

COLLOQUIUM SERIES ON NEUROGLIA

Series Editors: Alexei Verkhratsky and Vladimir Parpura

Le Enfermedad de Alexander:  
Una Guía para Pacientes y Familias

# Alexander Disease

A Guide for Patients  
and Families

Albee Messing  
University of Wisconsin-Madison

Traducido del inglés por Charlene N. Rivera-Bonet, Ph.D.

Copyright © 2018 by Morgan & Claypool Life Sciences

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means—electronic, mechanical, photocopy, recording, or any other except for brief quotations in printed reviews, without the prior permission of the publisher.

Alexander Disease: A Guide for Patients and Families  
Albee Messing  
[www.morganclaypool.com](http://www.morganclaypool.com)

ISBN: 9781615047581 paperback

ISBN: 9781615047598 ebook

DOI: 10.4199/C00156ED1V01Y201708NGL010

A Publication in the

*COLLOQUIUM SERIES ON NEUROGLIA IN BIOLOGY AND MEDICINE: FROM PHYSIOLOGY  
TO DISEASE*

Lecture #10

Series Editors: **Alexei Verkhratsky**, The University of Manchester, U.K.; IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain; Department of Neurosciences, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Spain and **Vladimir Parpura**, Department of Neurobiology, Center for Glial Biology in Medicine, Atomic Force Microscopy & Nanotechnology Laboratories, Civitan International Research Center, Evelyn F. McKnight Brain Institute, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, U.S.A.

**Series ISSN**

ISSN 2375-9933 print

ISSN 2375-9917 ebook

Cover Image: Photograph of SW13 cells expressing the R88C variant of GFAP (green), courtesy of Ming-Der Perng, Institute of Molecular Medicine, National Tsing Hua University, Taiwan.

## **Abstracto**

Este libro ofrece un repaso comprensivo de la enfermedad de Alexander, una enfermedad neurológica extraña y devastadora que a menudo afecta la materia blanca del cerebro y la médula espinal.

Su neuropatología distintiva consiste en fibras de Rosenthal abundantes en astrocitos (uno de los cuatro tipos principales de células en el sistema nervioso central). Casi todos los casos son causados por una variante en el gen que codifica para la proteína de filamento intermedio GFAP, pero no se entiende bien cómo esos cambios en GFAP llevan a las manifestaciones de la enfermedad.

Los astrocitos, aunque fueron descubiertos hace más de un siglo, también son un misterio. Exhiben una diversidad considerable, desafían definición precisa, y aun así regulan muchos aspectos del funcionamiento del sistema nervioso.

También tenemos un entendimiento incompleto de las fibras de Rosenthal, estructuras extrañas que contienen GFAP como uno de sus muchos componentes. Se desconoce si son protectoras o tóxicas. Además, las fibras de Rosenthal no son únicas de la enfermedad de Alexander, y se ven esporádicamente en una amplia variedad de condiciones, incluyendo tumores cerebrales y esclerosis múltiple.

GFAP es la tercera desconocida. Es una proteína antigua, surgiendo temprano en la evolución de los vertebrados, pero su rol en la biología normal todavía es motivo de debate. Aun así, la enfermedad de Alexander demuestra, sin lugar a duda, que cambiar solo uno de sus 432 aminoácidos puede llevar a catástrofe, no solo en los astrocitos donde se produce el GFAP, pero también en otras células con las cuales los astrocitos interactúan.

A pesar de todas las incógnitas, se ha aprendido mucho en los últimos 20 años, y es tiempo de compartir ese conocimiento. Este libro está dirigido a pacientes recientemente diagnosticados, familiares, e investigadores no especialistas interesados en esta enfermedad neurológica. Cubre orígenes históricos, el estado de conocimiento actual, y las posibilidades de lo que está por venir, con referencias a literatura primaria a lo largo del escrito.

## **Palabras Clave**

Enfermedad de Alexander, astrocitos, fibras de Rosenthal, GFAP, gliosis, astrogliosis, filamentos intermedios,  $\alpha$ B-cristalina, Nrf 2, Glt-1, ceftriaxona, litio, leucodistrofias, macrocefalia, convulsiones, hidrocefalia, disfagia, disartria, disfonía, ataxia, cifosis, escoliosis, mioclonía palatina, prevalencia, incidencia, gigaxonina, neuropatía axonal gigante, autosómico dominante, mosaicismo germinal, expresividad, penetrancia, células madre neuronales, células madre pluripotente inducidas, transgénico, estrés oxidativo, proteasoma, autofagia

## Contenido

### Introducción

1. Historia y Conceptos Clásicos (La Era Pre-Genética)	
1.1 El Primer Caso y la Historia Temprana .....	1
1.2 ¿Qué son las Fibras de Rosenthal? .....	2
1.3 ¿Qué son los Astrocitos? .....	4
1.4 Espectro Clínico de la Enfermedad de Alexander alrededor del 2001 .....	6
1.5 Criterios de Diagnóstico con Resonancia Magnética.....	8
1.6 Características de la Población .....	10
2. Genética de la Enfermedad de Alexander	
2.1 Descubrimiento Inicial de GFAP y su Impacto en Neurociencia y Neuropatología .....	11
2.2 Conexión a la Enfermedad de Alexander .....	13
2.3 Resumen de Genética Actual .....	15
2.4 ¿Qué Tal los Pacientes de la Enfermedad de Alexander cuya Secuencia de GFAP es Normal? .....	19
2.5 Problemas en Consejería Genética .....	20
3. Expansión de Fenotipo Clínico y Otras Brechas en Entendimiento	
3.1 Sistemas de Clasificación .....	25
3.2 ¿La Enfermedad de Alexander Siempre Envuelve Anormalidades de Materia Blanca? .....	26
3.3 ¿La Discapacidad Intelectual en la Enfermedad de Alexander Única? .....	26
3.4 La Necesidad de Estudios de Historia Natural de la Enfermedad de Alexander .....	27
3.5 Conceptos Erróneos Comunes de la Literatura Temprana .....	29
3.6 Brechas en el Entendimiento del Fenotipo Clínico .....	29
4. Mecanismos de la Enfermedad	
4.1 GFAP y Evolución .....	31
4.2 Otros Tipos de Células También Expresan GFAP – ¿También son Afectadas? .	32
4.3 Comparaciones con Desórdenes de Otros Filamentos Intermedios .....	32
4.4 Sistemas Modelo para Estudio .....	34
4.4.1 Sistemas Libres de Células .....	34
4.4.2 Cultivo de Células .....	35
4.4.3 ¿La Enfermedad de Alexander Ocurre en Otras Especies de Animales? .....	37
4.4.4 Modelos de Animales Diseñados .....	38
4.5 ¿Cómo las Variantes de GFAP Causan la Enfermedad? .....	40

4.6 ¿Se Pierden Astrocitos? .....	44
4.7 ¿Son las Fibras de Rosenthal Tóxicas para los Astrocitos? .....	44
4.8 ¿Podría Alguien Tener la Enfermedad de Alexander sin Fibras de Rosenthal? .....	45
4.9 ¿Podría Alguien Tener Fibras de Rosenthal sin la Enfermedad de Alexander? .....	45
4.10 ¿Qué Tiene en Común la Enfermedad de Alexander con Otros Desórdenes Neurológicos?.....	46
 5. En Busca de Tratamientos	
5.1 Métodos Pasados .....	48
5.2 Ideas de Genética .....	48
5.2.1 $\alpha$ B – cristalina .....	48
5.2.2 Nrf2 .....	49
5.3 Pruebas de Candidatos Específicos de Medicamentos .....	49
5.4 Pruebas Imparciales de Medicamentos .....	51
5.5 Terapia anti-sentido .....	51
5.6 ¿Hay algún Rol para las Células Madre y Transplante de Células? .....	52
 6. Conclusiones	
6.1 Variabilidad – ¿Por qué es la Enfermedad Severa en Algunos, y Más leve en Otros? .....	54
6.1.1 Modificadores Ambientales .....	54
6.1.2 Modificadores Genéticos .....	55
6.2 ¿Podemos Curar la Enfermedad de Alexander? .....	55
 Otros Recursos y Organizaciones .....	57
Agradecimientos .....	58
Referencias .....	59
Apéndice 2021.....	80
Glosario .....	85
Biografía del Autor .....	89
Biografía de la traductora .....	90

## **Introducción**

La mayoría de los individuos o familias, al ser confrontados con la posibilidad de que ellos o algún miembro de la familia podrían tener la enfermedad de Alexander, están faltos de información confiable. Ellos (y en ocasiones sus médicos) nunca han escuchado de la condición. La proliferación de fuentes dudosas en el internet solo ha creado múltiples oportunidades para confusión. A esto se le añade la realidad de que las personas enfrentan la dificultad de digerir un vocabulario completamente nuevo que potencialmente lleva pronósticos atemorizantes acerca de su futuro.

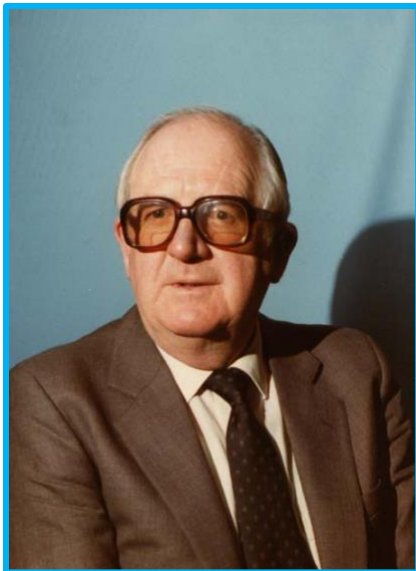
El propósito de este libro es ofrecer un repaso relativamente comprensivo de la enfermedad de Alexander, escrito para una audiencia general, que cubre orígenes históricos, el estado de conocimiento actual, y los prospectos de lo que está por venir. A través del libro, se incluyen referencias a literatura primaria para aquellos interesados en leer las fuentes originales. Ya que los tratamientos representan un área de interés evidente, una descripción de ambos, intentos pasados e investigaciones actuales en este tema son incluidas. Por ejemplo, varios tratamientos experimentales han sido reportados (o están bajo desarrollo) que intentan enfocarse en los mecanismos básicos de la enfermedad. Sin embargo, un área que no ha sido cubierta es el tratamiento “sintomático” – que se refiere a cómo los doctores trabajan con problemas específicos (como convulsiones, o vómitos, entre otros) usando terapias convencionales (incluyendo sonda gástrica para nutrición, anticonvulsivos para las convulsiones, entre otras intervenciones). Estrategias de tratamientos sintomáticos, por definición, son específicas para los síntomas y no para la enfermedad, así que no son únicos en cómo son utilizados para la enfermedad de Alexander.

## Capítulo 1 Historia y Conceptos Clásicos (La Era Pre-Genética)

### 1.1 EL PRIMER CASO Y LA HISTORIA TEMPRANA

En octubre del 1947, un niño de 15 meses de nacido llegó al Hospital de London en el Reino Unido con un historial de 8 meses de macrocefalia (cabeza agrandada) que se ponía peor progresivamente, y sin alcanzar etapas de desarrollo (como sentarse) que notaron empezar a los 8 meses de edad. Había comenzado a estar cada vez más irritable durante los meses más recientes, con vómitos y una convulsión (los últimos problemas posiblemente debido a la hidrocefalia y aumento en presión craneal). Casi inmediatamente desarrolló una fiebre, luego sufrió una serie de complicaciones, y murió tres semanas más tarde de una obstrucción del flujo de sangre a los pulmones. Se practicó una autopsia, y el cerebro fue preservado en un fijador para esperar más estudios.

Al poco tiempo después, bajo el consejo de Dorothy Russell (jefa de neuropatología en el Hospital de London y una de las líderes en neuropatología de su generación), un joven neuropatólogo llamado W. Stewart Alexander (**Figura 1**) fue asignado a investigar la patología en



el cerebro del niño. Alexander era un fisiatra de Nueva Zelanda quien recibió su grado de medicina en la Escuela de Medicina de Otago en el 1942. Luego de un entrenamiento inicial en patología y neuropatología, primero en Nueva Zelanda y luego en Toronto, recibió una subvención de la Fundación Rockefeller que le permitió pasar del 1942 al 1943 en Londres estudiando con Russell.

*Figura 1. W. Stewart Alexander (1919-2013).  
Fotografía cortesía del "Senior Medical Staff  
Archive" Hospital de Wellington (Nueva Zelanda):  
[https:// www.ccdhb.org.nz/about-us/history/well](https://www.ccdhb.org.nz/about-us/history/well)*

La descripción del caso según Alexander, reportada en la edición de septiembre del 1949 de la revista *Brain*, fue destacable en varios aspectos (Alexander, 1949). Proveyó una descripción exhaustiva, usando técnicas de microscopía de luz, del cambio dramático presente en el cerebro. Particularmente notable eran los "cuerpos" irregulares dentro de los procesos celulares de los astrocitos, especialmente prominente en la materia blanca y alrededor de vasos sanguíneos, en ambos el cerebro y la espina dorsal. A pesar de que Alexander no se refirió a estas estructuras peculiares por un nombre específico, neuropatólogos subsecuentes las reconocieron como fibras de Rosenthal. Dada la clasificación de esta enfermedad como leucodistrofia, es interesante que anomalías en la mielina fueran relativamente leves. Este reporte fijó un estándar para la descripción detallada y certera de la enfermedad que luego llevaría el nombre de Alexander.

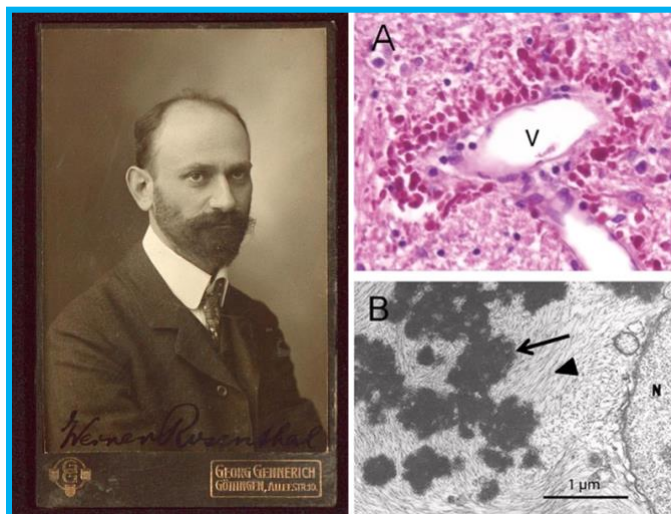


Para el final de los 1950, aparecieron cuatro reportes adicionales en la literatura médica describiendo pacientes con desarrollo temprano de síntomas neurológicos y los mismos rasgos distintivos luego de una examinación neuropatológica (por ejemplo, “depósitos” extensos y abundantes, junto a grados variados de cambios en la materia blanca) (Stevenson and Vogel, 1952; Crome, 1953; Wohlwill et al., 1959; Vogel and Hallervorden, 1962). Vogel (1962) identificó los “depósitos” característicos como fibras de Rosenthal. Comenzando con el reporte inicial de Alexander, los títulos de estos escritos utilizaron un conjunto creativo de terminología descriptiva pero compleja: degeneración fibrinoide de astrocitos (Alexander, 1949), megalocéfalo con panencefalopatía hialina (Crome, 1953), leucodistrofia dismielinogénica con megalocéfalo (Wohlwill et al., 1959). En el 1964, Reinhard Friede de la Universidad de Michigan reportó el sexto caso, y propuso que todos estos pacientes realmente tenían la misma enfermedad (Friede, 1964) – también recomendó nombrar la condición como quien la descubrió, Alexander.

Muchas páginas web continúan utilizando terminología antigua como sinónimos de la enfermedad de Alexander, pero esos términos no se han estado utilizando desde hace muchas décadas y su única utilidad actual es para leer literatura temprana.

## 1.2 ¿QUÉ SON LAS FIBRAS DE ROSENTHAL?

Como se mencionó anteriormente, el rasgo distintivo de la enfermedad de Alexander es la presencia de fibras de Rosenthal en el cuerpo de la célula (es decir, justo alrededor del núcleo) y procesos de astrocitos. Estas estructuras anormales fueron nombradas tras Werner Rosenthal (**Figura 2**), el neuropatólogo alemán quien primero las describió en el siglo 19 (¡a los 28 años de edad!) en un paciente con una malformación en la espina dorsal (Rosenthal, 1898). Son fácilmente reconocibles por neuropatólogos expertos por su apariencia y afinidad por ciertos tipos de tintes histológicos en secciones de tejido convencional vistos bajo un microscopio de luz. Al ser vistos a una magnificación aun mayor, por microscopía electrónica, contienen un centro que es oscuro e irregular, integrado a una matriz de filamentos intermedios de apariencia normal (**Figura 3**).



*Figura 2 (Panel izquierdo): Fotografía de Werner Rosenthal (1870-1942). Imagen de dominio público.*

*Figura 3 (Panel derecho): Fibras de Rosenthal según vistas por (A) microscopía de luz (estructuras globulares rojo brillante rodeando una vena [v]), y (B) microscopía electrónica (flechas). Figura reimpressa de (Messing et al., 2012), usada con permiso.*



La composición de las fibras de Rosenthal es compleja, y consiste en una mezcla de diferentes proteínas, incluyendo filamentos intermedios (como GFAP) y otras proteínas normalmente asociadas a los filamentos. Un corto listado de estos componentes se muestra abajo en la **Tabla 1** (presentado en orden alfabético y no en orden de abundancia).

<b>Tabla 1: Lista de componentes/proteínas de fibras de Rosenthal</b>		
PROTEÍNA	TIPO	REFERENCIA
$\alpha$ B-cristalina	Proteína de choque térmico, respuesta a estrés, regula el ensamblaje de filamentos intermedios	(Iwaki et al., 1989)
c-Jun	Factor de transcripción	(Tang et al., 2006)
ciclina D2	Controla la división celular	(Heaven et al., 2016)
GFAP	Filamento intermedio	(Johnson and Bettica, 1989)
Hsp27	Proteína de choque térmico, respuesta a estrés	(Perng et al., 2006)
p62	Podría regular la degradación y otras partes de la respuesta a estrés	(Zatloukal et al., 2002)
plectina	Regula el ensamblaje de filamentos intermedios	(Tian et al., 2006)
Proteosoma 20S	Vía de degradación celular	(Tang et al., 2010)
sinemina	Filamentos intermedios	(Pekny et al., 2014)
ubiquitina	Vía de degradación celular	(Lowe et al. 1988)
vimentina	Filamento intermedio	(Heaven et al., 2016)

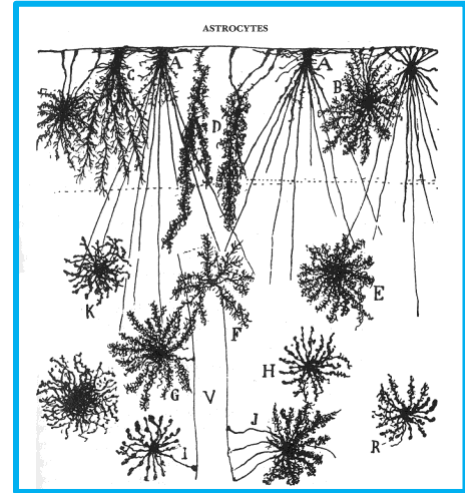
El laboratorio de Michael Brenner en la Universidad de Alabama-Birmingham recientemente intentó desarrollar un catálogo comprensivo de las proteínas contenidas en fibras de Rosenthal. Estos esfuerzos llevaron a la identificación de varios componentes nuevos, particularmente ciclina D2 (Heaven et al., 2012). Estos experimentos se complicaron por la dificultad de aislar fibras de Rosenthal libres de otros contaminantes celulares. Por otra parte, mientras las fibras de Rosenthal son la característica definitiva de la enfermedad de Alexander, es importante notar que tenemos poco conocimiento acerca de la importancia de su función (vea el capítulo 4 en Mecanismos de Enfermedad).

