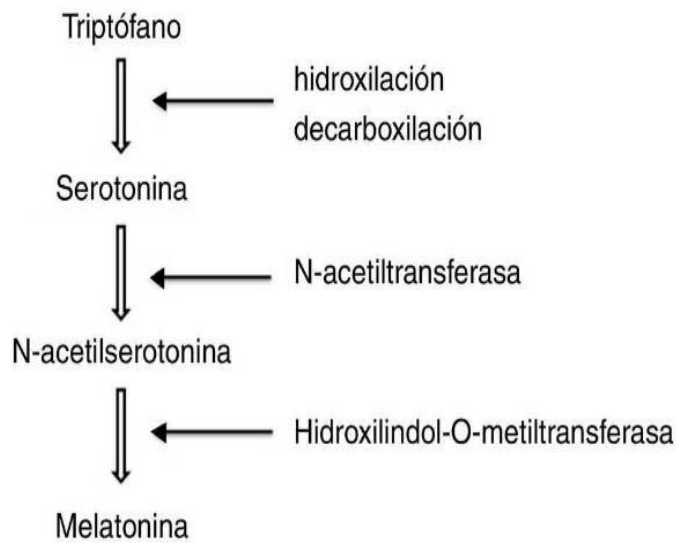


Figura 1. Regulación de la síntesis de melatonina

La síntesis está controlada por el núcleo supraquiasmático, que durante la noche, al recibir los potenciales de acción que se generan en la retina al detectar ausencia de luz, producirá un impulso nervioso que conlleva a una secreción de noradrenalina, la cual se une a receptores beta adrenérgicos de los pinealocitos que activan la síntesis de melatonina (Guerrero, Carrillo-Vico, y Lardone, 2007; Reiter et al., 2011). Para ésta, es necesario primeramente el triptófano, un aminoácido esencial que es convertido en serotonina, después



en N-acetil serotonina y finalmente en melatonina. Durante este proceso intervienen principalmente la N-acetiltransferasa (NAT), y la hidroxil-indol-o-metiltransferasa (HIOMT) (Alghamdi, 2018). Se acepta que la NAT es la enzima que regula la producción de melatonina, ya que su actividad varía con el ritmo circadiano, algo que no se ha observado en la misma medida en el resto de enzimas implicadas en la síntesis de la melatonina (Tan et al., 2015).

La melatonina no se acumula en el pinealocito sino que su liberación a la sangre es rápida, por tanto sus concentraciones plasmáticas son un buen indicador de la síntesis pineal (Guerrero et al., 2007).

Se han descrito dos vías catabólicas de las indolaminas y de la melatonina en particular. En primer lugar, un metabolismo cerebral, donde se producen los metabolitos N₁-acetil-N₂-formil-5-metoxikinuramina (AFMK) y N₁-acetil-5-metoxikinuramina (AMK), sobre todo mediante la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (Tan et al., 2015; Alghamdi, 2018). En segundo lugar, un metabolismo hepático; aquí la melatonina se hidroxila por el citocromo CYP1A2. Esto puede dar gran variabilidad en la metabolización de la hormona, ya que existe una variabilidad entre individuos, además de agentes farmacológicos que inducen o inhiben su actividad, como, por ejemplo, la cafeína que es inhibidora. El principal metabolito que se genera en esta ruta es la 6-hidroximelatonina, la cual se conjuga con sulfato o glucuronido para su excreción vía urinaria (Guerrero et al., 2007; Tan et al., 2015).

Una de sus acciones más importantes es la protección contra los radicales libres. La melatonina es un depurador directo de radicales libres, además de potenciar el efecto protector de otros antioxidantes (Guerrero et al., 2007) La melatonina e incluso sus metabolitos, destacando la 3-hidroximelatonina cíclica por su alta potencia, y el AFMK son capaces de neutralizar hasta 10 especies reactivas de oxígeno, mientras los antioxidantes clásicos normalmente neutralizan solo una (Tan et al., 2015). Además la melatonina tiene su efecto sobre la reproducción, interviniendo en el desarrollo puberal, que va ligado a un descenso fisiológico en los niveles de esta hormona. También posee un efecto inmunomodulador, interviniendo en diversos aspectos del sistema inmunológico (Guerrero et al., 2007).

5. ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

Los radicales libres son átomos, moléculas, o parte de éstas, con existencia independiente, con uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, lo que los convierte en estructuras altamente reactivas al tender a captar un electrón de otras moléculas próximas, con el fin de alcanzar su estabilidad electrónica. Esto puede iniciar una reacción en cadena, ya que al interactuar con estas moléculas, pasarán a ser radicales libres (Avello y Suwalsky, 2006). Debido a su alta reactividad, los radicales libres tienen una vida media muy corta.

En un organismo sano, hay un equilibrio entre la producción y eliminación de los radicales libres, manteniéndolos a unos niveles bajos/moderados y gracias a este control pueden tener efectos beneficiosos: ayudar a la maduración de estructuras celulares, inducir respuestas mitogénicas, y sobre todo, participar en el sistema de defensa de nuestro organismo, siendo producidos por los fagocitos. Cuando los radicales alcanzan concentraciones elevadas, sobrepasando las defensas antioxidantes de la célula, este desequilibrio entre la producción y eliminación se conoce como estrés oxidativo.

La mayoría de radicales que existen en el ser humano son o provienen de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o las especies reactivas de nitrógeno (RNS), que incluyen tanto a los radicales libres como a otras especies químicas electrónicamente estables que con gran facilidad se convierten en radicales libres. Las ROS comprenden, entre otros: el anión radical superóxido, el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el radical alcoxilo, el radical peróxido y el peróxido de hidrógeno

(H₂O₂). Las RNS abarcan el peróxido nítrico, el óxido nítrico, y el dióxido de nitrógeno (Galano et al., 2011). De los derivados de ROS, el •OH es el más reactivo y por eso se considera el más peligroso, responsable de aproximadamente el 60-70% del daño tisular, teniendo muy baja selectividad. Su vida media es muy corta, apenas 1x10⁻⁹ segundos (Galano et al., 2011).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo tiene gran relevancia en el desarrollo de varias enfermedades degenerativas, como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, la esclerosis múltiple, e incluso la aterosclerosis, algunas cardiomiopatías y el cáncer (Avello y Suwalsky, 2006).