En adición, cabe señalar que las fibras de Rosenthal no son únicas a la enfermedad de Alexander, y se han visto esporádicamente en una variedad de condiciones como algunos tipos de tumores cerebrales (astrocitoma pilocítico), esclerosis múltiple, y otras enfermedades neurodegenerativas (Wippold et al. 2006). Un rasgo común en todos estos casos podría simplemente ser la respuesta reactiva de astrocitos, también conocida como “gliosis”, que acompaña casi todo tipo de lesión o enfermedad del sistema nervioso central. Uno de los rasgos cardinales de gliosis es el aumento en producción de GFAP en astrocitos, y una hipótesis para explicar la formación de fibras de Rosenthal es que existe un límite tóxico sobre el cual las células

no son capaces de manejar el exceso de proteína, lo que lleva a los agregados (Messing et al., 2012a).

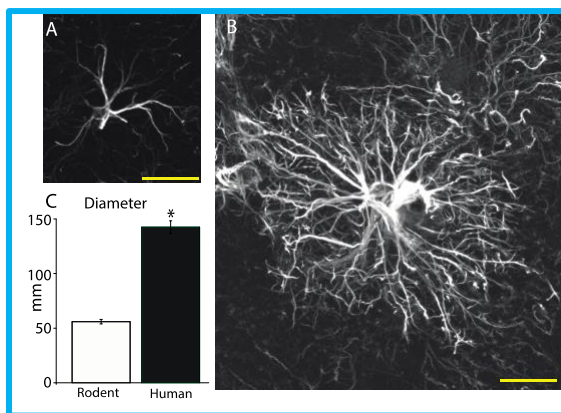
### 1.3 ¿QUÉ SON LOS ASTROCITOS?

Los astrocitos son uno de los cuatro tipos principales de células en el sistema nervioso central (es decir, cerebro y espina dorsal) de animales vertebrados. Existen junto a neuronas, oligodendrocitos (los cuales forman mielina), y microglía (los cuales son similares, pero no idénticos a los macrófagos). Los astrocitos fueron definidos por primera vez por histólogos clásicos a finales del siglo 19 y principios del siglo 20 basados en su afinidad por ciertos tintes y forma celular distintiva, con extensiones “como estrellas” (también llamadas procesos) que a menudo irradian desde un cuerpo celular central (donde reside el núcleo), y por tanto el origen de su nombre (usado por primera vez por Mihály Lenhossék, un anatomista húngaro, en el 1985). Los primeros anatomistas atribuyeron funciones estructurales simples a los astrocitos, considerándolos como andamiaje inerte que actúa como pega y mantiene a los tejidos unidos.



*Figura 4: Dibujos tempranos de diferentes tipos de astrocitos en el cerebro humano. Imagen reimpressa de (Cajal 1909).*

Sin embargo, los últimos veinte años han presenciado una explosión de conocimiento nuevo, y los astrocitos ahora son considerados como células dinámicas que activamente regulan muchos aspectos del funcionamiento del sistema nervioso. Incluso sus rasgos estructurales son mucho más complejos de lo imaginado originalmente, con un solo astrocito haciendo contacto con posiblemente miles o incluso millones de sinapsis entre neuronas para comunicación (Oberheim et al., 2009). Durante el 2016 solamente, surgieron sobre 3100 publicaciones acerca de astrocitos, y revisiones profundas aparecieron regularmente en la literatura (Vasile, et al., 2017). Los astrocitos humanos son mucho más grandes que los de roedores, con formas más complicadas, lo cual podría contribuir al aumento marcado en capacidad cognitiva visto en primates superiores comparado con otras especies de animales (**Figura 5**).



*Figura 5: Los astrocitos humanos son más grandes y tienen más ramas de procesos que los astrocitos de ratones. (A) ratón; (B) humano. Figura reimpressa de (Oberheim et al., 2009), con permiso de la Sociedad de Neurociencia. Las barras amarillas representan la escala, cada una 20 micrones de largo.*

Hay un debate persistente acerca de cómo mejor definir un astrocito, y progresivamente hemos ido reconociendo que los astrocitos no son una sola población de células, sino que exhiben una diversidad considerable, pero las consecuencias de esto no son claras (Ben Haim and Rowitch, 2017). La mayoría, pero no todos los astrocitos contienen GFAP<sup>1</sup>, la proteína que, cuando es alterada por cambios en sus genes, causa la enfermedad de Alexander. Un listado corto de funciones de astrocitos se muestra en la **Tabla 2**, con solo algunas publicaciones claves ofrecidas como referencias. Podemos esperar adiciones periódicas a esta tabla mientras se descubren propiedades nuevas de estas células versátiles.

*<sup>1</sup>El gen también es llamado GFAP, el cual va en itálica cuando se refiere a la forma humana. El nombre completo de la proteína es proteína ácida fibrilar de la glía.*

Desde muy temprano en la historia de la neurociencia, se entendía que los astrocitos cambiaban dramáticamente en respuesta a una lesión o enfermedad. Esta respuesta es generalmente conocida por los términos “gliosis” o “astrogliosis”, o a veces simplemente como “astrocitos reactivos”. Por mucho tiempo estos astrocitos reactivos se veían como un detrimento para la recuperación, creando una cicatriz glial (análoga a una cicatriz fibrosa en la piel u otras partes del cuerpo) que forma una barrera mecánica y actúa como un obstáculo para la recuperación. Sin embargo, ahora hay evidencia considerable de que la respuesta de astrocitos combina aspectos tanto beneficiosos como dañinos, envuelve interacciones complejas con otras células como microglía, y probablemente varía de condición a condición (Sofroniew and Vinters, 2010; Anderson et al., 2016; Liddelow and Barres, 2017). Estas preguntas están recibiendo un interés intenso de la comunidad científica. La naturaleza de astrocitos reactivos tendrá un rol importante en nuestro entendimiento de los mecanismos subyacentes de la enfermedad de Alexander, discutidos en más detalles en el Capítulo 4 (Mecanismos de Enfermedad).

<b>Tabla 2: Lista corta de funciones de astrocitos durante el desarrollo y en adultos normales.</b>	
<b>DESARROLLO</b>	
Promueve la formación de sinapsis	(Christopherson et al., 2005)
Actúa como células madre	(Steindler and Laywell, 2003) (Doetsch et al., 1999)
Promueve mielinización	(Camargo et al., 2017) (Ishibashi et al., 2006)
Induce la formación de la barrera hematoencefálica	(Abbott, 2002)
<b>ADULTO NORMAL</b>	
Controla alimentación	Chen et al., 2016) (Garcia-Cáceres et al., 2016)
Controla el ritmo respiratorio	(Gourine et al., 2010)
Apoyo metabólico para neuronas	(Suzuki et al., 2011)
Mantiene el número sináptico	(Chung et al., 2013)
Regula niveles de glutamato	(Coulter and Eid, 2012)
Regula niveles de potasio	(Wang et al., 2012)
Modula el sueño	(Haydon, 2017)
Controla el flujo de sangre	(MacVicar and Newman, 2015) (McConnell et al., 2017)
Modula función sináptica	(Araque et al., 1999)

#### 1.4 ESPECTRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER ALREDEDOR DEL 2001

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Alexander son bastante diversas, reflejando la variabilidad en qué partes del cerebro y espina dorsal son más afectadas. A pesar de que los primeros seis casos reportados en la literatura eran todos niños (descritos anteriormente), la identificación de fibras de Rosenthal como característica clave de diagnóstico rápidamente llevó a la realización de que existían pacientes con un inicio tardío de síntomas, incluso en la adultez. En el 1968, Seil et al. reportaron un paciente cuyo primer síntoma obvio fue parálisis temporera en un brazo, a la edad de 32 años. Él experimentó un deterioro progresivo a través de un periodo de 15 años, con problemas que involucraban la visión, habilidad para caminar, y dolor, y murió a la edad de 47 años. En el 1976, Russo et al. propusieron un sistema de clasificación que todavía es usado frecuentemente, basado estrictamente en la edad de inicio, y agruparon los pacientes quienes habían sido publicados hasta entonces como “infantil” (0-2 años), “juvenil” (7-14 años), y “adulto” (>19 años) (Russo et al., 1976). Más reciente, Springer (2000) propuso una forma “neonatal” (inicio durante los primeros meses, y progresión rápida), aunque no es claro si realmente es fundamentalmente diferente a la forma infantil.

En general, los problemas asociados al inicio infantil incluyen convulsiones, retrasos de desarrollo de etapas motoras y cognitivas, espasticidad, dificultad en alimentación o vómitos, o generalmente “fallo en desarrollarse”. A menudo estos niños tienen cabeza agrandada

(macrocefalia), la cual puede ser reflejo de cerebro agrandado (megaloencefalia) pero también posiblemente dilatación del sistema ventricular (hidrocefalia). Algunos problemas podrían ser secundarios a presión intracraneal elevada, cuyas causas subyacentes no están claras, pero a veces se atribuye a obstrucción del sistema ventricular.

Los problemas asociados con en inicio juvenil nuevamente incluyen problemas con tragar (disfagia), el habla (disartria), vómitos, y espasticidad. En adición, estos pacientes a menudo tienen cambios en la calidad de su voz (disfonía), como ronquera, y dificultades con caminar y coordinación (ataxia), al igual que curvatura de la espina (cifosis cuando es hacia el frente, escoliosis cuando es de lado, y cifo escoliosis cuando es combinada). Los problemas con tragar y vómitos a veces son tan severos que estos niños desafortunadamente son diagnosticados erróneamente con anorexia nervosa o sus síntomas son atribuidos a otras causas psiquiátricas (Goebel et al., 1981; Franzoni et al., 2006; Sreedharan et al., 2007; Niinikoski et al., 2009; Van Poppel et al., 2009). Como un fisiatra una vez contó:

“Recuerdo mi primer paciente de Alexander de los días pre-genética. Ella había sido tratada erróneamente para *anorexia mentalis*, y su psicólogo no se dio cuenta de que tenía dificultades neurológicas al tragar. Nunca olvidaré esa pobre niña y su gratitud al realizar un diagnóstico somático y detener el maltrato psicológico.”

Pacientes con inicio en la adultez, en adición a muchos de los problemas descritos anteriormente, reportan síntomas relacionados a la disfunción de su sistema nervioso autónomo, el cual controla muchos aspectos de nuestras vidas que no están bajo control voluntario (de ahí el nombre de esta parte del sistema nervioso). Estos problemas incluyen dificultad controlando la presión sanguínea, temperatura corporal (ambas alta y baja), estreñimiento, al igual que retención o incontinencia de orina. En general, la macrocefalia es raramente vista en el inicio de la enfermedad de Alexander en la adultez (para este tiempo el cráneo se ha endurecido y no expande fácilmente), y convulsiones son menos común que en pacientes con inicio temprano (ver **Tabla 3**). Por lo contrario, la mioclonía palatina se reportó en un tercio de los pacientes con inicio en la adultez (Balbi et al., 2010), pero no ha sido reportado en inicio temprano. En general, los síntomas experimentados por pacientes con inicio en la adultez son no-específicos o fácilmente confundidos con esos causados por otros desórdenes neurológicos mucho más comunes, como esclerosis múltiple o la enfermedad de Parkinson.

El entendimiento evolutivo de la enfermedad de Alexander y experiencias con más pacientes ha llevado a nuevos sistemas de clasificación, con implicaciones importantes para la vida. Estos son descritos en más detalles en el Capítulo 3, sección 3.1.

TABLA 3: Prevalencia de ciertos tipos de síntomas en pacientes con inicio infantil vs. Adulto – resultados de dos estudios.			
	(Brenner et al., 2009)		(Balbi et al., 2010)
	Infantil	Adulto	Adulto
Total en el grupo	79	12	56
Macrocefalia	52	0	1
Convulsiones	60	0	9
Mioclónía palatina	No hay data	No hay data	19

### 1.5 CRITERIA DE DIAGNÓSTICO CON RESONANCIA MAGNÉTICA

En el 2001, Marjo van der Knaap (**Figura 6**) (Hospital de la Universidad, Amsterdam) y James Powers (Universidad de Rochester) reportaron un estudio clave de tres pacientes quienes tenían un diagnóstico probado por autopsia (dos en la categoría infantil, y uno en la juvenil), comparando los hallazgos radiológicos con la neuropatología, y propusieron un conjunto de cinco criterios de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) que podrían considerarse como diagnóstico para la enfermedad de Alexander (van der Knaap et al., 2001). Citando el abstracto de la publicación, estos incluyen:



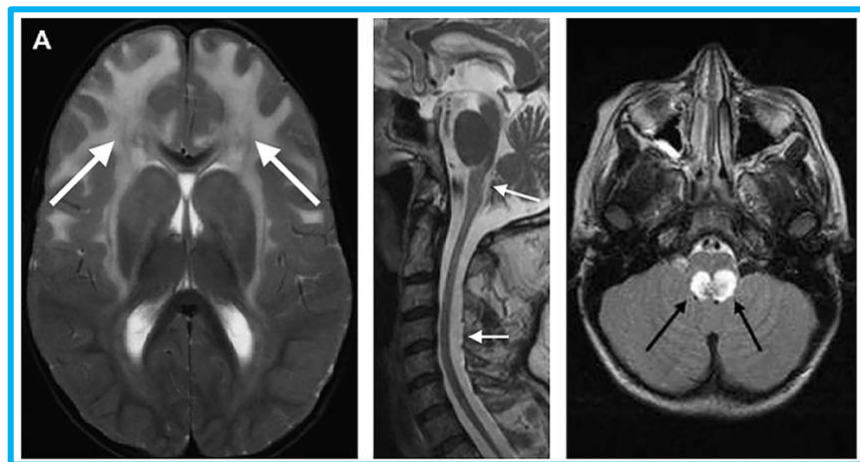
*Figure 6. Marjo van der Knaap, 2005.*

1. “cambios extensivos de materia blanca cerebral, con predominancia frontal”
2. “aro periventricular con alta señal en imágenes ponderadas en T1 y baja señal en imágenes ponderadas en T2”
3. “anormalidades de los ganglios basales y tálamo”
4. “anormalidades de tronco encefálico”
5. “intensificación de contraste de estructuras particulares de materia gris y blanca”

Si cuatro de esos cinco criterios eran encontrados en un individuo, sería considerado como diagnóstico de la enfermedad de Alexander. Note que estos criterios fueron definidos antes del descubrimiento de *GFAP* como gen causante, y el surgimiento de análisis de ADN como herramienta diagnóstica. En la práctica actual los resultados de MRI proveen un diagnóstico preliminar, el cual luego se confirma con exámenes genéticos (vea más adelante para más información acerca de genética).

Desde la descripción de estos rasgos “clásicos”, otros tipos de anomalías en el MRI han sido reportados para la enfermedad de Alexander. Especialmente prominente en formas de inicio de la enfermedad en la adultez es la atrofia (es decir, encogimiento) de la médula, (parte del tronco encefálico) y espina dorsal cervical (en la región del cuello) (van der Knaap et al., 2006; Pareyson et al., 2008). Otro rasgo inusual, designado “guirnaldas ventriculares”, fue reportado en cuatro pacientes con inicio juvenil (van der Knaap et al., 2006), pero esto no ha sido reportado en más pacientes. En algunos casos, las anomalías en el MRI son muy restringidas y “focales” (Probst et al., 2003), lo cual en ocasiones ha llevado a ser confundido con un diagnóstico alternativo de tumores, como gliomas de tronco encefálico o quiasma óptico (Duckett et al., 1992; Mignot et al., 2009; Van Poppel et al., 2009; Tava-soli et al., 2017). Algunos pacientes incluso han estado sujetos a terapias para tumores, como radiación y quimioterapias, antes de haber determinado un diagnóstico de la enfermedad de Alexander (Li et al., 2005). Directrices específicas para cuándo se deben realizar pruebas de GFAP en pacientes con patrones de MRI “atípicos” o no-clásicos no han sido desarrolladas (van der Knaap et al., 2005; van der Knaap et al., 2006; Farina et al., 2008).

Ejemplos de MRI que muestran deficiencias en la materia blanca comunes en pacientes Tipo 1, o el encogimiento del tronco encefálico o anomalías focales en el tronco encefálico comunes en los pacientes Tipo 2 (usando el sistema de clasificación creado por Prust et al., 2011 – vea adelante en la Sección 3.1), se muestran en la **Figura 7**.



*Figura 7. (Izquierda) Anormalidades de materia blanca frontal (flechas) en un paciente Tipo I típico. (Centro) Encogimiento del tronco encefálico y medula espinal cervical en un paciente Tipo II. (Derecha) Señal de anomalía focal (flechas) en un paciente Tipo II. La figura a la izquierda es reimpresión de (Yang y Prabhu, 2014), con permiso de Elsevier. La figura central es reimpresión de (Pareyson et al., 2008), con permiso de Oxford University Press. La figura a la derecha es reimpresión de (Van Poppel et al, 2009) con permiso de John Wiley e hijos. (las flechas fueron añadidas)*



## 1.6 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

La enfermedad de Alexander es extremadamente rara, pero nadie sabe exactamente cuán rara es. No hay tendencia a un género, o predilección para algún grupo étnico. Números mundiales altamente citados de “500” o “550” se encuentran en Wikipedia u otras páginas web, pero se debe destacar que estos no están basados en datos que se hayan colectado o analizado de manera sistemática. Se desconoce el número total de pacientes de Alexander en el mundo.

Solo se ha realizado un intento de definir el número total de pacientes en una población en un momento determinado (“prevalencia”), por un grupo en Japón que encuestó a casi todas las clínicas pediátricas y de neurología en el país, preguntándoles si habían visto algún paciente de Alexander en un periodo de 5 años (Yoshida et al., 2011a). Luego de corregir por pacientes que habían visitado más de una clínica, y contar como uno a gemelos u otros miembros de familias en las cuales la enfermedad fue pasada a través de múltiples generaciones (un método cuestionable entre epidemiólogos), llegaron a un total de 35. Corrigiendo por la tasa de respuesta de la encuesta de 74%, estimaron un total de 47 casos de la enfermedad de Alexander, y ya que la población total del país entero se estima a 128 millones, la prevalencia calculada es de 1 en 2.7 millones. Por razones que no fueron especificadas, estos investigadores excluyeron pacientes con forma “neonatal,” así que ciertamente la prevalencia es un poco más alta que la figura dada. Es interesante que aproximadamente la mitad de estos 35 casos eran de comienzo en la adultez, contradiciendo la noción que la enfermedad de Alexander es principalmente una condición pediátrica.

Solo existen otros dos estudios relacionados a las características de la población, aunque en vez de incluir casos de todas las edades en sus cálculos, intentaron determinar la frecuencia al nacer (es decir, prevalencia entre nacimientos vivos). Esta diferencia que aparenta ser insignificante se vuelve importante cuando se trata de una enfermedad que puede causar muerte temprana, porque niños severamente afectados van a nacer (y ser capturados por un método) pero no sobrevivir mucho tiempo (y por tanto se perderían en el otro método). Sorprendentemente, todos los estudios muestran números similares.

En un estudio, Heim et al. (1997) tabularon todos los pacientes de leucodistrofias vistos alrededor de un grupo definido de países de Europa en el 1994, y de 556 pacientes identificaron a 9 pacientes de Alexander. Sin embargo, no se proveyó suficiente detalle acerca de los individuos con un diagnóstico de Alexander para permitir un cálculo acerca de su prevalencia en la población o por nacimientos vivos.

En un segundo estudio, Barczykowski et al. (2012) examinaron certificados de defunción en once estados de los Estados Unidos en los cuales leyes de registros abiertos permitían dichos análisis (California, Connecticut, Kentucky, Massachusetts, Michigan, Minnesota, Montana, Carolina del Norte, Ohio, Vermont, y Washington). Los certificados de defunción utilizan un sistema de codificación para indicar la causa de muerte, y al buscar esos certificados con el código E75.2 (no específico para Alexander, pero a menudo incluyéndolo), los autores reportaron una

prevalencia de nacimientos de la enfermedad de Alexander infantil en 1 de cada 1.3 millones de nacimientos.

## **Capítulo 2**

### **Genética de la Enfermedad de Alexander**

La enfermedad de Alexander, en casi todos los pacientes, es causada por pequeños cambios en el gen que codifica para la proteína conocida como GFAP. Sin embargo, tomó mucho tiempo llegar a este descubrimiento, y el mismo solo ocurrió gracias al resultado fortuito de un experimento involucrando ratones genéticamente diseñados a mediados de los 1990 por el autor (en la Universidad de Wisconsin-Madison) y Michael Brenner (inicialmente en los Institutos Nacionales de Salud y luego en la Universidad de Alabama-Birmingham). La historia de este descubrimiento se resume aquí, seguida de un repaso general del estado actual del conocimiento acerca de la genética de la enfermedad de Alexander.

A pesar de que desde temprano se especulaba que la enfermedad de Alexander era de origen genético, era muy infrecuente como para realizar un mapeo genético utilizando métodos convencionales, y pocos genes candidatos se habían sugerido para estudios. De estos, el gen codificante de  $\alpha$ B-cristalina, descubierto como un principal y sorprendente componente de las fibras de Rosenthal por James Goldman (Universidad de Columbia) (Iwaki et al., 1989), fue secuenciado en dos pacientes, pero se encontró que era normal (Iwaki et al., 1992). En un artículo de revisión publicado en el 1988. Becker y Texeira (1988) sugirieron GFAP, también componente de las fibras de Rosenthal, como un gen candidato, pero aparentemente nunca se le dio seguimiento a esta idea.

#### **2.1 DESCUBRIMIENTO INICIAL DE GFAP Y SU IMPACTO EN NEUROCIENCIA Y NEUROLOGÍA**

GFAP (una abreviación en inglés para Proteína Ácida Fibrilar Glial) fue descubierta originalmente por Lawrence Eng, un joven neuroquímico que trabajaba en el laboratorio de Bruno Gerstl en Stanford. Eng había recibido el reto de aislar proteínas de tejidos de pacientes con esclerosis múltiple. Investigaciones anteriores en esclerosis múltiples se habían enfocado en lípidos (substancias grasas), ya que la condición era vista principalmente como un desorden de mielina (membrana rica en lípidos que envuelve a los axones de diámetro grande y facilita la conducción de impulsos eléctricos a través del sistema nervioso). Sin embargo, Eng quería estudiar proteínas, particularmente en las áreas endurecidas del cerebro y la médula espinal llamadas “placas” (de donde se deriva el término “esclerosis”), y esto requería la invención de nuevos métodos de aislamiento y purificación de proteínas. El resultado, primero publicado en una conferencia de la Sociedad Internacional de Neuroquímica en Milán, Italia, en 1969, fue la identificación de una proteína ácida de aproximadamente 50 kDa en peso molecular, como un principal componente de estas placas (Eng et al., 1971 (**Figuras 8 y 9**)).

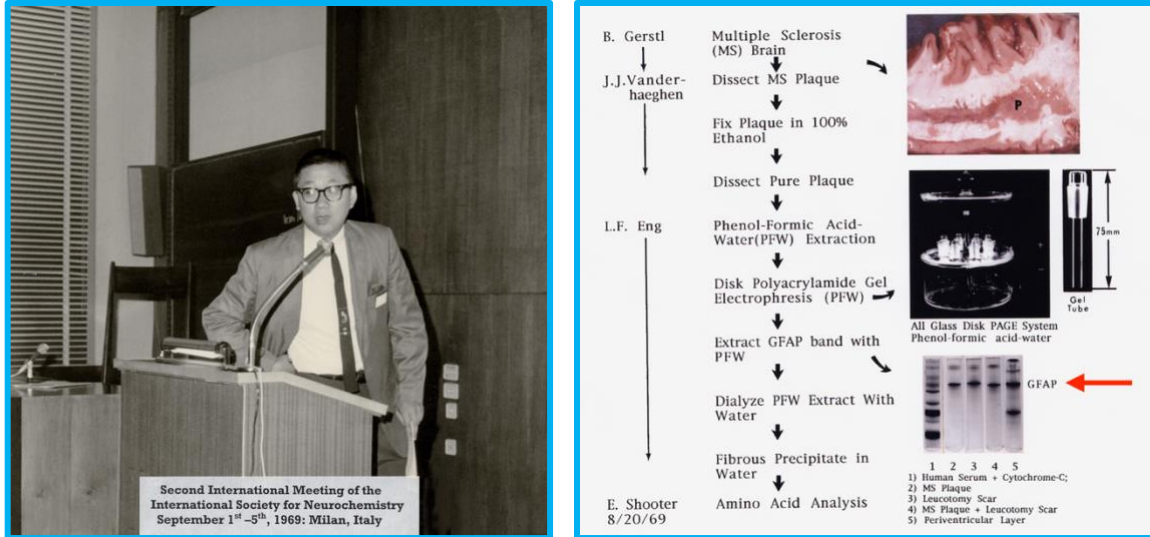
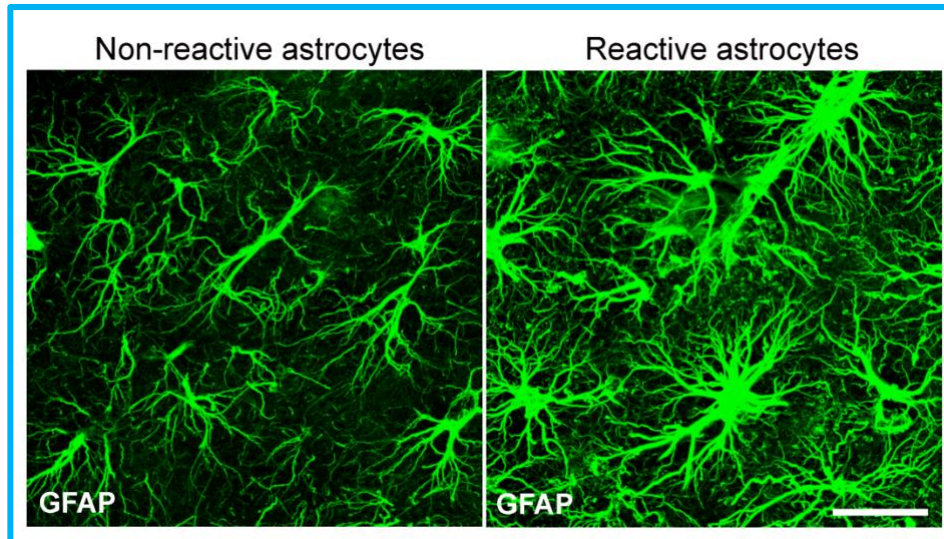


Figura 8: (Panel izquierdo): Fotografía de Lawrence Eng en la conferencia de la Sociedad Internacional de Neuroquímica en Milán, Italia en el 1969.

Figura 9: (Panel derecho): El esquema de purificación de Eng para aislar proteínas de tejidos cerebrales de pacientes de esclerosis múltiple, llevando a la identificación de GFAP (flecha roja, abajo a la derecha). Figura reimpressa de (Eng et al., 2000), con permiso de SpringNature.

El término “GFAP” fue utilizado por primera vez en un manuscrito publicado por Uyeda y colegas en el 1972 (Uyeda et al., 1972). Esfuerzos subsecuentes para desarrollar anticuerpos reactivos específicos para GFAP llevó al descubrimiento de que esta proteína no estaba presente solo en placas de esclerosis múltiple, sino que bajo circunstancias normales también era un marcador selectivo de astrocitos. La simplicidad de métodos de tinción utilizando anticuerpos (especialmente comparados con métodos más antiguos del siglo 19) llevó a la adopción de inmunotinción de GFAP como manera de identificar astrocitos en tejidos. GFAP se convirtió en nombre doméstico en neurociencia clínica y básica, sin ningún entendimiento de su función. La historia inicial de GFAP, desde su descubrimiento a finales de los 1960 hasta su conexión con la enfermedad de Alexander, está hermosamente descrita en un repaso por Eng (2000).

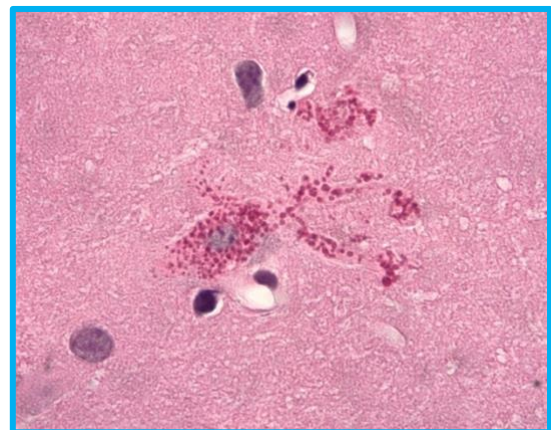
Interés adicional en GFAP surgió de literatura antigua en astrocitos y su reacción a lesiones, llamado “gliosis” (descrito arriba). A menudo culpados por la falla general de regeneración axonal en el sistema nervioso central, las llamadas “cicatrices gliales” fueron el objeto de muchas investigaciones. El aislamiento de GFAP, y el desarrollo de métodos para medir sus niveles, llevó al descubrimiento de que GFAP estaba notablemente elevado en astrocitos reactivos, y a la insinuación de que el aumento en GFAP impulsa el notable engrandecimiento de astrocitos que también estaba presente en gliosis (**Figura 10**). Comenzando en los 1980, había esfuerzos en marcha para examinar si prevenir este aumento en GFAP reduciría la gliosis y las cicatrices gliales, y de alguna forma aumentaría las posibilidades de regeneración luego de una lesión.



*Figure 10: Astrocitos visualizados por tinción para GFAP, en cerebros normales (izquierda) y lesionados (derecha) de ratones experimentales. Figura reimpressa de (Wilhelmsson et al., 2006). Derechos de autor (2006) Academia Nacional de las Ciencias, E.U. Utilizada con permiso.*

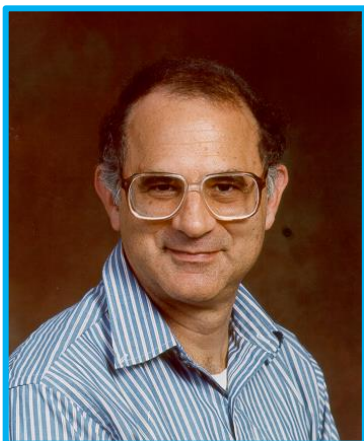
## 2.2 CONEXIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER

La primera clave de la base genética de la enfermedad de Alexander surgió de estudios iniciados por los laboratorios de Brenner y Messing para entender el significado de la elevación de GFAP en gliosis. ¿Era un cambio en niveles de GFAP todo lo que se necesitaba para comenzar la cascada de eventos en el astrocito que llevaban al estado que los neuropatólogos reconocían como “reactivo” o “gliosis”? Utilizando métodos de ingeniería genética en ratones, desarrollados en los 1980, estos investigadores crearon líneas de ratones que llevaban una copia adicional del gen GFAP humano (con una secuencia de ADN normal). Estos ratones en efecto produjeron unos niveles de GFAP anormalmente altos. Sin embargo, para la sorpresa de todos, sus astrocitos no solo eran más grandes, como se esperaba, sino que también formaron agregados de proteína indistinguibles de las fibras de Rosenthal (**Figura 11**). Los ratones con los niveles más altos de GFAP, y la mayor cantidad de fibras de Rosenthal, murieron a las dos o tres semanas de nacidos (Messing et al., 1998). Claramente se había descubierto un mecanismo para explicar la formación de fibras de Rosenthal, y era letal.

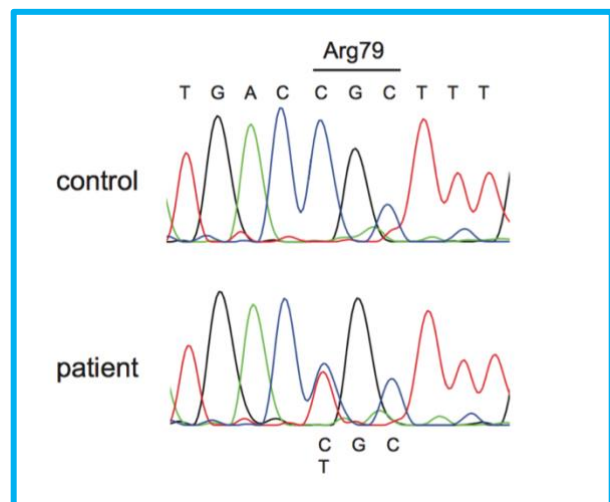


*FIGURA 11: Fibras de Rosenthal (manchas rojo brillante) en el cuerpo celular y procesos de un astrocito de un ratón transgénico diseñado para producir altos niveles de GFAP humano. Las estructuras circulares*

Impulsado por la realización de que alteraciones en GFAP (en la forma de copias adicionales) podrían provocar una enfermedad fatal en ratones y la característica neuropatológica distintiva de la enfermedad de Alexander (fibras de Rosenthal), Brenner (**Figura 12**) y Messing comenzaron a probar a GFAP como gen candidato para esta enfermedad. Con un grupo internacional de colaboradores, incluyendo a Anne Johnson (Albert Einstein College of Medicine), James Goldman (Columbia University), Odile Boespflug-Tanguy (INSERM), y Diana Rodriguez (Hôpital Saint Vincent de Paul), quienes habían guardado muestras de tejido a través de varios años en anticipación de algún estudio, colectaron un total de 13 pacientes con un diagnóstico de la enfermedad de Alexander confirmado con autopsia o biopsia. La restricción a pacientes con patología confirmada pretendía evitar casos de falsos diagnósticos, los cuales hubieran interferido con el análisis genético. La intención original era examinar duplicaciones genéticas (lo cual hubiera sido análogo al experimento original en ratones, donde copias de GFAP humano normal fueron añadidas al genoma de ratón) al igual que alteraciones más sutiles a la secuencia. Ya que los métodos para secuenciar eran más confiables, este fue el primer método en utilizarse. Notablemente, 12 de 13 muestras analizadas mostraron cambios en un único par de bases en la región codificante de GFAP, prediciendo cambios en un aminoácido por cada uno (Brenner et al. 2001) (un ejemplo mostrado en **Figura 13**). Todos estos doce estaban en el estado heterocigoto, lo que significa que solo una de las dos copias del gen tenía el cambio. Para siete de estos pacientes, ambos padres estuvieron disponible para proveer muestras, y en todos estos “tríos” (dos padres, un niño) los padres eran negativo, así demostrando que estas variantes en la secuencia de GFAP eran nuevas (“*de novo*”) en vez de ser heredada de los padres. La naturaleza *de novo* de las variantes fortaleció considerablemente el argumento de que estas variantes eran responsables de la enfermedad, ya que la probabilidad estadística de que estuviera presente al azar era infinitesimalmente baja.



**FIGURA 12:** Michael Brenner, 2000.



**FIGURA 13:** Uno de los cromatogramas de ADN originales que identificó variantes heterocigóticas en la secuencia de ADN del gen de GFAP en un paciente con la enfermedad de Alexander. Los perfiles están codificados por color, con rojo= Y, negro= G, verde= A, y azul = C. La figura de arriba muestra la secuencia de referencia, con un triplete normal de CGC que codifica el aminoácido arginina en la posición 79. La figura de abajo muestra los resultados del paciente, cuya secuencia muestra dos nucleótidos diferentes al principio del codón, C y T, reflejando la presencia de dos versiones diferentes del gen (una normal y una alterada). El cambio en este codón de CGC a TGC altera el aminoácido codificado de arginina a cisteína. Figura adaptada de (Brenner et al., 2001), con permiso de Nature Publishing Group.



Los resultados de este primer grupo fueron tan sorprendentes que pruebas de GFAP se movieron rápidamente a las clínicas y se volvieron el estándar de cuidado para diagnóstico de la enfermedad de Alexander. Poco después, un número de publicaciones aparecieron de Francia, Japón, y otros países documentando resultados similares en su propia población de pacientes (Rodríguez et al., 2001; Gorospe et al., 2002; Meins et al., 2002; Namekawa et al., 2002). Para el 2005, era bastante claro que las variantes de GFAP eran responsables de todas las formas de la enfermedad de Alexander (infantil, juvenil, en la adultez), y casi todos los pacientes (sobre 90%) (Li et al., 2005). Incluso el primer paciente con inicio en la adultez descrito por Seil et al. (1968), fue eventualmente rastreado a través de generaciones subsecuentes a una variante de GFAP causante de la enfermedad (Messing et al., 2012b).