Los radicales libres se producen mediante fuentes endógenas, a partir de la activación inmune celular, la inflamación, el estrés, la isquemia-reperusión, la infección, y el propio envejecimiento. Pero también

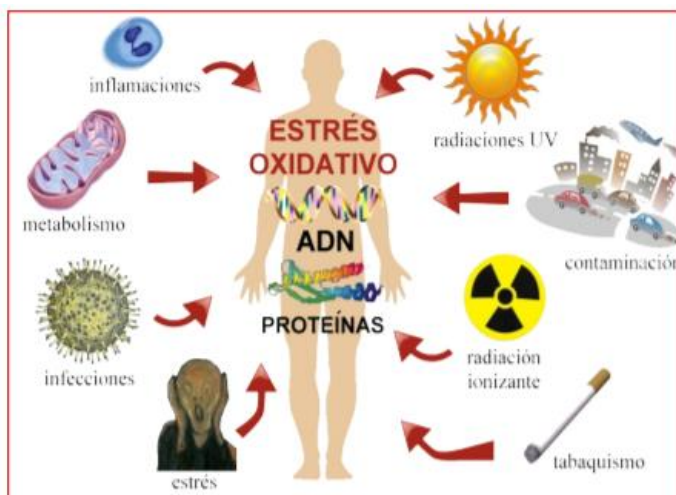


Figura 3. Fuentes exógenas de radicales libres

cabe destacar la importancia de las fuentes exógenas, cada vez más frecuentes en el mundo moderno: la contaminación ambiental, el tabaco, el alcohol, los metales pesados, y las radiaciones ultravioleta e ionizante (Galano et al., 2011).

Los radicales formados endógenamente, a nivel intracelular, pueden hacerlo mediante la recombinación de Haber-Weiss, la reacción de Fenton, que se produce en presencia de metales de transición, o a partir de otros radicales creados de reacciones enzimáticas. Bajo condiciones fisiológicas, el radical libre más abundante es el anión superóxido, siendo la mitocondria su fuente principal. Esto es debido a que la transferencia de electrones por las enzimas de la cadena respiratoria no es eficiente al 100%, y la “fuga” de electrones al oxígeno molecular, en concreto de los complejos I y III, resulta en la formación de anión superóxido (Burton y Jauniaux, 2011). En situaciones en las que existe una mayor actividad metabólica, como pueden ser etapas de crecimiento o procesos inflamatorios, hay una mayor demanda tisular de oxígeno y parte de él (aproximadamente un 2%) deriva en la formación de radicales libres (Avello y Suwalsky, 2006).

6. EFECTOS NOCIVOS DE LOS RADICALES LIBRES EN LOS TEJIDOS

Todas las biomoléculas son susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. En el caso de los lípidos se produce una reacción en cadena denominada peroxidación lipídica, principalmente sobre las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como la membrana celular. De la interacción con los radicales libres se sustrae un átomo de hidrógeno a una de sus cadenas laterales de ácido graso generando un nuevo radical carbonado, que da lugar a una cadena de reacciones oxidativas. Como consecuencia, la membrana pierde su estado fluido y se afectan numerosas funciones, como el transporte o la transducción de señales. Entre los antioxidantes que combaten la reacción de la peroxidación lipídica destaca la vitamina E, ya que por su carácter liposoluble se acumula en el interior de las membranas lipídicas (Avello y Suwalsky, 2006; Burton y Jauniaux, 2011)

El ácido desoxirribonucleico (ADN) también es afectado, principalmente por el $\bullet\text{OH}$. Cabe destacar la importancia de la modificación de genes supresores de tumores y de los oncogenes, teniendo así un papel importante en la patogénesis del cáncer. El ADN mitocondrial es especialmente vulnerable a los radicales libres, ya que la mitocondria es el lugar con mayor producción de ROS, además de que carece de la protección de las histonas, y tiene pobres mecanismos de reparación (Burton y Jauniaux, 2011).

Las proteínas se ven afectadas por los radicales libres que producen la oxidación de sus aminoácidos, entrecruzamiento de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilos. La lesión es mucho más grave si las proteínas afectadas son las enzimas reparadoras o las antioxidantes (Gutiérrez, 2002; Burton y Jauniaux, 2011).

7. LA MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE

Un antioxidante es cualquier molécula que puede neutralizar radicales libres, sea cual sea su mecanismo de acción. Se pueden clasificar en dos grupos: enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros incluyen la superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido para formar H_2O_2 , la catalasa (CAT), que descompone el H_2O_2 en agua, la glutatión peroxidasa (GPX), que también elimina peróxido de hidrógeno, pero usando glutatión reducido, y la glutatión reductasa, que mantiene la proporción GSH/GSSG (una mayor cantidad de glutatión reducido que en su forma oxidada) (Montero, 1996; Gutiérrez, 2002). Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser tanto exógenos, como las vitaminas A, C y E, y los quelantes de metales, como endógenos, como los estrógenos, el glutatión y la transferrina. En este último grupo se encuadra la melatonina.

La melatonina posee varias características que le confieren una potente actividad antioxidante. Es importante destacar su versatilidad como característica diferencial respecto a otros, ya que se ha comprobado que actúa principalmente contra los radicales $\bullet OH$, alcoxilo, y peroxilo, además de actuar contra especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 . Es una molécula muy ubicua, repartida ampliamente entre todas las células y todos sus compartimentos celulares. Al ser altamente liposoluble, parcialmente hidrosoluble, y de un pequeño peso molecular, tiene la habilidad de cruzar barreras fisiológicas por difusión simple a través de la bicapa. Además, podemos obtener melatonina de la dieta como fuente exógena, ya que está ampliamente distribuida en todos los seres vivos, aparte de la que producimos de manera endógena, lo que le confiere una mayor disponibilidad. Otra importante característica de la melatonina es su capacidad de regeneración o compensación electrónica. Una vez que ha reaccionado con un radical libre, oxidándose, puede reciclarse, e incluso los metabolitos que se forman al reaccionar con las especies reactivas de oxígeno pueden tener actividad de captación de radicales libres. Finalmente, otra gran ventaja es su nula toxicidad.

Aunque no son totalmente conocidos, los mecanismos de acción antioxidante de la melatonina más conocidos son los siguientes:

- Formación de aducto radical:
 $Melatonina + \bullet R \rightarrow melatonina - R\bullet$

- Transferencia de átomos de hidrógeno:
Melatonina + $\cdot R \rightarrow$ melatonina(-H) \cdot + HR
- Transferencia de un solo electrón:
Melatonina + $\cdot R \rightarrow$ melatonina \cdot^+ + R^-

Esta última, la transferencia de un solo electrón, puede seguirse, u ocurrir simultáneamente con una transferencia de protón, mediante los mecanismos: transferencia de protón-electrón secuencial y transferencia de electrón acoplada a protón (Galano et al., 2011).

Para comprender mejor el concepto de que los metabolitos de la melatonina tienen capacidad eliminadora de radicales libres, hablaremos de la cascada de reacciones de la melatonina

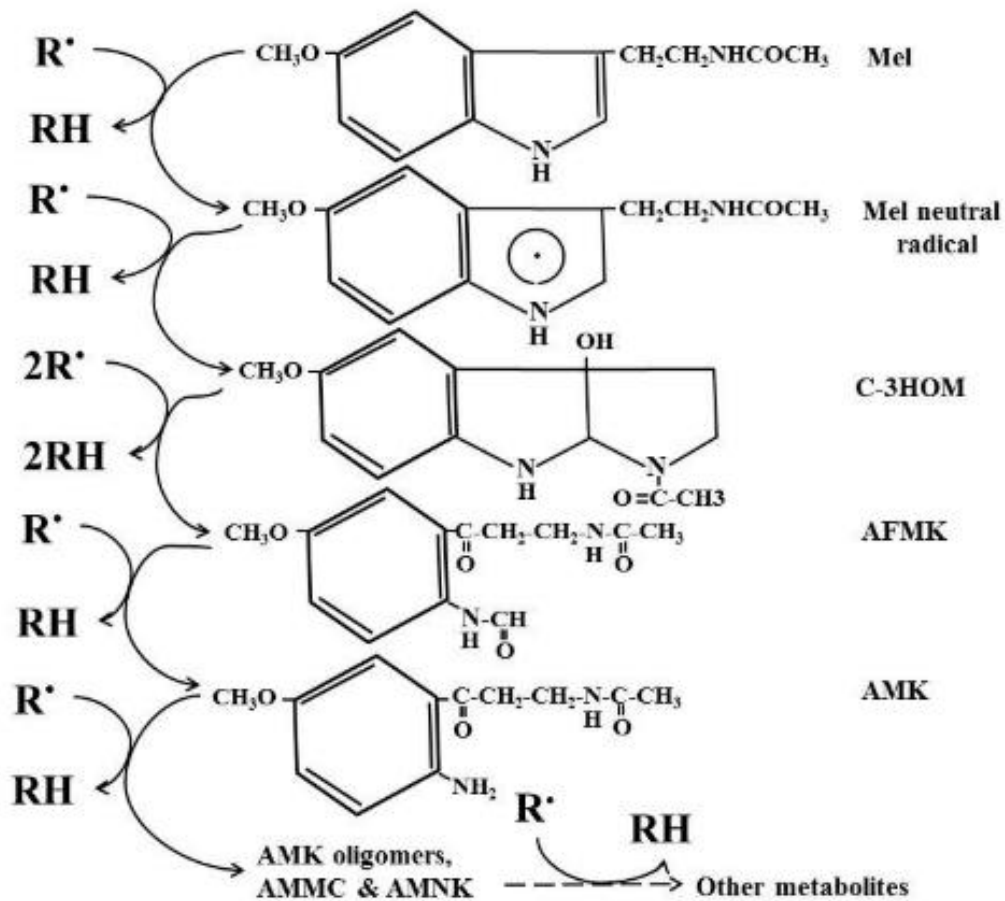


Figura 4. Cascada de reacciones de la melatonina y sus metabolitos en interacción con radicales libres. R•: Radical; RH: Agente reducido; Mel: Melatonina; C-3HOM: 3-hidroximelatonina cíclica; AFMK: N-acetil N-formil-5metoxiknuramina; AMK: N-acetil-5-methoxyknumina; AMCC: 3-acetamidometil-6metoxicinolina; AMNK: N-acetil-5-metoxi-3-nitrokinuramina (Tan et al., 2015).

Esta cascada, además de potenciar la eficiencia de la melatonina como antioxidante, al ver cómo sus metabolitos actúan también como reductores, expande su espectro como antioxidante. Como dato adicional, el AFMK y el AMK tienen una potente acción antiinflamatoria inhibiendo la formación de prostaglandinas (Tan et al., 2015).

8. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es una patología degenerativa del cerebro, que constituye la causa más frecuente de demencia, con una prevalencia del 20% en personas mayores de 80 años. La demencia es un síndrome adquirido que se caracteriza por el deterioro crónico y global de las funciones mentales superiores, interfiriendo con las actividades de la vida diaria de la persona, sin alteración de la conciencia ni de la atención. Para su diagnóstico debe haber otras alteraciones cognitivas además de la alteración de la memoria, las cuales son: alteración de la función ejecutiva, afasia, apraxia y agnosia. Es importante descartar las causas reversibles que pueden causar síntomas compatibles con la demencia, como las causas psiquiátricas (depresión, delirium), hipotiroidismo, déficit de vitamina B₁ y B₁₂, o algunas drogas y fármacos. (Gaugler et al., 2016)

En la anatomía patológica de la enfermedad de Alzheimer se puede visualizar una pérdida de neuronas, principalmente en el hipocampo, propiciada por la formación de placas seniles extraneurales de proteína amiloide y ovillos neurofibrilares intraneuronales compuestos de proteína tau anormal, siendo estas dos acumulaciones muy características. Además, existe una pérdida de la acetilcolina y de la enzima colina-acetil-transferasa, relacionado con la pérdida de neuronas colinérgicas del núcleo basar de Meynert. (Jack et al., 2018)

Algunos genes y sus mutaciones están implicados en la patogenia del Alzheimer, como la mutación del gen de la proteína precursora de amiloide (presente en el cromosoma 21) y de los genes de la presenilina 1 y 2, principalmente en las formas tempranas de la enfermedad (con un inicio anterior a los 60 años y un peor pronóstico). Un gen muy importante es el de la Apolipoproteína E (Apo E), la cual participa en el transporte del colesterol. Situado en el cromosoma 19, existen 3 alelos de este gen (E2, E3 y E4), y la herencia de un alelo E4 triplica la

probabilidad de desarrollo de la enfermedad 3, convirtiéndose en de 8 a 12 veces mayor si se heredan dos copias de este alelo.