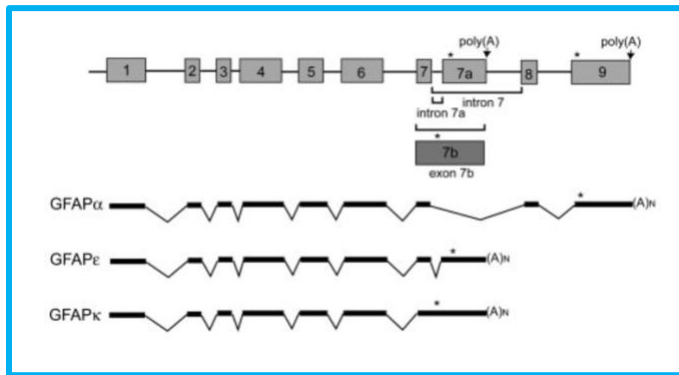
### 2.3 RESUMEN DE GENÉTICA ACTUAL

Nota – esta sección utiliza términos que son de naturaleza relativamente técnica. Para un buen repaso de genética básica por favor hacer referencia a recursos en línea provistos por el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (Parte de los institutos Nacionales de Salud), disponibles en la siguiente página web: (<https://www.genome.gov/es/about-genomics/factsheets/Guias-informativas-sobre-ciencia-investigacion-etica-y-el-instituto>)

El gen que codifica para GFAP (también conocido como *GFAP*, pero en itálicas de acuerdo con las reglas de la nomenclatura genética) reside en el brazo largo del cromosoma 17 (Brenner, 1994). Por lo tanto, cada persona carga con dos copias del gen, uno derivado del padre a través de la esperma, y el otro de la madre a través del óvulo. Excluyendo las regiones regulatorias secuencia arriba (las cuales controlan niveles de expresión del gen pero no la secuencia de amino ácidos), el gen *GFAP* humano tiene un largo de 9869 pares de bases, e incluye 9 exones (que contienen el código de amino ácido – 3 pares de bases por cada uno) separados por 8 intrones (o secuencias “intervinientes”). “Transcripción” es el proceso a través del cual una célula lee la secuencia de ADN y sintetiza una plantilla de ARN mensajero, del cual los intrones son removidos antes de exportar el ARN mensajero fuera del núcleo y dentro del citoplasma, donde la “traducción” hacia la proteína ocurre.

El gen *GFAP* es leído de diferentes maneras, sin embargo, resultando en más de una forma de ARN mensajero y por consiguiente proteína (también conocido como “isoformas”). La forma principal se conoce como GFAP- $\alpha$ , la cual representa el 90% del GFAP (Perng et al., 2008), y es sintetizado por el ARN mensajero que corresponde a los 9 exones descritos anteriormente. Sin embargo, variaciones en el ARN mensajero sí ocurren, reflejando cambios ligeros en la manera en la cual los intrones son removidos. El proceso a través del cual los intrones son removidos y los exones son unidos para formar en ARN mensajero se llama empalme. El empalme alternativo cerca del intrón 7 a veces permite la incorporación de un exón alterno, “7a”, que en caso de GFAP-alfa es típicamente cortado fuera y no utilizado para traducción a proteína. Un diagrama de la estructura del gen *GFAP* con indicaciones de los eventos de empalme alternativo que lleva a las isoformas diferentes es mostrado en la **Figura 14**. Solo existe evidencia convincente de que ocurre traducción de los ARN mensajeros alternos en dos isoformas, llamadas GFAP- $\delta$  and GFAP- $\kappa$  (Condorelli et al., 1999; Blechinger et al., 2007). Las tres versiones de la proteína ( $\alpha$ ,  $\delta$ , and

κ) son idénticas en las posiciones 1-390 de sus secuencias de aminoácidos, y solo comienzan a divergir luego de la posición 390. Las funciones de estas isoformas menores no son conocidas, aunque la porción única de GFAP- δ es mucho menos conservada a través de la evolución que la secuencia GFAP- α, lo cual lleva a especular que GFAP- δ ha adquirido una nueva función en primates mayores (Singh et al., 2003). No existe evidencia clara para variantes que causan enfermedades en las regiones de la proteína únicas para GFAP-δ and GFAP-κ, y parece ser que solo cambios en GFAP- α llevan a la enfermedad de Alexander. Por supuesto, variantes en las posiciones 1-390 serían comunes para todas estas isoformas de la proteína. [Ver apéndice para actualización respecto a delta].



*Figura 14: Diagrama de la estructura del gen GFAP junto a eventos de empalme alternativo en el ARN mensajero que lleva a diferentes isoformas. Figura reimpressa de (Blechingberg et al., 2007), con permiso de John Wiley and Sons, Inc. La isoforma rotulada como épsilon a veces se conoce como delta.*

El GFAP humano es de un largo de 432 aminoácidos (para la isoforma predominante GFAP-α). De estos, variantes patogénicas (causantes de enfermedad) se han reportado para 88 aminoácidos, causados por 141 cambios diferentes a nivel de ADN. La cuenta actual para el número de diferentes variantes patogénicas que son conocidas para el autor se muestra en la **Tabla 4**. Una lista completa de mutaciones publicadas está accesible en la página web del Waisman Center en la Universidad de Wisconsin-Madison:

([www.waisman.wisc.edu/alexander/mutation.pdf](http://www.waisman.wisc.edu/alexander/mutation.pdf)).

Por conveniencia, abajo se muestra una tabla (**Tabla 5**) que contiene las abreviaciones más comunes de diferentes aminoácidos. La nomenclatura típica consiste en un número en el medio que se refiere a la posición dentro de la secuencia, con el aminoácido normal antes del número y la variante de aminoácido (si presente) después del número [como ejemplo, Arg416Trp, también designada R416W, se refiere a la arginina en la posición 416 convertida en triptófano].

La mayoría de las variantes consisten en un cambio en un par de bases solamente, o “mutación puntual”, que predice el cambio de solo un aminoácido en la secuencia. Por lo tanto, también se les llama “mutación sin sentido”. Una cantidad más pequeña son inserciones y deleciones complejas, en múltiplos de 3 pares de bases, lo cual resulta en inserciones o deleciones cortas de un número pequeño de aminoácidos en una secuencia que de lo contrario sería normal. Una variante convirtió el código en la posición del aminoácido 312, un glutamato, a una señal de pare, lo que resultaría en una proteína sin los últimos 20 aminoácidos de la secuencia completa (Nam et al., 2015). Es importante notar que todas estas alteraciones son detectadas como cambios en la secuencia de ADN, pero son interpretadas como cambios reflejados en la proteína. Sin embargo, hasta la fecha, la detección de la proteína mutante solo



se ha logrado para la variante Arg416Trp (Perng et al., 2006), para la cual el laboratorio de Brenner creó anticuerpos que distinguen la forma normal de la forma mutante. No obstante, la idea de que la síntesis de una proteína anormal ocurre todavía se presume para todas las otras variantes que se consideran patogénicas. Cabe notar que ninguna mutación “nula” (aquellas que previenen la formación de proteínas) ha sido descrita. Esto va de acuerdo con nuestra visión general del mecanismo de la enfermedad de Alexander como un desorden de “ganancia de función” en vez de “pérdida de función” (ver capítulo 4 acerca de Mecanismos de Enfermedad).

<b>TABLA 4: Cuenta actual de variantes patogénicas</b>	
(actualizada 5.9.21)	#
Aminoácidos, Completos	<b>432</b>
Aminoácidos afectados por mutaciones causantes de enfermedades	88
Cuenta de mutaciones total	141
Privadas	92
No-privadas	49
Complejo	15
Delección interna significativa debido a mutación en el sitio de empalme	3
Truncamiento (en 312)	1
Nulas (es decir, nada de proteína)	0

<b>TABLA 5: Aminoácidos (abreviaciones)</b>					
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Ácido glutámico	Glu	E	Serina	Ser	S
Glutamina	Gln	Q	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptofano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

Las variantes patogénicas están distribuidas a través de casi todo lo largo de la proteína, con la excepción curiosa del dominio principal en el cual no se han encontrado variantes patogénicas convincentes (**Figura 15**). En total, aproximadamente un tercio de las variantes son cambios en cuatro aminoácidos, Arg79, Arg88, Arg239, y Arg416. En cambio, casi dos tercios de las variantes patogénicas califican como “privadas”, lo que significa que solo se conoce un paciente (o familia, en caso de una variante heredada) con este cambio en particular (ver Tabla 4, abajo). Con el tiempo, el número de variantes privadas debe disminuir, a medida que se identifiquen más pacientes, pero ya que menos pacientes son públicos, no saldrá información nueva a la esfera pública. El gran número de variantes diferentes, cada uno con relativamente pocos pacientes, contribuye a la dificultad en alcanzar una correlación genotipo-fenotipo precisa (la habilidad de predecir un estado actual y futuro basado solamente en resultados genéticos).

Solo pocas variantes, como Arg239His se han vistas en suficientes pacientes para estar relativamente confiados en sus consecuencias, las cuales en este caso son severas.

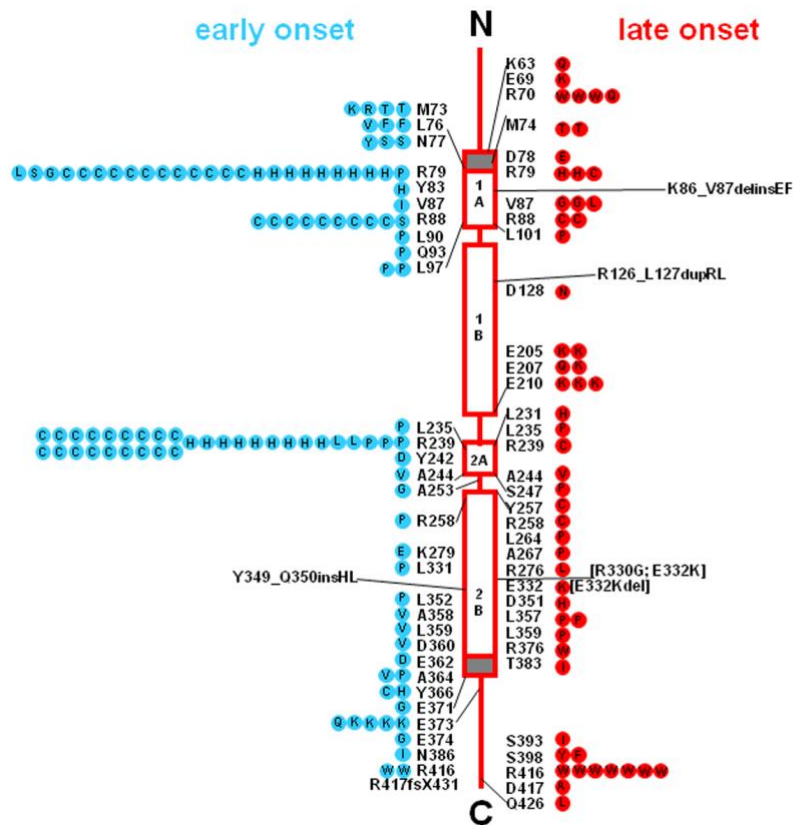


FIGURA 15: Lugares de mutaciones de GFAP asociadas con la enfermedad de Alexander con relación a la cabeza, cola, y dominio central rod de la proteína (para la estructura general de filamentos intermedios, también ver la Figura 20). Casos de desarrollo temprano (primer síntoma antes de los 2 años de edad) están a la izquierda, mostrados como círculos azules, y casos de desarrollo tardío (primer síntoma después de los 2 años de edad) están a la derecha, mostrados como círculos rojos. El aminoácido silvestre se indica al lado de la estructura, con la variante del aminoácido dentro de cada símbolo. Cada símbolo representa un solo paciente, excepto los casos familiares, incluyendo gemelos, son representados por un solo símbolo. Adaptado de (Messing et al., 2012), con permiso de la Sociedad de Neurociencia.

Por razones que no son inmediatamente obvias, cuando uno determina si las variantes en el gen de GFAP residen en el cromosoma 17 heredado del padre (alelo paterno) o el de la madre (alelo materno), la mayoría ocurre en el GFAP del cromosoma paterno. En la encuesta de 27 casos estudiados por Li et al. (2006), 24 eran de origen paterno, y en el estudio de Zang et al. (2013), en una población completamente diferente, 9 de 10 eran de origen paterno. Una posible explicación para la tendencia paterna tiene que ver con el número de divisiones celulares que ocurren durante el desarrollo de la esperma, las cuales son mucho más numerosas que el número requerido para el desarrollo de óvulos. Cada división celular carga el riesgo de un error en

replicación de ADN, y entre más divisiones hay, más alto el riesgo. Se conoce que las mutaciones de punto, las cuales representan la mayoría de los casos de la enfermedad de Alexander, típicamente surgen durante el desarrollo de la esperma en vez del óvulo, por lo cual están en la copia paterna de cada gen (Crow, 2000).

Muchas variantes de GFAP identificadas por análisis genético de muestras de pacientes son familiares por experiencia previa, y confirmación del diagnóstico es sencillo. Sin embargo, como fue señalado anteriormente, muchas variantes son privadas, y nunca se han visto antes, y decisiones acerca de si son responsables por la enfermedad son menos claras. El criterio que hemos recomendado para la patogenicidad de variantes candidatos se discute extensivamente en una revisión de literatura (Brenner et al., 2009). La terminología y clasificación de variantes genéticas en relación a salud y enfermedad es un tema de investigación activa y evolución continua. Guías de nomenclatura actualizadas surgen regularmente (MacArthur et al., 2014; Richards et al., 2015). Actualmente, las variantes se colocan en una de cinco categorías principales:

1. Benigno (completamente inocuo)
2. Probablemente benigno (probablemente no hace daño, pero no estamos seguros)
3. Significancia incierta (preocupante, pero no sabemos de seguro)
4. Probablemente patogénico (probablemente responsable de enfermedad)
5. Patogénico (definitivamente responsable de enfermedad)

Incluso aquí, la conclusión de que una variante es completamente inocuo no es certera, y podría cambiar cuando haya nueva información disponible.

#### 2.4 ¿QUÉ TAL LOS PACIENTES DE LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER CUYA SECUENCIA DE *GFAP* ES NORMAL?

¿Cómo se explica la población pequeña de pacientes que no tienen una variante detectable de GFAP? Al momento no hay respuesta para esta pregunta, pero hay varias posibilidades. Para comenzar, los métodos de análisis genéticos utilizados rutinariamente en la práctica clínica se concentran en los exones de los genes, buscando variantes de regiones codificantes que predican cambios en aminoácidos. Como se mencionó anteriormente, explican la mayoría de los casos de la enfermedad de Alexander. Sin embargo, otros tipos de cambios en el gen de *GFAP* que puedan causar enfermedad son posibles, pero no detectables por estos métodos. Uno que ya ha sido probado (aunque solo una vez) es una variante en un intrón que alteró el procesamiento del ARN inicial, y resultó en una delección en la sección central de la proteína de GFAP (Flint et al., 2012). Otro tipo de cambio para el cual solo se propone la hipótesis de que causa la enfermedad de Alexander (pero no se ha probado) es una mutación en regiones regulatorias que controlan el nivel de expresión genética, en vez de la secuencia de aminoácido. Dichas variantes patogénicas en regiones regulatorias han sido identificadas recientemente para otras condiciones (De Gobbi et al., 2006; Mathelier et al., 2015). Una tercera posibilidad para *GFAP* y la enfermedad de Alexander, también propuesta como hipótesis, pero no probada, es duplicación genética. Las duplicaciones no son detectadas por los métodos diagnósticos usados actualmente. Sin embargo, dos estudios de investigación fueron designados específicamente para probar duplicaciones de

*GFAP* en la enfermedad de Alexander, pero solo tuvieron resultados negativos (Yoshida and Nakagawa, 2012; Ferreira et al., 2015).

Por último, pero no menos importante, variantes en otros genes adicionales a *GFAP* pudieran en teoría causar la enfermedad de Alexander. Precedentes para esta idea surgen de otros desórdenes de filamentos intermedios, donde cambios en las proteínas que normalmente interactúan con los filamentos intermedios tienen los mismos efectos que los cambios en los filamentos intermedios. De las proteínas asociadas para *GFAP*, variantes en  $\alpha$ B-crystalina, Hsp27, y plectina causan enfermedades, pero ninguno de estos desórdenes se asemeja a la enfermedad de Alexander. Para las proteínas asociadas, sin embargo, la situación es menos clara. Gigaxonina (cuyo nombre oficial del gen es GAN) es una proteína asociada para muchos filamentos intermedios, y parece tener un rol clave en regular la vía de degradación de estos filamentos (Mahammad et al., 2013). Variantes de pérdida de función en gigaxonina llevan a acumulación anormal de varios tipos de filamentos intermedios, y en múltiples tipos de célula, especialmente en neuronas (Bomont et al., 2000). Este desorden en particular se conoce como “neuropatía axonal gigante” (GAN, por sus siglas en inglés), debido a la prominencia de los defectos neuronales. A pesar de, los efectos en filamentos intermedios sí incluyen a *GFAP* (Lin et al., 2016). Autopsias de pacientes de GAN han revelado fibras de Rosenthal en astrocitos, y las características de MRI en estos pacientes puede ser indistinguible de pacientes típicos de la enfermedad de Alexander (van der Knaap and Valk, 2005). Queda por ver si las variantes de GAN explican algunos pacientes de Alexander sin mutaciones identificables de *GFAP*.

## 2.5 PROBLEMAS EN CONSEJERÍA GENÉTICA

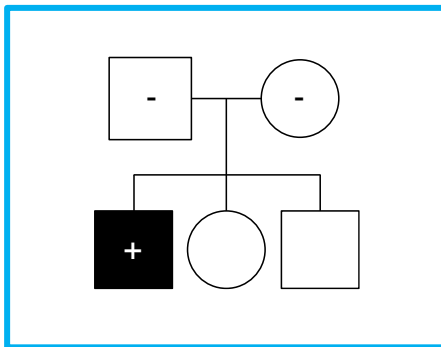
Pocos pacientes y familias están completamente preparados para entender de inmediato los resultados de un examen genético, y necesitan ayuda interpretando el significado y la importancia de este tipo de análisis. Algunos de los asuntos claves son señalados aquí, y discutidos más extensamente en otra parte (Messing (in press)). El ADN para análisis es típicamente aislado de células obtenidas de muestras como sangre, saliva, o la mejilla. En investigación, nosotros y otros han obtenido ADN utilizable de otros tipos de muestras como uñas o incluso muestras de patología de hígado y próstata archivados de individuos que ya fallecieron (Li et al., 2005; Flint et al., 2012; Messing et al., 2012b).

Como se describió anteriormente, la única variante conocida que causa la enfermedad de Alexander ocurre en un solo gen, *GFAP*, y solo en una de las dos copias de este gen de la persona, también conocido como estado heterocigótico. Ya que el gen de *GFAP* está localizado en el cromosoma 17, el cual es uno de los “autosómico”, (en contraste con los cromosomas sexuales X y Y), las variantes de *GFAP* son características autosómicas. Ya que la variante que causa la enfermedad solo necesita estar presente en una de las dos copias del gen, esta característica se considera “dominante”, lo cual hace a la enfermedad de Alexander un ejemplo de una condición “autosómico dominante”.

Como fue mencionado, muchos (y tal vez la mayoría) de los casos de la enfermedad de Alexander resultan de lo que se conoce como mutaciones “*de novo*”. En estas situaciones, análisis

de muestras de sangre adquiridas de padres son ambas negativas (es decir, no se encuentra mutación en GFAP), y la mutación es “nueva” en el niño. La habilidad de examinar a los padres y demostrar la naturaleza *de novo* de la mutación puede ser una parte importante en la determinación de que una variante en particular es en realidad patogénica, especialmente cuando es una variante que no se ha reportado en la literatura. Las variantes *de novo* son probables en pacientes con comienzo temprano y síntomas severos, ya que se esperaría que estos individuos tengan menos probabilidad de sobrevivir hasta una edad reproductiva y tener hijos propios. De hecho, es la misma naturaleza de las mutaciones *de novo* que explica la rareza de la enfermedad de Alexander en la población general, porque mutaciones nuevas en un sitio en particular son eventos raros. Sin embargo, en el caso de los pacientes que son más levemente afectados, o no presentan síntomas hasta los 40-50, se vuelve entendible que tengan hijos propios, y en este caso la copia anormal de GFAP puede ser pasada de generación en generación.