Actualmente están aprobados algunos tratamientos que retrasan la progresión de los síntomas, mejorando el rendimiento cognitivo en fases tempranas de la enfermedad. Los más utilizados son los inhibidores de la acetilcolinestasa cerebral: el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina. (Gandía et al., 2006) También se utiliza la memantina un antagonista de los receptores de glutamato NMDA, y el tratamiento no farmacológico como la terapia conductual.

9. ETIOPATOGENIA DEL ALZHEIMER

La destrucción de neuronas y la pérdida de sinapsis en la enfermedad de Alzheimer que derivan en la afectación neurológica se pueden explicar mediante 3 hipótesis etiopatogénicas: 1) colinérgica, 2) cascada amiloide, y 3) cascada mitocondrial. En todas ellas el estrés oxidativo y la neuroinflamación desempeñan un importante papel (Pappolla et al., 1997).

9.1 Hipótesis de la cascada amiloide

El péptido β -amiloide es el factor más estudiado en relación con la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Se sintetiza a partir de la proteína precursora amiloidea (APP), la cual existe ubicuamente integrada en la membrana celular. La vía amiloidogénica necesita la acción de 2 secretasas: la β -secretasa y la γ -secretasa, que escinden diferentes fragmentos de la proteína precursora amiloidea, resultando en un péptido de 39-43 aminoácidos, el β -amiloide, que se libera al medio extracelular donde formará agregados insolubles, convirtiéndose en el principal componente de las placas seniles. Posteriormente, se produce una reinternalización en la célula y, en consecuencia, una acumulación intracelular de β -amiloide, lo que generará axonopatías, pérdida sináptica, y muerte neuronal.

9.2 Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica sostiene que la degeneración de las neuronas colinérgicas, y, por lo tanto la pérdida de neurotransmisión colinérgica en la

corteza cerebral, causa un deterioro en la función cognitiva en los pacientes con Alzheimer. La base científica del tratamiento actual de la enfermedad de Alzheimer se basa en esta hipótesis, mediante los anticolinesterásicos, que pretenden incrementar los niveles sinápticos de acetilcolina. La β -amiloide y el estrés oxidativo pueden reducir la síntesis de acetilcolina, actuando sobre la actividad de la colina-acetiltransferasa: la β -amiloide produce un aumento de la entrada de calcio en la célula, lo que produce una mayor liberación de acetilcolinesterasa.

9.3 Hipótesis de la cascada mitocondrial

La hipótesis de la cascada mitocondrial en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer postula que la durabilidad y funcionabilidad de las mitocondrias están determinadas por la herencia y edad, y por tanto una vez que se supera el umbral límite de cambios mitocondriales, se desencadena la patología, al verse afectada la respiración mitocondrial, y en consecuencia no suplir las demandas energéticas neuronales. Más allá de las hipótesis, se ha demostrado que importantes cambios en la mitocondria son atribuibles al estrés oxidativo inducido por la β -amiloide. Es importante destacar el daño al ADN mitocondrial, el cual, al no estar protegido por histonas, es más susceptible al daño producido por el estrés oxidativo. Este daño al ADN mitocondrial suele relacionarse con una disfunción de la cadena de transporte de electrones y la apoptosis resultante (Swerdlow y Khan, 2004). Las especies reactivas de oxígeno, además del exceso de calcio en el citosol producido por el glutamato, también producen un daño en la membrana mitocondrial, lo que favorece la apertura de poros proteicos de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) en ella. Esto permeabiliza la membrana mitocondrial, de tal manera que produce un hinchamiento de la misma, y en consecuencia una rotura de su membrana, liberando al citoplasma enzimas catabólicas y moléculas con actividad proapoptótica, como el citocromo C, que activará a la caspasa 9 y provocará finalmente la apoptosis de la neurona. La formación de estos poros también puede producirse por el aumento de calcio intracelular mediado por los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Torneró et al., 2002).

9.4 Papel del estrés oxidativo

Se han evidenciado marcadores de un elevado estrés oxidativo en el neocórtex e hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer, como elevados niveles de 4-hidroxinonenal y acroleína, productos de la peroxidación lipídica. De hecho, las propiedades neurotóxicas de la β -amiloide dependen en gran medida de los radicales libres. La excesiva producción de radicales en la enfermedad de Alzheimer proviene del estallido respiratorio de la microglía debido a la neuroinflamación inducida por la β -amiloide, mediante la activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) fagocítica- oxidasa (PHOX), la cual transfiere electrones de la NADPH al oxígeno molecular, generando anión superóxido. Esta elevada activación de la microglía se produce a través de receptores de la respuesta inmune innata, como son los receptores tipo Toll 2 (TLR2), que se activan al unirse a ellos el péptido β -amiloide, lo cual se traducirá en una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias. La enzima ciclooxigenasa 2 (COX 2), inducida en el cerebro por éstas citoquinas proinflamatorias, como la Interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), regula la señalización de la prostaglandina 2 (PGE2) en las neuronas, y puede activar la transcripción de proteína precursora amiloidea en los astrocitos, además de aumentar la liberación de glutamato, responsable de causar daño excitotóxico neuronal mediante la apertura de canales iónicos de calcio, cuyo aumento en el citosol activará una serie de segundos mensajeros, como la fosfolipasa A₂, la calmodulina, la calpaína y la endonucleasa (ver Figura 5), que llevarán al final a la muerte neuronal (García, 2003).

Además, de manera recíproca, el propio estrés oxidativo generado puede inducir la acumulación intracelular de β -amiloide, activando la vía amiloidogénica, y sobre todo al oxidar, y por tanto inutilizar, la proteína transportadora LRP-1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1), la cual se encarga de transportar el β -amiloide a través de la barrera hematoencefálica a la sangre, con lo cual este mecanismo de limpieza se inhabilitaría (Cheignon et al., 2018; Misonou, Morishima-Kawashima, & Ihara, 2000). La β -amiloide también puede reducir el oxígeno molecular a H₂O₂ en presencia de hierro mediante la reacción de Fenton. La β -amiloide también tiene la capacidad de unirse a la catalasa, impidiendo su acción antioxidante contra el H₂O₂. La proteína Tau es también un objetivo del estrés oxidativo. Se ha observado que el 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producto de la peroxidación lipídica, puede inducir modificaciones de

conformación en la Tau, contribuyendo a su hiperfosforilación anormal (Cheignon et al., 2018).

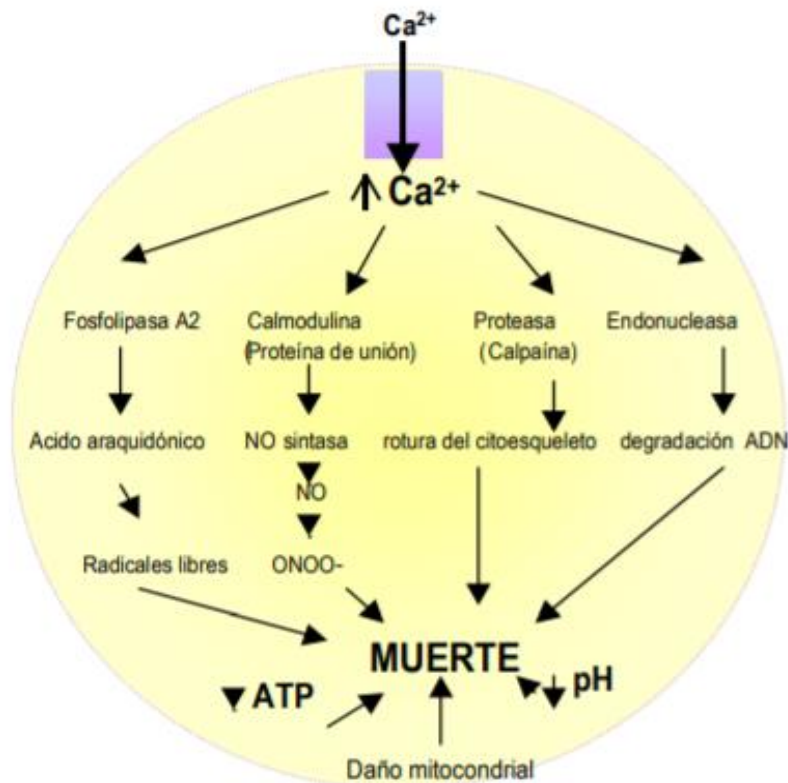


Figura 5. Mecanismos de neurotoxicidad mediados por el aumento de calcio citosólico neuronal. NO: óxido nítrico, ONOO-: peroxinitrito, ATP: adenosín trifosfato.

10. LA MELATONINA CONTRA LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La melatonina tiene un importante papel protector en los mecanismos de la patogenia de ésta enfermedad, siendo un potencial aliado terapéutico contra su progresión.

En relación con el procesamiento de β -amiloide, la indolamina puede prevenir su agregación, mediante la rotura de los puentes salinos de histidina y ácido aspártico, fundamentales en la formación y la estabilización de las cadenas β (Pappolla et al., 1998). El promotor del gen de la proteína precursora amiloidea tiene regiones que son sensibles a adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual puede inducir la síntesis de ésta proteína. Las prostaglandinas producidas por inflamación o lesión cerebral provocan un aumento de formación de AMP cíclico, lo cual correlaciona la neuroinflamación y la neurodegeneración. La melatonina tiene la capacidad de inhibir las prostaglandinas interfiriendo en la vía de la ciclooxigenasa-2/prostaglandinas, que utiliza como segundo mensajero al AMPc (Mayo et al., 2005), e incluso puede bloquear directamente la producción de AMPc uniéndose a sus receptores específicos. Otro mecanismo de la melatonina para impedir la formación de proteína precursora amiloidea es mediante la estimulación de la fosfolipasa C, la cual activa la proteína quinasa C que fosforila, y por tanto inactiva la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK 3), una enzima fundamental en la síntesis de la proteína precursora amiloidea y en la hiperfosforilación de la proteína tau, impidiendo su principal función de estabilización de los microtúbulos axonales, lo que llega a conducir a la muerte neuronal (Rosales-Corral et al., 2012).

La melatonina también puede actuar sobre la degeneración colinérgica presente en la enfermedad de Alzheimer, reduciendo la actividad de la acetilcolinesterasa inducida por la β -amiloide, el cual interactúa con el receptor tipo NMDA, produciendo una elevación sostenida de calcio libre citosólico, que promueve una mayor activación de acetilcolinesterasa (Zhu et al., 2007). Este hecho se puede explicar gracias a la modulación de los niveles de calcio citosólico que lleva a cabo la melatonina mediante varios mecanismos. Uno de ellos es actuando sobre su receptor MT2, lo que lleva a la inhibición de la adenilil ciclasa, y por tanto se reducirá la formación de AMP cíclico, bloqueando así la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, la cual fosforila los canales receptores de inositol trifosfato (IP3) y facilita la salida de calcio del retículo endoplasmático

(Bugrim, 1999). Otro de los mecanismos es mediante la unión a la calreticulina, favoreciendo el secuestro de calcio en el retículo endoplasmático (Arnaudeau et al., 2002; Macias et al., 2003). Mediante esta reducción del calcio citosólico, la melatonina también protege a las células de la muerte a través de las vías dependientes de calcio, como la de la caspasa-3 y la calpaína, atenuando también la excitotoxicidad mediada por glutamato, que actúa mediante los mismos receptores NMDA (Das et al., 2008).