Estas consideraciones tienen varias implicaciones importantes para consejería genética. Primero consideramos la situación común de un niño afectado con padres no afectados, con el



niño teniendo la mutación *de novo* (**Figura 16**). Porque las mutaciones *de novo* son eventos extremadamente raros, las posibilidades de este evento ocurrir nuevamente en la misma familia son extremadamente bajas. El riesgo de tener un segundo niño afectado con otra mutación *de novo* es esencialmente cero. Sin embargo, el riesgo de tener otro niño afectado con la misma variante que el primero niño no es cero, por razones explicadas a continuación.

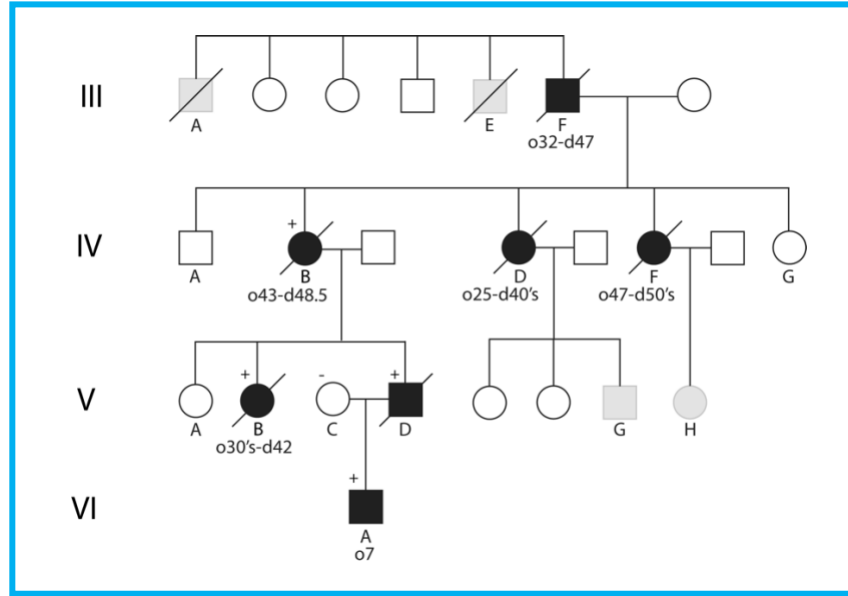
**FIGURA 16:** Ejemplo de genealogía (árbol familiar) para un niño positivo a una variante patogénica de GFAP, pero cuyos padres ambos son negativos para la misma variante (basado en análisis de sangre o muestra de mejilla) – en otras palabras, una variante “*de novo*”. Los símbolos cuadrados representan varones, y los círculos representan mujeres. Dibujo del autor.

Para un número de desórdenes genéticos, ocurre un fenómeno llamado “mosaicismo germinal” y lleva a las familias a tener dos o más niños afectados, cada uno con la misma variante, nacidos de padres que aparentan ser negativos para la variante. ¿Cómo sucede esto? Recuerda que las pruebas para los padres típicamente envuelven muestras de sangre o células de la piel de dentro de la boca. Creemos que, en este caso de mosaicismo germinal, las mutaciones surgen mayormente durante el desarrollo de la esperma o el óvulo en los padres, y no en el embrión luego de la fertilización. Esto explica por qué el resto de las células en el cuerpo de los padres (sus células somáticas) son normales, y cuando las muestras de sangre, saliva o mejilla se analizan son negativas. Pero dependiendo de cuándo exactamente durante el desarrollo del espermatozoide o el óvulo surge la mutación, alguna proporción de células germinales pueden llevar la variante. Lo más tarde en el desarrollo que esto ocurra, menor la proporción del producto final. Puede ser una proporción de la población muy pequeña, pero no podemos estar seguros de que solo una célula cargaba la variante. El fenómeno de “mosaicismo germinal” se refiere a esta situación, cuando un padre es negativo en todas sus células somáticas (es decir, no

las células reproductivas), pero sí es positivo a una proporción variable (y desconocida) de la población de células germinales (espermatozoide y óvulo). La consecuencia de una proporción alta es que aun cuando ambos padres son negativos en sus células somáticas (sangre, saliva, mejilla), hay una posibilidad de que pudieran tener a más de un hijo con la misma variante.

El mosaicismo germinal se ha documentado bien para un número de condiciones genéticas, y consejería certera se puede ofrecer acerca del riesgo para aquellos que enfrentan esa condición. Sin embargo, para la enfermedad de Alexander, lo único que podemos decir en el presente es que no se ha reportado ningún caso convincente de mosaicismo germinal (el único caso putativo envuelve una variante que no es confirmada como patogénica, y ninguno de los padres estaba disponible para pruebas). Algunas familias descritas en la literatura temprana aparentemente involucraban a múltiples niños afectados, de padres no afectados (Wohlwill et al., 1959; Springer et al., 2000), pero en la ausencia de análisis genético no podemos estar seguros de que hayan tenido la enfermedad de Alexander. Una tercera familia, con confirmación patológica del diagnóstico en dos niños fue descrita por Duckett et al., (1992), pero análisis genéticos subsecuentes de la familia revelaron la herencia de una variante patológica del padre levemente afectado (Messing et al., 2012b) (esta familia también es un buen ejemplo de expresividad variable, un concepto discutido a continuación). Entonces, uno puede observar el número total de pacientes de la enfermedad de Alexander que han sido publicados (alrededor de 300, en el 2017), y decir que el mosaico germinal probablemente ocurre en la enfermedad de Alexander a una tasa de 1 en 300, posiblemente mucho menor. Entonces, el riesgo de recurrencia en una familia cuando ninguno de los padres está afectado es bastante bajo. Esto no es un resultado preciso, pero es la mejor información que se puede ofrecer al momento.

La situación más simple, para propósitos de consejería genética, es cuando la variante de *GFAP* se pasa a través de generaciones. En este caso, el padre positivo es heterocigótico para la variante en todas las células de su cuerpo, incluyendo las células que llevan al espermatozoide o al óvulo. Recuerda que espermatozoides o óvulos maduros poseen solo la mitad del complemento normal de cromosomas (los cromosomas se restauran al estado diploide, con dos copias del cromosoma 17, y entonces dos copias de *GFAP*, solo después de que la fertilización una a los cromosomas del padre y la madre en una sola célula). Lo que esto significa para un padre que es positivo, en promedio solo mitad de los espermatozoides o los óvulos (dependiendo del sexo del padre) tienen un gen anormal de *GFAP*, mientras que la otra mitad tienen la versión normal. En este caso, la predicción sencilla es que con cada embarazo de este padre en particular lleva un riesgo de 50% de que el niño herede la versión variante de *GFAP*, y sean ellos mismos heterocigóticos (una copia normal y una variante del gen). De ellos (el niño) tener hijos propios, el mismo cálculo aplica, 50% de probabilidad de transmisión a la próxima generación con cada embarazo. Sin embargo, los otros niños del padre positivo, que no heredan la variante de *GFAP*, no tendrán el riesgo de la enfermedad, ni lo transmitirán a sus hijos (no tienen variante que transmitir). Hay muchos ejemplos de familias que muestran este patrón de herencia autosómico dominante, con un linaje (o árbol familiar) mostrado en la **Figura 17** (Messing et al., 2012b). Nota que el número de afectados en cada generación no es estrictamente 50%, pero ese continúa siendo la tasa de transmisión precedida para cada embarazo individual.



*FIGURA 17: Ejemplo de un árbol genealógico mostrando un patrón de herencia autosómico dominante. Los símbolos cuadrados son varones, y los círculos son mujeres. Los símbolos sólidos son afectados definitivamente, mientras que los sombreados son posiblemente afectados. La línea diagonal que atraviesa algunos símbolos indica que ese individuo en particular falleció. Figura adaptada (actualizada para reflejar el estado actual de los individuos designados como V.D) de (Messing et al., 2012b), con permiso de la Asociación Médica Estadounidense, y Archivos de Neurología.*

¿Qué pasa si un niño afectado tiene dos padres no afectados, pero una variante es encontrada no solo en el niño, pero también en uno de los padres por examen genético? En esta situación uno podría considerar una de tres posibilidades: 1) el padre sí está afectado, pero a un nivel más leve (tal vez sin síntomas pero con cambios visibles en MRI), lo cual se conoce como “expresividad” variable, o 2) el padre está completamente inafectado aun teniendo una variante causante de la enfermedad, lo cual sería un ejemplo de “penetrancia” reducida o incompleta, o 3) la variante identificada no es dañina, y no es responsable por los problemas que el paciente experimenta. En realidad, puede ser difícil distinguir entre la segunda y la tercera opción, y solo ejemplos basados en experiencias de otras personas que tienen la misma variante podrían ofrecer una guía en cuál es la interpretación correcta.

Otro posible resultado de un examen genético es un resultado designado como “variante de significación incierta”. Cómo se manejan estos resultados es un tema de considerable interés para muchos desórdenes en la genética médica. En el caso de GFAP, desafortunadamente, no existe una prueba simple para resolver esta incertidumbre. Experimentalmente, es posible medir la habilidad de las variantes de GFAP de formar una red de filamentos de apariencia normal apropiadamente, introduciendo de manera artificial una variante del gen a una línea de células que no contienen filamentos intermedios citoplásmicos propios. Dicha línea celular, llamada “SW13” se utiliza a menudo con este fin. Resumido en un repaso en el 2013 (Messing and Brenner, 2013), las pruebas de GFAP en SW13 clasificaron correctamente a 17 de 17 variantes



consideradas claramente patogénicas basadas en otros criterios. En adición, 6 de 7 que eran consideradas no patogénicas o inciertas también fueron clasificadas correctamente, con solo un resultado ambiguo. Sin embargo, probar variantes de GFAP en células SW13 no es una opción práctica para laboratorios clínicos.

¿Puede haber variantes benignas de GFAP que no causen ningún problema? La contestación es un sí cualificado, o al menos hay variantes que son razonablemente comunes (que van desde 0.2% a 9% en la población general, dependiendo de la variante) sin ningún enlace obvio a alguna enfermedad. De desconocer si estas variantes son verdaderamente inocuas, ya que pocos individuos con estas variantes han realizado estudios clínicos detallados, y análisis genético de *GFAP* fuera del contexto de la enfermedad de Alexander no se realiza generalmente. Los genetistas, sin embargo, están encontrando variantes benignas en muchos otros genes, así que uno podría esperar que al menos algunos existan en *GFAP*.

## Capítulo 3

### Expansión del Fenotipo Clínico y Brechas Restantes en Conocimiento

#### 3.1 SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN

La clasificación basada en edad de inicio ampliamente utilizada (Russo et al., 1976) es superficialmente simple, pero sufre de varios problemas significativos. Uno de ellos es que la edad precisa de inicio puede ser difícil de definir en ocasiones. Contrario a las convulsiones, las cuales muchos pueden recordar como eventos específicos y son ocasionalmente la razón inicial para un chequeo médico, otros problemas como retrasos en el desarrollo o torpeza solo se reconocen retrospectivamente, y a veces años después de que comienzan. Pridmore et al., (1993), en su revisión de 40 casos, prestaron atención más cercana a los patrones de neuropatología (es decir, dónde en el cerebro estaban las lesiones), y cómo, cuando vistos de esta perspectiva, los pacientes no siempre caían precisamente en las categorías definidas por Russo.

Con el beneficio de la genética como un ancla para diagnósticos, otros han expandido el espectro clínico de la enfermedad de Alexander y aumentado los rangos conocidos para edad de inicio. Vazquez et al. (2008) describieron a un niño con ventrículos agrandados a las 32 semanas de gestación, y rasgos distintivos de imágenes de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) a las 33 y 36 semanas de gestación, llevando a confirmación genética poco después del nacimiento. Al otro lado del espectro de edades, para uno de los pacientes descritos por Pareyson et al. (2008) se presumía un inicio de síntomas a los 62 años, y su padre (sin confirmación genética) había experimentado problemas similares al comienzo de los 71 años de edad. Dos grupos, uno en los Estados Unidos y otro en Japón han propuesto un sistema de clasificación completamente nuevo basado en distribución anatómica de lesiones (y por lo tanto tipos de síntomas) en vez de edad de inicio. Prust et al. (2011), luego de un repaso de 215 pacientes, diseñaron un esquema consistiendo en dos categorías, Tipo I y Tipo II. Los pacientes Tipo I tenían, de manera uniforme, un inicio temprano (promedio de 1.74 años), y la mayoría de sus lesiones eran en la parte frontal del cerebro. Los pacientes Tipo II tenían una edad de inicio a través de lo largo de la vida (promedio 21.64 años), con más de sus lesiones en el cerebro posterior (medula, tronco cerebral, y cerebelo) y espina dorsal. Yoshida et al. (2011a) en su repaso de 34 pacientes, desarrolló esencialmente el mismo sistema. Sin embargo, estos autores también sugirieron que había algunos pacientes quienes no cabían fácilmente en una de las dos categorías descritas anteriormente, así que propusieron una tercera categoría “intermedia.” Queda por ver cuáles de estos sistemas va a persistir. Una breve tabulación de los diferentes tipos de síntomas experimentados por cada uno de los grupos (Tipo I vs Tipo II), derivado del estudio de Prust et al. (2011), se muestra arriba (**Tabla 6**).

<b>TABLA 6: Rasgos típicos de Tipo I y II de la enfermedad de Alexander</b>	
<b>TIPO I</b>	<b>TIPO II</b>
Inicio en edad temprana (a menudo antes de los 4 años)	Se manifiesta a lo largo de la vida
Convulsiones	Disfunción autonómica
Macrocefalia	Síntomas bulbares
Encefalopatía	Anormalidad de movimiento ocular
Deterioro paroxismal	Mioclonía palatina
Fracaso para prosperar	A menudo negativos para deficiencias neurocognitivas y de desarrollo
Retrasos de desarrollo	
Rasgos radiológicos clásicos	Rasgos radiológicos atípicos

*Adaptada de Prust et al., 2011, Tabla 4.*

### 3.2 ¿LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER SIEMPRE ENVUELVE ANORMALIDADES DE MATERIA BLANCA?

Dado a la clasificación tradicional de la enfermedad de Alexander como una leucodistrofia, es importante notar que las deficiencias en la materia blanca que son prometentes en pacientes jóvenes se vuelven progresivamente menos prominentes cuando la enfermedad inicia más tarde o en pacientes adultos (Barkovich and Messing, 2006). Salvi et al. describieron a un hombre de 71 años de edad con un historial de 19 años y hallazgos de MRI limitados a atrofia de la medula y la médula espinal cervical (Salvi et al., 2005). En su continua investigación de pacientes con patrones de MRI atípicos, van der Knaap et al. (2006) describieron a siete pacientes quienes tenían anomalías de materia blanca “no presentes o poco visibles.” Varios años más tarde, Yoshida et al. (2011b) reportaron que un tercio de sus pacientes con inicio en la adultez no tenían anomalías de materia blanca. Es importante mencionar que todos estos pacientes tenían variantes de GFAP que confirmaban su diagnóstico de la enfermedad de Alexander. Una pregunta fundamental que nunca se ha contestado es la naturaleza de las anomalías en materia blanca cuando sí existen, y cómo el problema inicial en astrocitos lleva a los cambios secundarios en oligodendrocitos, las células responsables de formar la mielina alrededor de los axones. Uno razonablemente podría ver a la enfermedad de Alexander como “astrogliopatía” en vez de una simple leucodistrofia, ya que esto cambia el enfoque de atención hacia astrocitos, los cuales son las células que dan inicio a la enfermedad y consistentemente las más defectuosas.

### 3.3 ¿LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL EN LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER ES ÚNICA?

Sorprendentemente, a pesar de la descripción inicial de la enfermedad de Alexander como un síndrome de discapacidad intelectual (ver Alexander, 1949), un área que ha recibido poca atención es la cognición en sí, y muchas preguntas siguen sin contestación. ¿Hay áreas específicas de función cognitiva deficientes? ¿Estas deficiencias se derivan de áreas particulares del cerebro que están afectadas, y en algunos individuos más que en otros? A menudo vemos generalizaciones como que pacientes Tipo I sufren de deficiencias cognitivas con más frecuencia

que pacientes Tipo II, pero realmente tenemos poca data confiable acerca de la prevalencia relativa de deficiencias cognitivas en estos dos grupos.

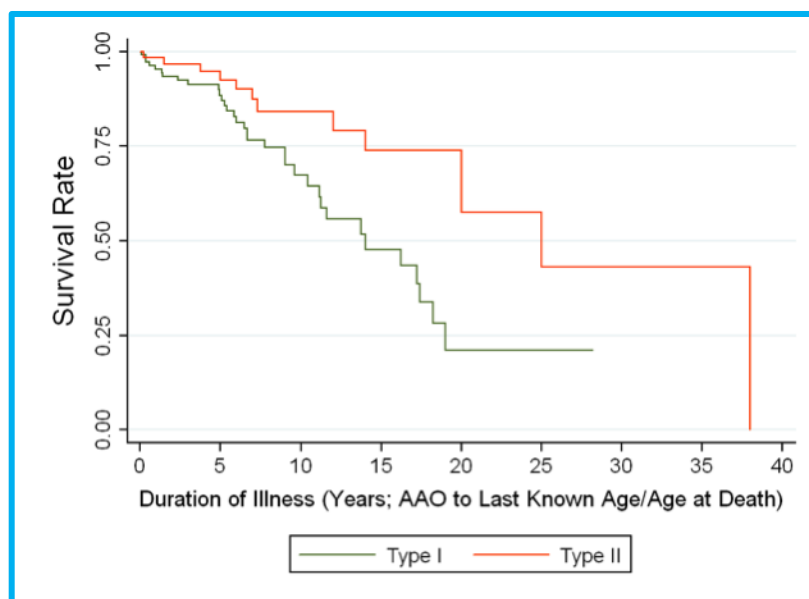
También tenemos muy poca data acerca de la naturaleza de estas deficiencias. De aproximadamente 300 publicaciones que existen ahora acerca de la enfermedad de Alexander, solo 21 proveen alguna información acerca de las deficiencias cognitivas en humanos. De estas, 19 consisten en reportes de un solo caso, en siete instancias dando solo una puntuación de IQ sin especificaciones de qué prueba fue utilizada. Los otros 12 reportes de casos utilizaron una variedad de pruebas incluyendo el Hasegawa Dementia Scale, Mini-mental State Examination, Tanaka-Binet, y cualquiera de las tres escalas de Wechsler (Wechsler Intelligence Scale for Children, Wechsler Adult Intelligence Scale, and Wechsler Preschool and Primary School Scale of Intelligence). Un estudio en Italia describió a cuatro pacientes quienes fueron evaluados utilizando el Milan Overall Dementia Assessment (Pareyson et al., 2008), y un estudio en China describió a 21 pacientes evaluados usando el Gesell o WISC (Zang et al., 2013). De hecho, solo una publicación describe una prueba neurofisiológica completa con algún detalle, para un solo paciente (varón, Tipo II) con una mutación poco común (Restrepo et al., 2011). Falta mucho por aprender acerca de este aspecto de la condición.