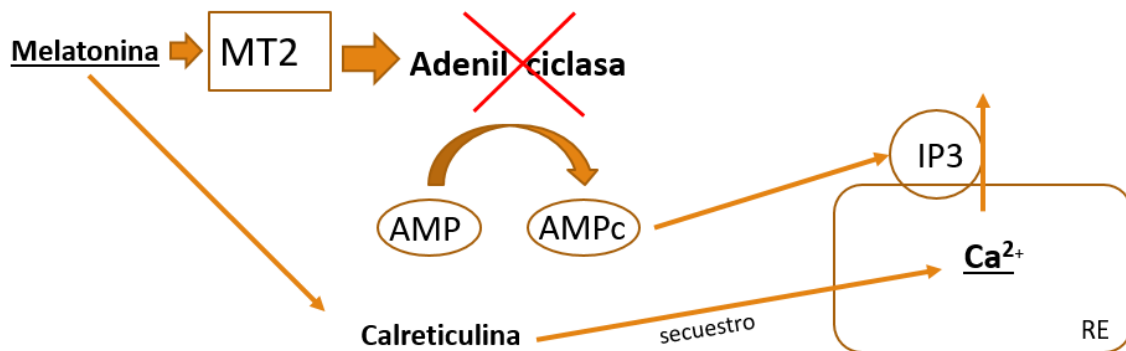


Figura 6. Papel de la melatonina en la reducción de la actividad de la acetilcolinesterasa producida por una elevación sostenida de calcio libre citosólico. A través del receptor MT2, impide la formación de AMPc mediada por la adenil ciclasa, lo que evitará la fosforilación de los canales receptores de IP3 y la salida de calcio del retículo endoplasmático. También lo hará mediante el secuestro de calcio por la calreticulina. MT2: receptor de melatonina tipo 2, AMPc: adenosín monofosfato cíclico, Ca^{2+} : calcio libre, IP3: inositol trifosfato.

Uno de los papeles más importantes de la melatonina es su interferencia en el ensamblaje inducido por β -amiloide de la NADPH oxidasa fagocítica (PHOX) y su posterior generación de radicales libres de oxígeno, bloqueando la fosforilación de la subunidad p47 de la PHOX. Este bloqueo se produce gracias a la inhibición de la protein kinasa B (PKB), la cual actúa en la microglía, y su activación está mediada por el H_2O_2 (Lahair, Howe, Rodriguez-Mora, McCubrey, & Franklin, 2006). La melatonina elimina el H_2O_2 , y se forman los metabolitos AFMK y AMK, potentes neutralizadores de radicales libres que actuarán como antioxidantes y agentes antiapoptóticos en la corteza cerebral. Mediante este mecanismo antioxidante, se impide la retroalimentación de la neuroinflamación por parte de los radicales libres y la activación de la vía amiloidogénica de formación de β -amiloide. Además, impide la oxidación de la proteína LRP-1, favoreciendo así la eliminación de β -amiloide por esta vía, y se reduce la influencia del estrés oxidativo en la hiperfosforilación anormal de la proteína Tau

y su posterior formación de ovillos neurofibrilares (ver figura 6) (Rosales-Corral et al., 2012). Se ha comprobado *in vivo* que la melatonina reduce la respuesta proinflamatoria, disminuyendo aproximadamente un 50% los niveles de citoquinas proinflamatorias IL1- β , IL6 y TNF- α (S. Rosales-Corral et al., 2003), las cuales estimulan la COX-2. Además, la melatonina también inhibe a la histona acetil-transferasa (HAT), que, junto a su cofactor nuclear p300, es esencial para la activación de la transcripción de la COX-2 por medio de los mediadores proinflamatorios, evitando así la activación de la transcripción de proteína precursora amiloidea por medio de la PGE2 y la liberación de glutamato (ver figura 7) (Rosales-Corral et al., 2012).

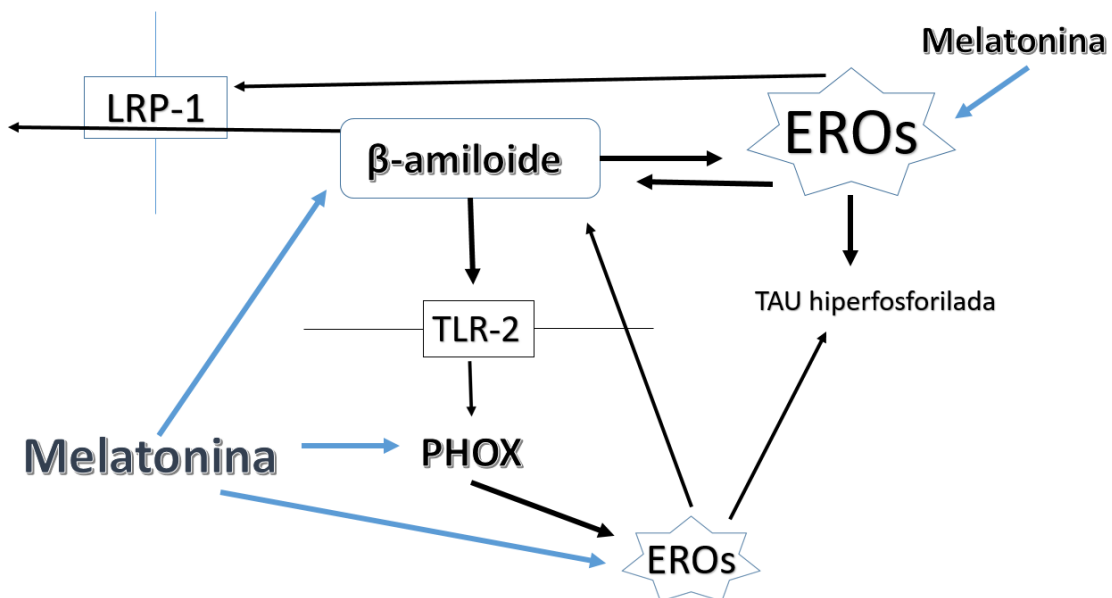


Figura 7. Lugares de actuación de la melatonina en algunos de los mecanismos etiopatogénicos más importantes de la enfermedad de Alzheimer que implican la participación de radicales libres. Se puede observar como la melatonina impide la retroalimentación de las especies reactivas de oxígeno en la formación de β -amiloide, actuando sobre la PHOX, y directamente sobre los radicales libres, impidiendo también la oxidación del LRP-1, permitiendo así el transporte del β -amiloide fuera del cerebro. La melatonina puede impedir directamente también la agregación del β -amiloide. PHOX: NADPS oxidasa fagocítica. EROs: especies reactivas de oxígeno, TLR-2: toll like receptor 2, LRP-1: low density lipoprotein receptor 1.