#### 3.4 LA NECESIDAD DE ESTUDIOS DE HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER

Sin tratamiento, ¿cuál es el curso natural de una enfermedad, también conocido como la “historia natural”? ¿Cuándo comienzan a surgir los síntomas? ¿Cuán rápido empeoran? ¿Mejoran en algún momento? Y últimamente, ¿cuánto uno vive? Estas preguntas que aparentan ser simples son sorprendentemente difíciles de contestar, pero son esenciales de atender como fundamento para ser capaces de probar si algún tratamiento experimental funciona.

La primera pregunta, ¿cuándo comienzan los síntomas?, claramente ha sido de interés por muchos años y, como es notado anteriormente, el sistema de clasificación más antiguo categorizaba pacientes explícitamente basado en edad de inicio (juvenil, infantil, adultez) (Russo et al., 1976). Incluso aquí, la definición exacta de cada uno de estos términos (las edades para cada categoría) no ha sido aplicada uniformemente en cada publicación. Asimismo, la edad de inicio para algunos síntomas, particularmente aquellos determinados al preguntarle a los padres acerca de eventos que sucedieron hace años, usualmente se desconoce.

El largo de la vida es un concepto más concreto, pero los reportes varían en si describen el largo de la vida (es decir, años desde el nacimiento) o supervivencia (es decir, años desde el inicio de síntomas o diagnóstico). La data más confiable proviene de un estudio de Prust et al. (2011), utilizando su sistema de clasificación propuesto de enfermedad Tipo I vs. Tipo II, donde encontraron que la supervivencia media para pacientes Tipo I es de 14 años, y para pacientes de Tipo II es de 25 años luego del comienzo de síntomas (**Figura 18**).



*FIGURA 18: Proporción de individuos que continúan con vida en varios intervalos luego del inicio de la enfermedad, comparando pacientes de Tipo I con pacientes de Tipo II. Figura reimpressa de (Prust et al., 2011), con permiso de Wolters Kluwer Health.*

Cabe notar que estos periodos de supervivencia son mucho más largos de lo que se creía incluso hace 10 años atrás, lo cual refleja o más conocimiento acerca del curso de la enfermedad basado en una mayor cantidad de pacientes estudiados, o mejoramiento continuo del cuidado médico que previene o pospone complicaciones, como la neumonía, que a menudo son la causa inmediata de muerte, o alguna combinación de las dos.

Más allá del largo de la vida o supervivencia, se han realizado pocos intentos de estudios de historia natural de la enfermedad de Alexander, fuera de reportes de casos individuales. Uno de ellos, compuesto de seis pacientes, se enfocó en neuroimágenes, y a pesar de ser liderado por quien originó el criterio de diagnóstico por MRI para la enfermedad de Alexander (y muchas otras leucodistrofias), Marjo van der Knaap, resaltó la dificultad en relacionar resultados de imágenes con el curso clínico (van der Voorn et al., 2009). Lo más cercano a un estudio de historia natural de la enfermedad de Alexander es Zang et al. (2013), quienes estudiaron 21 pacientes descritos como enfermedad de Alexander Tipo I (más un padre descrito como Tipo II presintomático). Diecinueve de estos pacientes recibieron al menos una visita de seguimiento, y de estos, catorce recibieron una prueba más, con un espacio de aproximadamente 14 meses, representando intervalos de 10 meses a 6.62 años después del diagnóstico. Las pruebas cognitivas no fueron estandarizadas para todos los pacientes y faltaron pruebas de dominios neuropsicológicos específicos. A través de este periodo de tiempo, aproximadamente un tercio mostró deterioro de función motora y/o cognitiva. Interesantemente, a pesar del número relativamente bajo y los periodos de tiempo de análisis variados, un número substancial de estos individuos permanecieron estables, y algunos mostraron evidencia de mejoría. En efecto, nosotros y otros previamente hemos descrito a pacientes Tipo I que experimentan periodos sostenidos de

mejoría, indicando que la enfermedad no siempre causa deterioro persistente (Messing et al., 2012; Namekawa et al., 2012).

### 3.5 CONCEPTOS ERRÓNEOS COMUNES DE LA LITERATURA TEMPRANA

La literatura temprana en la enfermedad de Alexander (definida aquí como pre-genética, o 1949-2000) se basa en un número de pacientes relativamente pequeño, lo cual llevó a una serie de conclusiones que ahora sabemos que son incorrectas. Sin embargo, estos conceptos erróneos persisten en varios rincones del internet, y son mencionados ahora solo para enfatizar que deben ser ignorados.

El primer asunto es la genética. Antes del descubrimiento de *GFAP* como el gen causante, no se sabía esencialmente nada acerca de la base genética de la enfermedad. Aun así, más de un autor asumió que, de ser de origen genético, sería un rasgo recesivo, requiriendo que ambos padres sean “portadores” no afectados. La rareza del desorden sería entonces una función de cuán infrecuente el estado de portador existe en la población general. Clasificar una condición como recesiva también tiene implicaciones importantes para la consejería genética, ya que predice que el 25% de los niños serían afectados, y la probabilidad de que una pareja tenga un segundo hijo afectado sería relativamente alta. Por supuesto, la genética de *GFAP* de la enfermedad de Alexander ahora muestra sin duda alguna que no es recesiva, sino dominante.

Otros dos conceptos erróneos tienen que ver con la tendencia de género y la distribución de edad. Tal vez por los primeros seis casos (cinco eran varones, todos comenzaron a tener síntomas antes de su primer cumpleaños), algunos “hechos” comúnmente citados acerca de la enfermedad son: 1) afecta más comúnmente a los niños que a las niñas, y 2) la forma infantil es la más común. Sin embargo, Li et al. (2005), revisando 44 casos, no encontraron tendencias de género entre el grupo juvenil. La pregunta de distribución de edades es más difícil de contestar. Creemos (pero no tenemos pruebas) que las formas de inicio tardío probablemente son poco diagnosticadas debido a la confusión con otras condiciones comunes como esclerosis múltiple y la enfermedad de Parkinson, y la falta de análisis de *GFAP* como prueba de diagnóstico. Como se notó anteriormente, en la encuesta de población de la prevalencia (descrito arriba), Yoshida et al. (2011a) encontraron que aproximadamente mitad de los pacientes de Alexander en Japón tenían eran de inicio en la adultez. Se desconoce si la misma distribución de edades existe en otras poblaciones.

### 3.6 BRECHAS EN EL ENTENDIMIENTO DEL FENOTIPO CLÍNICO

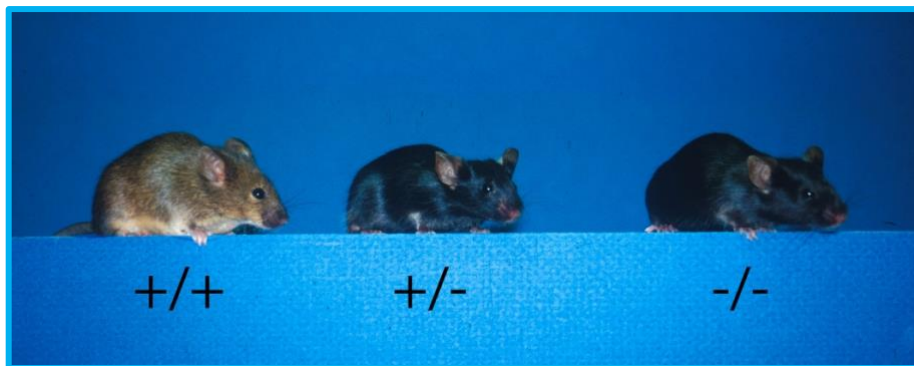
Dado a lo que conocemos o sospechamos de las funciones de los astrocitos, hay muchos aspectos del cuadro clínico de la enfermedad de Alexander que requieren más investigación. Todas las sugerencias hechas aquí son altamente especulativas. Sin embargo, algunas de particular interés incluyen potenciales anormalidades de sueño (Cui et al., 2014; Haydon, 2017), respuesta a anestesia (Thrane et al., 2012), y susceptibilidad a abuso de sustancias como el alcohol (Adermark and Bowers, 2016). El sueño es de especial interés porque disturbios de esta función biológica básica puede tener varios efectos secundarios que agravan problemas en otras

áreas de funcionamiento como cognición. Muchos individuos con la enfermedad de Alexander también reportan apnea obstructiva del sueño, lo cual refleja control motor anormal de la epiglotis debido a patología del rombencéfalo. En adición, se ha argumentado por mucho tiempo acerca de la base glial de varios tipos de desórdenes psiquiátricos, incluyendo depresión y esquizofrenia (Cui et al., 2014; Elsayed and Magistretti, 2015). Ocasionalmente vemos reportes de síntomas psiquiátricos en individuos con la enfermedad de Alexander, pero al momento es imposible descifrar si estos resultan de los efectos patogénicos de la variante de *GFAP* o simplemente co-ocurren como condiciones psiquiátricas relativamente comunes en una enfermedad rara. Estos síntomas también pueden reflejar una reacción al conocimiento de tener una condición genética, o el dolor y la incomodidad asociada con síntomas crónicos que empeoran progresivamente.

## CAPÍTULO 4: Mecanismos de la Enfermedad

### 4.1 GFAP y EVOLUCIÓN

GFAP es una proteína antigua que surgió aproximadamente hace 300 millones de años en la evolución de vertebrados, tal vez coincidiendo con el desarrollo inicial de astrocitos en el sistema nervioso central. A través de este largo periodo de tiempo, la secuencia de aminoácidos ha cambiado relativamente poco, lo que implica que las variaciones son nocivas. Por ejemplo, el GFAP humano tiene 432 aminoácidos de largo, con el 94% de estos aminoácidos idénticos a esos en la secuencia de GFAP en bovinos. El ratón es 90% idéntico al humano, y el pez cebra es 67% idéntico al humano al nivel de la secuencia de aminoácidos de GFAP. Por lo tanto, por los estándares de evolución GFAP es una proteína altamente “conservada”. Sin embargo, cuatro grupos en los 1990s generaron, independientemente, ratones “knockouts” para GFAP, por interrupción, o delección del gen, y para sorpresa de todos los ratones no solo vivieron, sino que también estaban saludables (Gomi et al., 1995; Pekny et al., 1995; Liedtke et al., 1996; McCall et al., 1996) (**Figura 19**).



*FIGURA 19: Ratones adultos que son normales (+/+), heterocigóticos (+/-), o nulos (-/-) para mutaciones que llevan a GFAP a no ser funcional (el ratón de la derecha está completamente deficiente de GFAP). Variaciones en el color del pelaje no están relacionadas a las diferencias del gen de GFAP. Imagen del autor.*

Según un reporte reciente, los sapos y las ranas han eliminado naturalmente al gen GFAP de su ADN (Martinez-De Luna et al., 2017).

Así que, sobrevivir sin GFAP es claramente posible. Esto es muy diferente a la situación en la enfermedad de Alexander, sin embargo, en la cual cambiar solo un aminoácido puede tener efectos devastadores. Las variantes en GFAP que causan la enfermedad de Alexander envuelven, no la ausencia de GFAP, si no que la producción de una proteína anormal. Especulamos que estas formas anormales de GFAP tienen efectos “tóxicos” en los astrocitos, exacerbados por el



aumento en expresión que también ocurre. Esfuerzos considerables se han realizado intentando identificar cuáles son estos efectos tóxicos.

#### 4.2 OTROS TIPOS DE CÉLULAS TAMBIÉN EXPRESAN GFAP – ¿TAMBIÉN SON AFECTADAS?

A pesar de que los astrocitos en el sistema nervioso central reciben la mayor atención cuando se trata de GFAP y la enfermedad de Alexander, otros tipos de células a través del cuerpo también expresan el gen y producen cantidades mensurables de proteína. Estas otras localidades se nombran abajo en la **Tabla 7**:

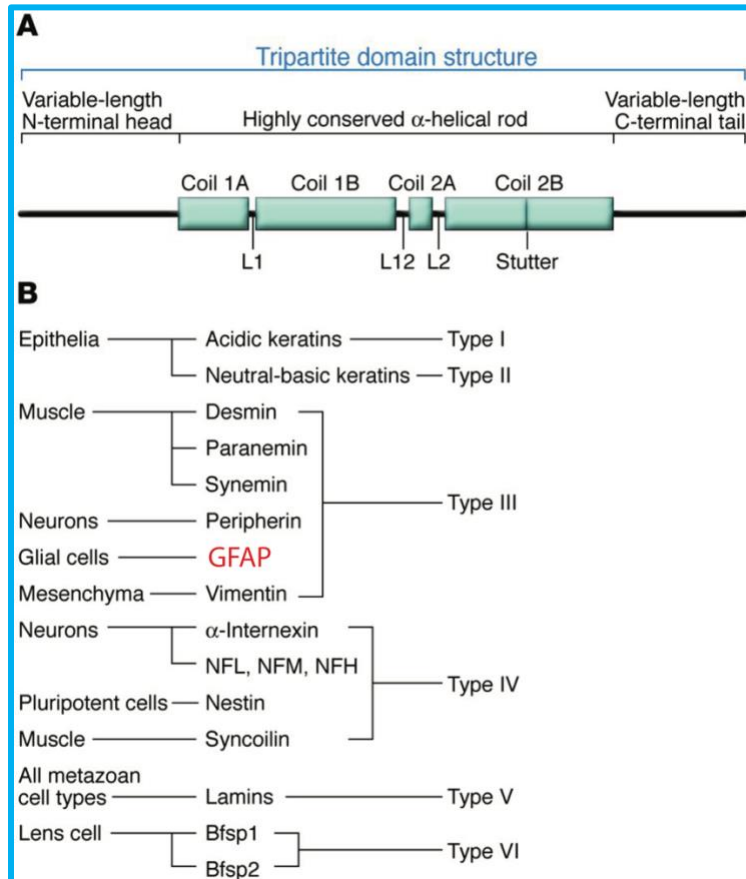
<b>TABLA 7: Otros tipos de células que producen GFAP</b>		
LUGAR	TIPO DE CÉLULA	REFERENCIA
Nervios periféricos	Células de Schwann	(Jessen and Mirsky, 1984)
Páncreas	Células estelares	(Apte et al., 1998)
Hígado	Células estelares	(Gard et al., 1985)
Tracto gastrointestinal	Glía entérica	(Jessen et al., 1984)
Cartílago	Condrocitos	(Viale et al., 1988)
Cuerdas vocales	Células estelares	(Sato et al., 2014)
Cerebro	Células madre neurales	(Seri et al., 2001) (Garcia et al., 2004)

Con la excepción de células madre neurales en el cerebro (discutidas más adelante), no hay reportes de fibras de Rosenthal formadas en ninguno de estos tipos de células, ni problemas clínicos en pacientes que puedan, sin equivocación, ser atribuidos a la disfunción de estas células. Por lo tanto, aunque asumimos que también contienen GFAP anormal al igual que los astrocitos, puede ser que sean niveles muy bajos como para importar. Para células madre en el hipocampo, sin embargo, Hagemann et al. (2013) reportaron que el modelo de ratón no solo forma fibras de Rosenthal, sino que también tuvo una baja dramática en su habilidad para generar nuevas neuronas. Este descubrimiento no ha sido repetido en humanos, pero si el hipocampo está comprometido en su habilidad para generar nuevas neuronas, esto podría contribuir a la disfunción cognitiva que usualmente forma parte del cuadro clínico para pacientes.

#### 4.3 COMPARACIONES CON DESÓRDENES DE OTROS FILAMENTOS INTERMEDIOS

GFAP es miembro de una familia de proteínas conocida como “filamentos intermedios”, llamados así porque su diámetro de 10nm se encuentra entre medio de los otros dos componentes principales del citoesqueleto de las células, actina y microtúbulos (Eriksson et al., 2009). La familia ahora incluye sobre 70 proteínas, algunas de las cuales se expresan a través de todo el cuerpo, como las lamina (en el núcleo de las células) y vimentina (prácticamente en todas partes), mientras otras se expresan en lugares más restringidos como las queratinas (en la piel, el cabello, las uñas, y el epitelio), desmina (en músculos), y neurofilamentos (en neuronas). La identificación y secuenciación de los genes para estos filamentos intermedios en los 1980 llevó a la realización

de que todas comparten una estructura común, con un dominio rod central que ha sido altamente conservado a través de la evolución (**Figura 20**). Muchas de las variantes patogénicas de GFAP ocurren en lugares específicos en la proteína que trazan exactamente a lugares comparables a variantes causantes de enfermedad en otros filamentos intermedios (Brenner et al., 2009).



*FIGURA 20: Estructuras comunes, expresión específica para tipo de célula, y sistema de clasificación para la familia de filamentos intermedios. Figura reimpressa de (Ericksson et al., 2009), con permiso de la Sociedad Americana de Información Clínica. [GFAP está en el grupo tipo III, resaltado en rojo] [sinemina ahora se agrupa con los tipo IV]*

Esfuerzos considerables se han llevado a cabo para estudiar la clase completa de los desórdenes de filamentos intermedios, en parte para buscar mecanismos comunes que ayuden a entender los roles de estos filamentos en salud y enfermedad (Bouameur and Magin, 2017). El descubrimiento dramático que enlaza a los filamentos intermedios con enfermedades surgió con la generación de ratones deficientes en queratina 14 (K14), los cuales desarrollaron una condición de ampollas en la piel similar a un desorden en humanos llamado epidermolysis bullosa simplex (EBS) (Vassar et al., 1991). Análisis genéticos subsecuentes en pacientes humanos con EBS revelaron que muchos eran heterocigóticos (es decir, uno de dos cromosomas estaba afectados) para variantes en K14 (Coulombe et al., 1991). Las variantes tenían un comportamiento genético de características “dominantes” (una copia era suficiente para causar la enfermedad), pero los efectos se veían idénticos a lo que ocurre con niveles reducidos o en la ausencia de la proteína, por lo cual se conocen como variantes “dominantes negativas” (Chan et al., 1994; Rugg et al., 1994). Muchos desordenes de filamentos intermedios se asemejan al estado

deficiente (Omary, 2009; Bouameur and Magin, 2017), pero GFAP y la enfermedad de Alexander no siguen este patrón.

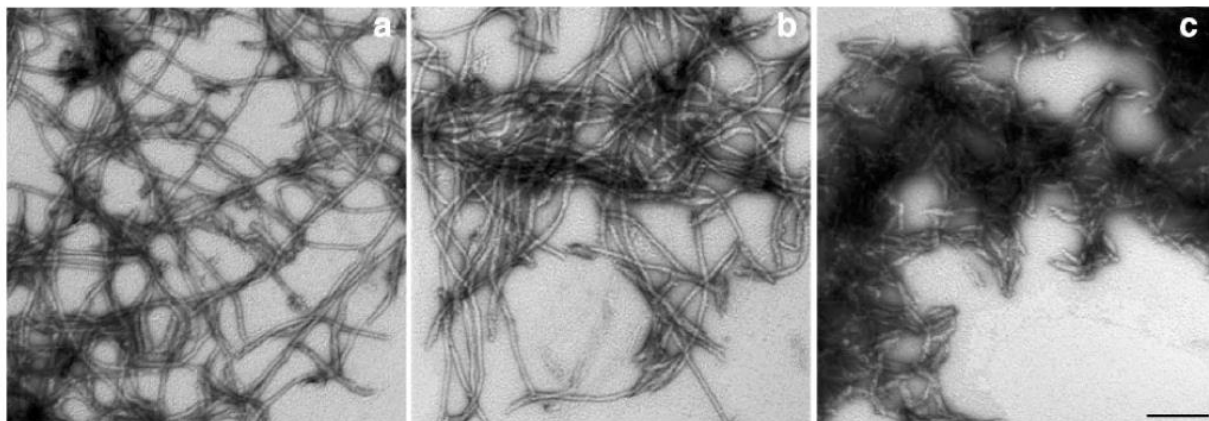
#### 4.4 SISTEMAS MODELO PARA ESTUDIO

Un número de sistemas experimentales han sido desarrollados para ayudar a obtener un mejor entendimiento acerca de cómo cambios en una sola proteína de astrocitos que aparentan ser triviales pueden tener efectos tan dramáticos y extensos a través del sistema nervioso. Estos se consideran a continuación, comenzando con estudios de moléculas de GFAP individuales hasta investigaciones en animales.

##### 4.4.1 Sistemas libre de células

Los filamentos intermedios normalmente se agregan entre sí (y algunas otras proteínas asociadas) para finalmente lograr la estructura filamentosa que se vuelve visible utilizando un microscopio de electrón. Este proceso de ensamblaje, desde un solo polipéptido a filamentos maduros a través de varios pasos discretos de asociación, puede ocurrir en la ausencia de casi todos los otros componentes celulares, dada la concentración de sal correcta. Luego de que ocurre el ensamblaje, la solución se coloca en un disco pequeño que se examina a una magnificación de 60,000x para ver los filamentos depositados en una capa delgada. Este análisis sencillo fue utilizado con GFAP normal por Roy Quinlan (Universidad de Durham) para investigar la habilidad de una proteína enlazante,  $\alpha$ B-cristalina, de regular los procesos de ensamblaje y desmontaje (Nicholl and Quinlan, 1994).

Sin embargo, los resultados para las variantes de GFAP causantes de la enfermedad de Alexander han sido inconsistentes. Por ejemplo, Arg416Trp tiene efectos variables en pacientes humanos, pero forma filamentos altamente irregulares in vitro (Perng et al., 2006). Por lo contrario, Arg239Cys, la cual uniformemente causa enfermedad severa en humanos, forma filamentos de apariencia normal in vitro (Hsiao et al., 2005) (**Figura 21**).



*FIGURA 21: Filamentos de GFAP ensamblados in vitro. Proteínas recombinantes fueron producidas en E. coli y luego purificadas a homogeneidad y ensambladas in vitro. Luego fueron teñidas en negativo con acetato de uranilo a 1% y vistos con un microscopio de*

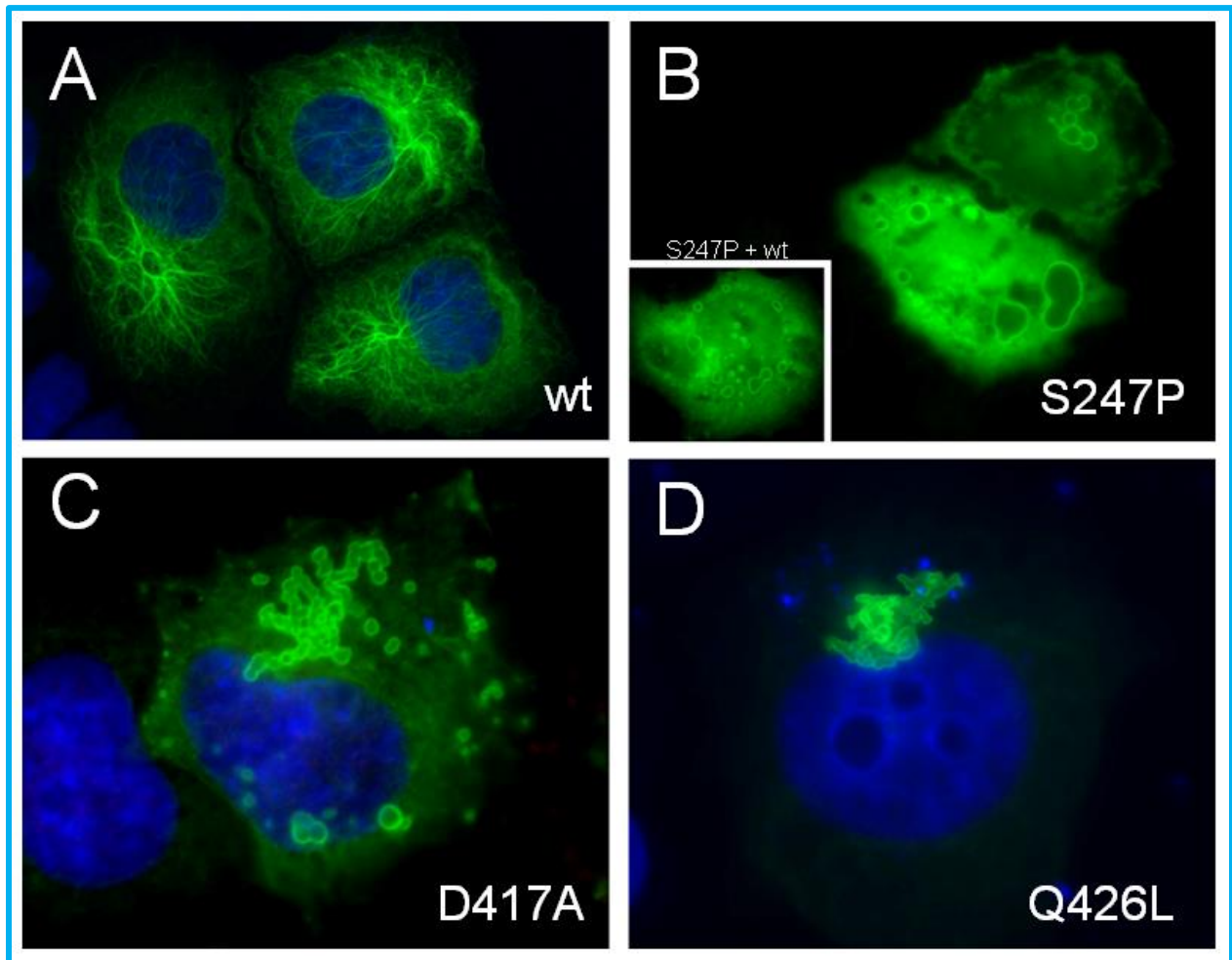
*electrón. Muestras de GFAP (a) tipo silvestre, (b) R239C, y (c) R416W. Barra = 100nm. Figura y leyenda reimpresas de (Brenner et al., 2009), con permiso de Springer Nature.*

#### 4.4.2 Cultivo de Células

Células crecidas en cultivo de tejidos ofrecen los beneficios de estudiar el comportamiento y las consecuencias de GFAP y sus variantes en un contexto biológico más normal comparado con pruebas libres de células, acompañados de control total del ambiente celular en términos de temperatura, nutrición, y otros factores. Existen varias versiones de modelos de cultivos celulares, sin embargo, con muchas propiedades diferentes. Las más simples son las líneas de células inmortalizadas, las cuales tienen las características útiles de crecer indefinidamente y ser fáciles de manipular. Algunas se derivan de gliomas (tumores en el cerebro que comparten algunas características con los astrocitos, entre ellas la expresión de GFAP), mientras otras se derivan de otros tipos de células y se usan a base de conveniencia o experiencia previa. En general, el valor de estas líneas de células está en que uno puede fácilmente comenzar y detener la expresión de GFAP y sus variantes, y visualizar los cambios que suceden tanto fotográficamente como bioquímicamente. Entre los varios descubrimientos de interés de este tipo de estudios se incluyen:

1. Exceso de GFAP normal por sí solo puede inducir muchos de los mismos cambios también causados por GFAP con secuencias de aminoácidos anormales (Koyama and Goldman, 1999; Hsiao et al., 2005)
2. Ambos, el exceso de GFAP y las variantes activan varias vías de estrés dentro de la célula, algunas de las cuales pueden ser dañinas y otras protectoras (Koyama and Goldman, 1999; Hsiao et al., 2005)
3. Exceso y variantes de GFAP alteran algunas vías de degradación de proteínas (Koyama and Goldman, 1999; Hsiao et al., 2005)
4. Variantes de GFAP activan ciertas vías de muerte celular (Chen et al., 2011)
5. Las fibras de Rosenthal no son inertes, y bajo algunas circunstancias son eliminadas de las células (Koyama and Goldman, 1999; Hsiao et al., 2005)
6. Variantes actúan de manera dominante, con Arg416Trp como ejemplo (Koyama and Goldman, 1999; Hsiao et al., 2005)

Un modelo de cultivo celular inusual pero excepcionalmente útil es una línea celular inmortalizada, originalmente derivada de un tumor adrenal humano conocido como “SW13vim-” (mencionado anteriormente de manera breve), que naturalmente carece de filamentos intermedios en el citoplasma (Hedberg y Chen, 1986). Las células SW13 son excepcionalmente útiles como ambientes estrictos en los cuales se prueba la habilidad de la variante de GFAP para ensamblarse en una red citoesquelética. La habilidad de la variante de GFAP para llevar a cabo esta prueba es altamente predecible de si es considerable patogénico (es decir, realmente responsables por la enfermedad) (ver ejemplos en (Li et al., 2005; Messing et al., 2012b), entre muchos otros) (**Figura 22**). Sin embargo, como fue mencionado anteriormente, esta prueba solo se utiliza en contexto de investigación y no es adecuada para uso de rutina en la práctica clínica.



*FIGURA 22: Efectos de las variantes Ser247Pro, Asp417Ala, y Gln426Leu en el ensamblaje de filamentos estudiados en células SW13. Teñido DAPI (azul), en A, C, y D indica la posición de los núcleos. A) Comportamiento de GFAP silvestre (es decir, normal), mostrando el ensamblaje típico de filamentos en una red, con o sin fondo difuso. Introducción de las variantes B) Ser247Pro, C) Asp417Ala, o D) Gln426Leu produjeron filamentos en forma de anillo en un fondo de teñido difuso. El recuadro en el panel B muestra el resultado de la co-introducción de Ser247Pro junto a una cantidad igual de GFAP normal, demostrando el efecto dominante de la variante sobre el tipo silvestre. Figura reimpressa de (Messing et al., 2012b), con permiso de la Sociedad Médica Americana (Archivos de Neurología).*

Un segundo tipo de cultivo celular menos utilizado se conoce como el cultivo “primario”, lo cual significa recién aislado de tejido. Debido a que muchos cultivos son laboriosos para derivar y mantener, no han disfrutado de un uso amplio como las líneas de células inmortalizadas. Debido a lo impráctico que es obtener dichos tejidos de humanos, estos cultivos solo han sido

derivados de modelos de ratones, y no han encontrado una aplicación amplia (Cho y Messing, 2009).

El tercero, y más recientemente derivado tipo de sistema de cultivo de células es el de “células madre pluripotente inducidas” o “iPS cells” por sus siglas en inglés. Estas son células que pueden ser aisladas de una muestra sencilla de sangre o piel tomada de pacientes. Las células son forzadas a revertirse al estado embrionario, del cual luego se pueden convertir en astrocitos – todo en la conveniencia de un plato estándar de cultivo de tejido. Las células iPS tienen un potencial enorme para el descubrimiento de mecanismos básicos de enfermedades usando células humanas. En algunos casos, podrían ser una posible aplicación terapéutica (como derivar células iPS propias del paciente, corregir la variante causante de la enfermedad en cultivo, y luego reintroducir las células modificadas de regreso al paciente por medio de trasplante). Dichos escenarios ya han sido exitosos en otras enfermedades, particularmente en situaciones en las cuales las células sujetas a modificación y trasplante son de la médula ósea y forman sangre. La aplicación más dramática de este método envuelve desórdenes de inmunodeficiencia (Wang y Rivière, 2017). Progreso con esta estrategia también ha sido reportado para leucodistrofias y adrenoleucodistrofias ligadas al cromosoma X (Cartier et al., 2009; Biffi et al., 2013).

Métodos para dirigir el desarrollo de células iPS de su estado pluripotente a astrocitos fueron desarrollados por el laboratorio de Su-Chun Zhang (Waisman Center, Universidad de Wisconsin-Madison) (Krencik y Zhang, 2011), y han sido continuamente refinados y mejorados. Ya existe una publicación describiendo dichas células de pacientes con la enfermedad de Alexander (Kondo et al., 2016), y otros estudios están cerca de ser publicados.

Para todas las fortalezas que este sistema de cultivo de células les ofrece a científicos, tienen limitaciones significativas que se deben tomar en consideración. Líneas de células inmortalizadas usualmente se originan de tumores, y comienzan con anomalías fundamentales en regulación y desarrollo. Incluso cultivos primarios y células iPS típicamente utilizan poblaciones purificadas de sólo un tipo de célula. Esta característica tiene ventajas para muchos tipos de experimentos. Sin embargo, los astrocitos en el cerebro y la médula espinal se desarrollan y existen como parte de una comunidad de células, con interacciones íntimas y dinámicas con otros miembros de esta comunidad – neuronas, oligodendrocitos, microglía, el sistema vascular, entre otros. La complejidad del ambiente *in vivo* es imposible de replicar en un plato de cultivo. Incluso el refinamiento relativamente simple de co-cultivo, o estudiar astrocitos no solo en aislamiento, pero junto a uno o más tipos de células, no ha sido logrado para la enfermedad de Alexander por ningún laboratorio.

#### 4.4.3 ¿La Enfermedad de Alexander Ocurre en Otras Especies de Animales?

Ya que el ADN y las secuencias de aminoácidos de GFAP han sido altamente conservadas a través de la evolución, como se mencionó, no sería una sorpresa si la enfermedad de Alexander también sucediera en otras especies. El problema sería reconocerla, ya que pocos animales con enfermedades neurológicas pasan por una examinación neuropatológica detallada. Claramente, algunos ejemplos de animales con fibras de Rosenthal abundante en una autopsia han sido descritos, en ovejas y perros en particular, pero muchos fueron antes del descubrimiento de

GFAP como el gen causante así que no conocemos si tienen el mismo origen genético que la enfermedad humana (Fankhauser et al., 1980; McGrath, 1980; Cox et al., 1986; Richardson et al., 1991; Weissenböck et al., 1996). Un estudio en ovejas con fibras de Rosenthal no encontró cambios en la secuencia de GFAP (Kessell et al., 2012). Recientemente, un perro fue identificado con una variante de GFAP correspondiente a la variante Arg239His en humanos (Van Poucke et al., 2016). Este fue un Labrador Retriever de 3 meses con debilidad progresiva en las cuatro patas que eventualmente culminó en parálisis. Ninguna colonia de crianza fue establecida, así que este modelo no está disponible para más estudios.

#### 4.4.4 Modelos de Animales Diseñados

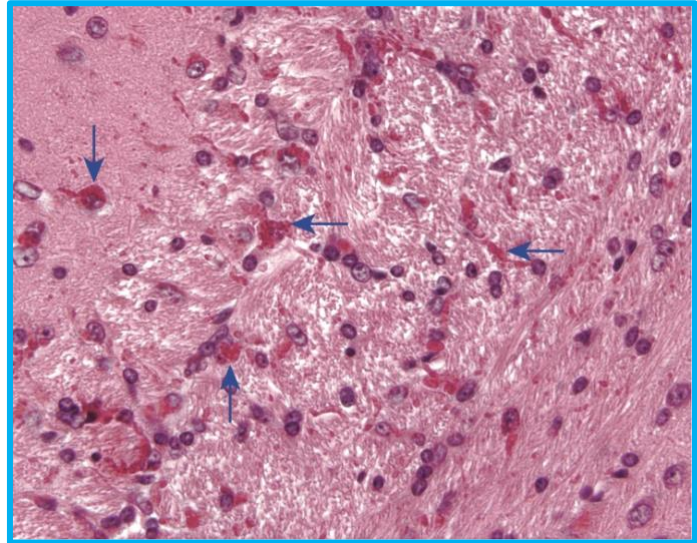
Como se mencionó anteriormente, los modelos de cultivo de tejidos no replican la complejidad anatómica y fisiológica del sistema nervioso intacto, así que los modelos animales son esenciales para entender a fondo las consecuencias de GFAP aberrante para astrocitos en el cerebro. En la ausencia de animales que espontáneamente desarrollen la enfermedad, métodos modernos para manipular el genoma experimentalmente nos permite crear animales de interés. A finales de los 1970 y principios de los 1980 se desarrollaron técnicas para añadir elementos genéticos definidos al genoma de ratones de manera que fueran transmitidos a sus crías como rasgos heredados. Estos animales “transgénicos” rápidamente se volvieron herramientas populares para estudio. Métodos aún más poderosos fueron desarrollados más tarde en los 1980 para modificar los genes de los animales, permitiendo la introducción de variantes definidas en localizaciones específicas. Cuando estas manipulaciones focalizadas resultan en la eliminación de un gen, los animales se conocen coloquialmente como “knockouts”. Cuando la manipulación resulta en la modificación de un gen en vez de su eliminación, los animales se conocen como “knock-ins”.

Aunque el primer ratón transgénico de GFAP que formó las fibras de Rosenthal impulsó una nueva era de investigación en la enfermedad de Alexander (Messing et al., 1998), análisis genéticos subsecuentes en pacientes llevaron al descubrimiento de que este modelo de ratón en particular no era una mímica genética exacta de la enfermedad humana. El ratón del 1988 llevaba copias adicionales de un gen normal de GFAP (así que producía niveles excesivos de una proteína que tenía una secuencia normal de aminoácidos), mientras que la enfermedad humana involucraba una secuencia de aminoácidos anormal en GFAP. Las técnicas para el diseño de mutaciones knock-in permitieron la creación de nuevos modelos animales que se asemejaban más a la enfermedad en humanos.