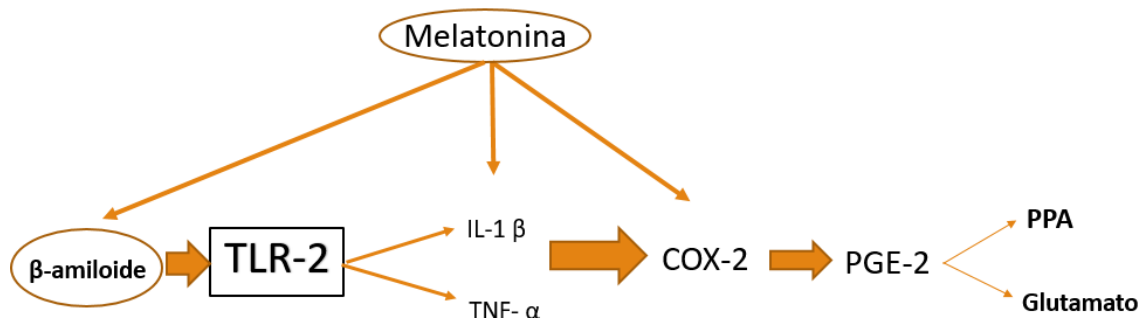


Figura 8. Lugares de actuación de la melatonina en mecanismos de neuroinflamación y formación de proteína precursora amiloidea. La melatonina puede inhibir directamente la formación de β -amiloide actuando sobre la α -secretasa y rompiendo los puentes salinos de histidina y ácido aspártico. Puede reducir un 50% los niveles de citoquinas proinflamatorias, e inhibe a la histona acetil transferasa, esencial para la activación de la transcripción de la COX-2. TLR-2: receptor tipo toll 2, IL-1 β : interleuquina 1 beta, TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, COX-2: ciclooxigenasa 2, PGE-2: prostaglandina 2, PPA: proteína precursora amiloidea

Otra gran protagonista de la neuroinflamación es la 5-lipooxigenasa (5-LOX), la cual oxida ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico, encadenando una serie de reacciones que dan como resultado la formación de leucotrienos (los cuales participan activamente en la inflamación). Además, también modula la actividad de la α -secretasa, la cual participa en la formación de β -amiloide. La melatonina puede inhibirla actuando sobre la región promotora de los genes que codifican ésta enzima. De hecho, se ha observado que la disminución de los niveles de melatonina en ancianos, debido al propio envejecimiento, está relacionado con una sobreexpresión de 5-LOX (Uz et al., 1998). La movilización lipídica necesaria para obtener los ácidos grasos poliinsaturados, que será los sustratos para las encimas 5-LOX y COX, se realiza gracias a la intervención de la fosfolipasa A₂. La melatonina también puede reducir los niveles de ésta enzima, actuando sobre los receptores MT1 y MT2, y reduciendo los niveles de calcio citosólico (como hemos explicado anteriormente), ya que la fosfolipasa A₂ es una enzima dependiente de calcio (Rosales-Corral et al., 2012).

Además de la capacidad intrínseca de la melatonina de neutralizar radicales libres, ésta tiene la habilidad de mejorar los mecanismos antioxidantes endógenos de las mitocondrias neuronales, principalmente manteniendo y regenerando el contenido de glutatión (GSH) en la misma, al impedir la oxidación del GSH a glutatión disulfuro (GSSG), contrarrestando así la acción del terc-

butilo hidroperóxido (Martín et al., 2000). La melatonina también combate la peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial y la fuga de radicales libres, y protege el ADN mitocondrial, además de mantener intacta la producción de ATP, que puede verse deteriorada por el estrés oxidativo. Se ha descubierto que la melatonina tiende a acumularse en la mitocondria, de tal manera que los niveles de melatonina en ésta podrían ser hasta 100 veces mayores que en el citoplasma. (Rosales-Corral et al., 2012)

La melatonina ejerce una inhibición directa de los poros de permeabilidad transicional mitocondriales (PTPm), impidiendo el mecanismo apoptótico mediado por éstos (Andrabi et al., 2004). Esto lo consigue protegiendo a la cardiolipina del estrés oxidativo, ya que se trata de un importante componente de la membrana mitocondrial especialmente susceptible a las especies reactivas de oxígeno, y cuya oxidación favorecerá la apertura de los PTPm.

Otro de los mecanismos mediante el cual la melatonina evita la apoptosis neuronal es actuando, a través de la interacción con los receptores MT-1 y MT-2, sobre la familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) estimulando la sobreexpresión del gen para sintetizar proteínas antiapoptóticas (subfamilia Bcl-2), e inhibiendo la activación y la dimerización de las pro-apoptóticas (subfamilia Bax) (Radogna et al., 2008). La Bcl-2 modula la apertura los canales iónicos dependientes de voltaje, que participan en la permeabilización de la membrana mitocondrial y en la generación de PTPm, con lo cual puede evitar la salida del citocromo C y por lo tanto la apoptosis resultante. El proceso contrario lo realiza la proteína Bax, que permeabiliza la membrana mitocondrial favoreciendo la liberación de citocromo C, con lo cual su inhibición evitaría el desencadenamiento de la apoptosis mediante esta vía (Tornero et al., 2002).

11. CONCLUSIONES

En vista de todos los estudios revisados, podemos decir que existen múltiples mecanismos mediante los cuales la melatonina puede ayudar a frenar la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Uno de los más importantes de esta patología es la acumulación de β -amiloide. La melatonina puede evitar de manera directa la formación de este péptido, además de actuar sobre otras vías, como evitando la formación de AMPc o inactivando la GSK 3. Con esto, reducirá la actividad acetilcolinesterasa inducida por el β -amiloide, actuando así sobre otro de los frentes que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad. Es fundamental destacar aquí el papel de la melatonina al ejercer como antioxidante, ya que el estrés oxidativo juega un papel clave en la etiopatogenia, al contribuir en gran medida a la neuroinflamación, a la hiperfosforilación de la proteína TAU, a la formación y acumulación de β -amiloide y a la apoptosis neuronal mediante poros de permeabilidad transicional mitocondriales. No hay que olvidar su función homeostática del calcio citosólico, que también puede evitar la excitotoxicidad neuronal y la neuroinflamación mediada por éste.

Actualmente la melatonina se utiliza solamente en éstos enfermos con el objetivo de paliar los trastornos del sueño que pueden padecer, ya que se ha visto que los niveles de melatonina en ancianos son más bajos que en personas de mediana edad, pero a la vista de toda la evidencia, sería muy interesante explotar su uso con el objetivo de atenuar o enlentecer la enfermedad de Alzheimer, ya que puede convertirse en un potente aliado terapéutico, especialmente si se considera que además la melatonina carece de efectos adversos como tratamiento farmacológico incluso a dosis muy elevadas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Alghamdi, B. S. (2018). The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 96(7), 1136–1149.
- Andrabi, S. A., Sayeed, I., Siemen, D., Wolf, G., y Horn, T. F. W. (2004). Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(7), 869–871.
- Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M., y Demaurex, N. (2002). Calreticulin Differentially Modulates Calcium Uptake and Release in the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46696–46705.
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 494, 161–172.
- Bugrim, A. E. (1999). Regulation of Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase. A mechanism for agonist-specific calcium signaling? *Cell Calcium*, 25(3), 219–226.
- Burton, G. J., y Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress research. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25, 287–299.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., y Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14(October 2017), 450–464.
- Das, A., Belagodu, A., Reiter, R. J., Ray, S. K., y Banik, N. L. (2008). Cytoprotective effects of melatonin on C6 astroglial cells exposed to glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Journal of Pineal Research*, 45(2), 117–124.
- Galano, A., Tan, D. X., y Reiter, R. J. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*, 51(1), 1–16.
- Gandía, L., Álvarez, J., Hernández-Guijo, J., González-Rubio, R., de Pascual, J., y Rojo, L. (2006). Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología*, 42(8), 471–477.
- García, E. (2003). *Muerte neuronal excitotóxica: interacción entre las rutas de señalización del IGF-I y el glutamato*. Madrid.
- Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Scholz, K., y Weuve, J. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 12(4), 459–509.
- Guerrero, J. M., Carrillo-Vico, A., y Lardone, P. J. (2007). La Melatonina. *Investigación y Ciencia*, 373, 30–38.

- Gutiérrez, R. V. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Silverberg, N. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 14(4), 535–562.
- Lahair, M. M., Howe, C. J., Rodriguez-Mora, O., McCubrey, J. A., y Franklin, R. A. (2006). Molecular pathways leading to oxidative stress-induced phosphorylation of Akt. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), 1749–1756.
- Macias, M., Escames, G., Leon, J., Coto, A., Sbihi, Y., Osuna, A., y Acuña-Castroviejo, D. (2003). Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *European Journal of Biochemistry*, 270(5), 832–840.
- Martin, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., y Acuña-Castroviejo, D. (2000). Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB Journal*, 14(12), 1677–1679.
- Mayo, J. C., Sainz, R. M., Tan, D.-X., Hardeland, R., Leon, J., Rodriguez, C., y Reiter, R. J. (2005). Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, 165(1), 139–149.
- Misonou, H., Morishima-Kawashima, M., y Ihara, Y. (2000). Oxidative Stress Induces Intracellular Accumulation of Amyloid β -Protein (A β) in Human Neuroblastoma Cells. *Biochemistry*, 39(23), 6951–6959.
- Montero, M. (1996). Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Revisión. *Anales de La Facultad de Medicina*, 57(4), 278–281.
- Pappolla, M. A., Sos, M., Omar, R. A., Bick, R. J., Hickson-bick, D. L. M., Reiter, R. J., Robakis, N. K. (1997). Melatonin Prevents Death of Neuroblastoma Cells Exposed to the Alzheimer Amyloid Peptide, 17(5), 1683–1690.
- Pappolla, M., Bozner, P., Soto, C., Shao, H., Robakis, N. K., Frangione, B., y Ghiso, J. (1998). Fibrillogenesis by Melatonin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (13), 7185–7188.
- Radogna, F., Cristofanon, S., Paternoster, L., D'Alessio, M., De Nicola, M., Cerella, C., Ghibelli, L. (2008). Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 316–325.
- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Tan, D. X., Davis, J., Brzozowski, T. (2011). The photoperiod, circadian regulation and chronodisruption: The requisite interplay between the suprachiasmatic nuclei and the pineal and gut melatonin. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(3), 269–274.

- Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Manchester, L. C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R. J. (2012). Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 167–202.
- Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., Reiter, R. J., Valdivia-Velazquez, M., Martinez-Barboza, G., Acosta-Martinez, J. P., y Ortiz, G. G. (2003). Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-beta peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *Journal of Pineal Research*, 35(2), 80–84.
- Swerdlow, R. H., y Khan, S. M. (2004). A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 63(1), 8–20.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z., y Reiter, R. J. (2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. *Molecules*, 20(10), 18886–18906.
- Tornero, D., Ceña, V., González-García, C., y Jordán, J. (2002). Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Revista de Neurología*, 35(4), 354–361.
- Uz, T., Pesold, C., Longone, P., y Manev, H. (1998). Aging-associated up-regulation of neuronal 5-lipoxygenase expression: putative role in neuronal vulnerability. *FASEB Journal*, 12(6), 439–449.
- Zhu, H., Gao, W., Jiang, H., Jin, Q.-H., Shi, Y.-F., Tsim, K. W. K., & Zhang, X.-J. (2007). Regulation of acetylcholinesterase expression by calcium signaling during calcium ionophore A23187- and thapsigargin-induced apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 93–108.