En el ratón, Hagemann et al. crearon mímicas genéticas exactas de la enfermedad de Alexander en humanos directamente modificando el gen de GFAP del ratón (el cual ya es 90% idéntico al humano) con variaciones en secuencia idénticas a dos variantes comunes, Arg79His y Arg239His (Hagemann et al., 2006) (**Figura 23**). [Debido a diferencias menores en secuencias entre humanos y ratones en la región de dominio principal (el ratón tiene 3 aminoácidos menos), las publicaciones que describen a este ratón en particular se refieren a las variantes como Arg76His y Arg239His]. Independientemente, el laboratorio de Kazuhiro Ikenaka (Instituto Nacional para Ciencias Fisiológicas, Japón) creó una versión transgénica que llevaba una secuencia humana con la variante Arg239His, y producía una proteína humana anormal en



adición a la proteína normal de ratón (Tanaka et al., 2007). Ambos modelos de ratones formaban fibras de Rosenthal, demostrando el enlace entre la variante de GFAP y el rasgo neuropatológico distintivo de la enfermedad. Aunque ningún modelo sufrió de convulsiones visibles, ambos mostraron una sensibilidad anormal al ser expuestos a un químico experimental que induce convulsiones, ácido kaínico. Más reciente, Cotrina y colegas reportaron que el ratón Arg236His experimenta actividad sub-convulsiva continua en registros de electroencefalogramas (EEG) (Cotrina et al., 2014). Más acerca de lo aprendido en estos estudios se discutirá a continuación. Sorprendentemente, ninguno de los modelos de ratón mostró evidencia de deficiencia en la materia blanca. Como se mencionó anteriormente, los astrocitos humanos son más grandes y complejos que los de ratones (Oberheim et al., 2009), lo cual podría limitar cuán de cerca los modelos de ratones pueden imitar la enfermedad humana.



*FIGURA 23: Sección de tejido de cerebro de un ratón diseñado con la variante R236H (equivalente a R239H en humanos), mostrando fibras de Rosenthal abundantes (estructuras globulares rojas – algunas de muchas en este plano de visión indicadas por flechas) en astrocitos. Figura reimpresa de (Hagemann et al., 2006). Utilizada con permiso de la Sociedad de Neurociencia. Los círculos teñidos de violeta*

Más reciente, el laboratorio de Mel Feany (Brigham and Women's Hospital, Harvard) creó un modelo de la enfermedad de Alexander en *Drosophila*. La mosca frutera común, *Drosophila melanogaster*, por más de 100 años ha servido como uno de los sistemas de modelo animal más versátiles en el cual estudiar genética tanto en desarrollo normal como en enfermedades (**Figura 24**). A pesar de que las moscas son evolutivamente diferentes a los humanos, y no tienen mielina, astrocitos, o filamentos intermedios como GFAP, su sistema nervioso depende de células parecidas a los astrocitos (también llamadas "glía") que interactúan con neuronas de manera similar a lo que sucede en el sistema nervioso de vertebrados. Utilizando métodos análogos a esos del ratón Ikenaka (es decir, añadiendo un gen humano al genoma de la mosca), estos investigadores generaron moscas que producen la variante de Arg79His humana de GFAP en su glía, y estudiaron los efectos resultantes tanto en las células gliales como en las neuronas vecinas (Wang et al., 2011). Moscas que producían GFAP humano normal fueron usadas como control. Similar a los resultados en ratones, producir la forma de Arg79His de GFAP causó formaciones de agregados entre glía casi idénticos a las fibras de Rosenthal. En adición, la presencia de fibras de Rosenthal en estas células estaba relacionada a su tendencia de causar muerte en las neuronas vecinas, lo que se conoce como neurotoxicidad



FIGURA 24: *Drosophila melanogaster*. Reimpresa bajo licencia de CC-BY 2.0. [https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Drosophila\\_melanogaster\\_-\\_Fruit\\_fly.png](https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Drosophila_melanogaster_-_Fruit_fly.png)

inducida por glía. Las moscas también eran más susceptibles a convulsiones, y esto puede reflejar un disturbio subyacente en la habilidad de manejar glutamato. Una fortaleza del modelo de mosca es que uno puede cruzar las moscas de GFAP con cepas que tienen deficiencia de otros genes, y así identificar otros mecanismos genéticos que podrían ser modificadores importantes de la enfermedad inducida por GFAP. De esta manera, se identificó la sintasa de óxido nítrico como un mecanismo importante a través del cual la

producción de la variante de GFAP en glía lleva a los efectos tóxicos en neuronas (Wang et al., 2005). Otras maneras en las cuales el modelo de moscas ha sido utilizado se describen a continuación.

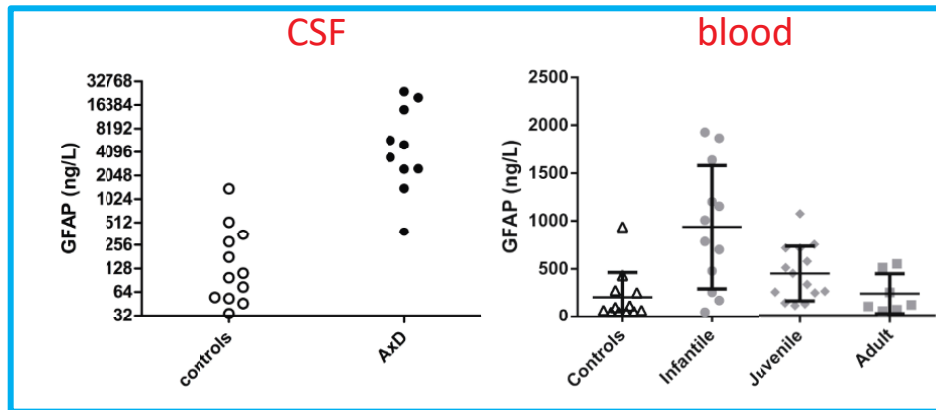
#### 4.5 ¿CÓMO LAS VARIANTES DE GFAP CAUSAN LA ENFERMEDAD?

A cierto nivel, esta es la pregunta fundamental que todos los sistemas de modelo intentan contestar. Si entendemos cómo las variantes de GFAP causan la enfermedad, tenemos mejor oportunidad de intervenir para cambiar el curso de eventos. La discusión a continuación comienza con lo que sucede en el astrocito, y luego considera cómo estos cambios impactan el ambiente alrededor, y otras células que interactúan con los astrocitos.

Algo que claramente sucede es que la expresión del GFAP mutante lleva a una cascada de cambios en la expresión de otros genes, lo que se refiere colectivamente como “respuesta de estrés”. En algunos aspectos, la activación de estas vías son intentos de la célula de protegerse a sí misma de cualquier tipo de lesión como térmica (es decir, estrés por calor), tóxica, o en el caso de GFAP, de origen genético. De hecho, los mismos genes a menudo son activados por todos estos diversos tipos de insultos (por ejemplo,  $\alpha$ B-cristalina fue originalmente identificada en *Drosophila* como parte de la respuesta a estrés por calor, y también se conoce como una proteína de choque térmico). Exactamente cómo estas diferentes vías de estrés son activadas es un tema de investigación considerable, pero solo hay pocas respuestas disponibles. Un rasgo interesante es que las mismas vías básicas son activadas por tener mucho GFAP y por tener GFAP anormal. En general, los efectos perjudiciales de tener demasiado GFAP, o alternativamente GFAP anormal, se conoce como “toxicidad GFAP” (Messing et al., 2012a).

Ya que el GFAP anormal inicia el proceso de la enfermedad, hace sentido que cualquier aumento en el nivel de actividad genética (también conocido como “expresión”) solo podría empeorar las cosas. Estudios en ambos, modelos de ratón y en autopsias humanas, consisten en la idea de que el nivel de la acumulación de GFAP se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Hagemann et al., 2006; Walker et al., 2014). Este aumento podría ser medido fácilmente a través de análisis del fluido cerebrospinal, donde el GFAP normalmente está

presente en niveles bajos, pero aumenta marcadamente en la enfermedad de Alexander y otras condiciones (Kyllerman et al., 2005; Liem and Messing, 2009; Jany et al., 2015) (**Figura 25**). Niveles de GFAP elevados también se observan en la sangre, principalmente en pacientes de desarrollo temprano de la enfermedad (Jany et al., 2015).



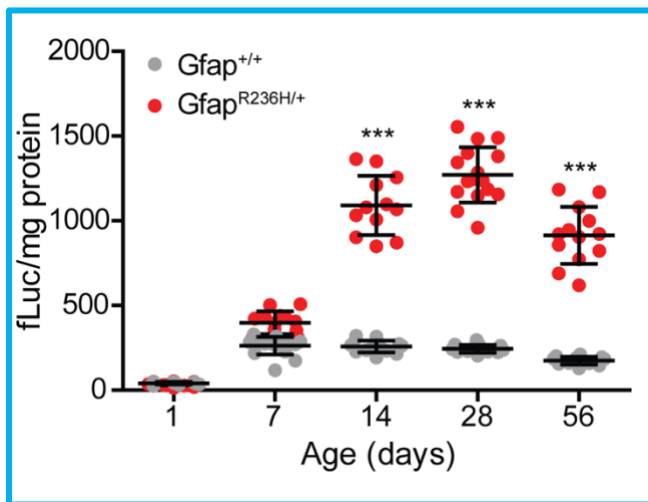
*FIGURA 25: Niveles de GFAP en fluido cerebroespinal (CSF, por sus siglas en inglés) (panel izquierdo) y en la sangre (panel derecho) de pacientes de la enfermedad de Alexander y controles saludables (los valores se muestran en el axis de y con una escala logarítmica para el CSF, y una escala lineal para sangre). Los niveles de GFAP estuvieron elevados en el CSF para todos los pacientes de la enfermedad de Alexander excepto uno, y en la sangre para grupos con inicio de la enfermedad en niñez y juventud, pero no en adultez. Cada punto de data representa un individuo. Figuras reimprimadas de (Jany et al., 2015); Creative Commons Attribution 4.0 International license. AxD = Enfermedad de Alexander.*

Otras características presuntamente secundarias que pueden residir dentro de astrocitos o en una población de células adyacentes, como microglía, se refleja por un aumento en número de moléculas secretadas o adheridas a la membrana (quizás receptores de las moléculas secretadas). Estos fueron detectados por primera vez por Hagemann et al. (2005), en su estudio del modelo de ratón original que formó fibras de Rosenthal, y subsecuentemente expandido por el laboratorio de Goldman en su estudio de este y otros modelos de ratón (Olabarria et al., 2015; Olabarria and Goldman, 2017). Este perfil general de activación genética a veces se conoce como “neuroinflamación”, debido a similitudes con la respuesta inmunológica fuera del sistema nervioso, y podría explicar el beneficio que ocasionalmente se atribuye a tratamientos con medicamentos antiinflamatorios como prednisolona. Sin embargo, ninguno de estos compuestos antiinflamatorios ha sido estudiados en estudios clínicos formales, así que no se ha llegado a un consenso en cómo se deben usar en los pacientes.

Se desconoce por qué los niveles de GFAP aumentan (al punto de toxicidad). Uno podría pensar en el nivel total de cualquier proteína como un reflejo del balance de síntesis y degradación. Por lo tanto, los cambios en el total de GFAP deben ser, en parte, debido a cambios en la síntesis, degradación, o ambos. Es importante entender por qué los niveles de GFAP

aumentan en la enfermedad de Alexander, porque podría ofrecer una oportunidad importante de intervención. Estudios en ambos, modelos de ratón y tejido humano sugieren que hay una correlación entre los niveles de GFAP y la severidad de la enfermedad. Esto hace sentido intuitivo porque cualquier aumento en la actividad de la expresión de GFAP (es decir, actividad del gen y traducción a proteína) también aumenta el nivel de la misma proteína que da inicio a la enfermedad en primer lugar.

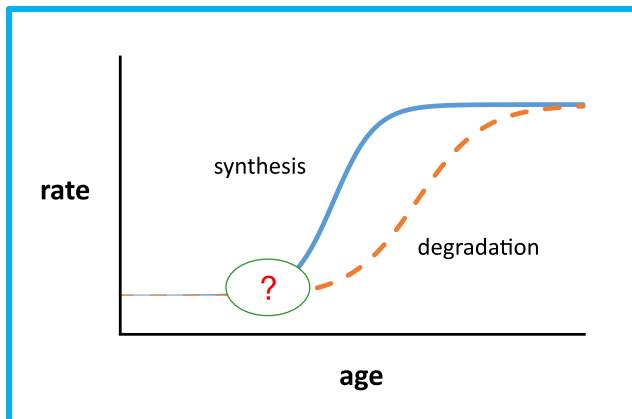
¿La síntesis de GFAP aumenta? ¿Por qué? Basado en las medidas de niveles de mRNA en ambos modelos animales y cerebros humanos, es claro que el proceso de transcripción genética (de ADN a ARN) aumenta (Hagemann et al., 2005; Hagemann et al., 2006). Por qué la síntesis de GFAP aumenta es otro asunto. Un aumento en la expresión de GFAP aparenta ser una característica fundamental de la respuesta reactiva de los astrocitos a casi cualquier lesión o enfermedad que los afecte a ellos o a otras células en el sistema nervioso central (como se menciona anteriormente). En muchos otros escenarios, la explicación se podría encontrar en cambios en otras células, como neuronas, oligodendrocitos, y microglía, las cuales luego se comunican con los astrocitos para provocar esta respuesta. Uno de los descubrimientos más interesantes en modelos de ratón, sin embargo, es que cambios en la síntesis de GFAP ocurren como un evento temprano, mucho antes de que cualquier alteración significativa haya ocurrido en otra población celular en el cerebro. Por ejemplo, cuando la actividad del promotor de GFAP (la región reguladora del gen, la cual controla la transcripción de la región codificante) fue examinada como una función de edad en la mutante Arg236His, un cambio dramático se observó entre 7-14 días después del nacimiento (**Figura 26**).



*FIGURA 26: Actividad del promotor de GFAP (región reguladora que controla los niveles de síntesis) como función de edad, en ratones normales y mutantes. Un aumento dramático en actividad genética ocurre durante la segunda semana después del nacimiento. Figura reimpressa de (Jany et al., 2013), con permiso de SAGE Publications.*

Además del aumento en síntesis, también parece haber cambios en la degradación, pero estos son más complejos. Por otro lado, una vía importante para digerir una amplia variedad de proteínas involucra una estructura subcelular llamada “proteasoma”, y esta vía parece estar afectada, al menos en modelos de cultivo celular de la enfermedad de Alexander (Tang et al., 2006 and Tang et al., 2010). Hay indicaciones de que esto sucede en animales y en humanos (Walker et al., 2014). Por otra parte, otra vía de digestión de proteínas (y estructuras más grandes), llamada “autofagia”, parece aumentar, pero esta vía solo se ha estudiado en modelos

de cultivo celular (Tang et al., 2008). Moody et al. (2017) utilizaron un método diferente para analizar esta pregunta. Introduciendo isotopos pesados de nitrógeno a la dieta de los animales, pudieron examinar cuán rápido la población de GFAP en el cerebro se convertía de aminoácidos que contenían el nitrógeno normal al nitrógeno pesado, y determinando la tasa de cambio. Para su sorpresa, el cambio en los ratones con GFAP mutante era más rápido que en los ratones normales. A pesar de que los detalles de lo que inicia este cambio (en las primeras dos semanas después del nacimiento) continúan inciertos, eventualmente parece ser que la degradación se pone a la par con la síntesis. Los astrocitos luego llegan a un equilibrio donde ambos lados de la ecuación aumentan y los niveles de GFAP se estabilizan, pero a un nivel más alto que antes (un resumen de esta hipótesis se muestra en la **Figura 27**). Este descubrimiento tiene implicaciones muy importantes para el campo de terapias, ya que sugiere que si se puede encontrar alguna manera de detener la síntesis, la degradación está preparada para deshacerse del GFAP que ya está presente.



*FIGURA 27: Modelo propuesto para cambios en síntesis y degradación impulsado por la presencia de GFAP mutante. Inicialmente, la síntesis y degradación son equivalentes, así que los niveles de proteína en general se mantienen estables. Todavía desconocemos los detalles de lo que ocurre para alterar este balance, pero la hipótesis es que lo que surge es un periodo en el cual la síntesis excede la degradación (resultando en un aumento en niveles de proteína), y luego la degradación la alcanza y un nuevo, pero más alto equilibrio se mantiene.*

Existe alguna evidencia para decir que incluso bajos niveles de la proteína GFAP mutante puede causar problemas. Todavía no sabemos precisamente a qué nivel comienzan estos problemas (Flint et al., 2012). La supresión de GFAP como estrategia terapéutica es un área de investigación activa, y determinar exactamente cuánta supresión es necesaria es una meta importante de estos estudios.

Cambios en el ambiente extracelular pueden en parte explicar el origen de las convulsiones, uno de los problemas neurológicos más comunes experimentados por individuos con la enfermedad de Alexander. Uno que ha recibido la mayor atención está relacionado a glutamato, un neurotransmisor excitatorio que es absorbido por astrocitos a través de un transportador de proteínas conocido como "Glt-1". En modelos de ratón y tejidos de humanos, los niveles de Glt-1 parecen más bajos de lo normal, un descubrimiento que la enfermedad de Alexander comparte con otros desórdenes neurológicos como esclerosis lateral amiotrófica (Hagemann et al., 2009). Tal disminución en niveles de transportador, si se extiende a una

disminución en función (no probada todavía), podría contribuir a la excitación excesiva de las neuronas alrededor que están expuestas a niveles de glutamato más alto por periodos de tiempo más largos de los que ocurren durante un funcionamiento fisiológico normal (Tian et al., 2010). En otro modelo de ratón de la enfermedad de Alexander, estimulación eléctrica del hipocampo resultó en liberación de adenosina trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés), además de niveles elevados de su producto de descomposición, adenosina (Lee et al., 2013; Fujii et al., 2014). Juntos, estos pueden reflejar alteraciones fundamentales a la fisiología del hipocampo que contribuye, en parte, a aspectos de la enfermedad de Alexander relacionados a las convulsiones y a la cognición.

Como se mencionó anteriormente, ninguno de los modelos existentes de la enfermedad de Alexander muestra evidencia de leucodistrofia. Por lo tanto, actualmente no podemos esclarecer este aspecto clave de la enfermedad humana – ¿cómo los cambios en los genes de astrocitos llevan a efectos secundarios en las células responsables por la creación de mielina, los oligodendrocitos? Algunos han argumentado que los defectos en mielina podrían reflejar la expresión de GFAP en otras células además de astrocitos, como los precursores de oligodendrocitos, pero la evidencia de esto es muy débil. Hasta que no haya mejores modelos de animales y cultivos celulares disponible, no haremos mucho progreso en entender este aspecto de la enfermedad.

#### 4.6 ¿SE PIERDEN ASTROCITOS?

La pregunta de si las mutantes de GFAP causan muerte de astrocitos ha sido una difícil de responder de manera definitiva. Indicios de tal efecto provienen principalmente de estudios hechos en cultivos de células, los cuales por muchas razones son un modelo imperfecto de la enfermedad (Mignot et al., 2007; Cho and Messing, 2009). A pesar de que el modelo de *Drosophila* descrito anteriormente también presenta muerte neuronal inducida por glía como una característica prominente, este también es un modelo imperfecto de la enfermedad humana (Wang et al., 2011). Estudios con muestras de pacientes, casi siempre obtenidas en autopsias, son difíciles de interpretar porque muchos de los cambios observados podrían ser secundarios a otras complicaciones como hipoxia (falta de oxígeno) o convulsiones. Con los modelos de ratón existentes, no se ha observado evidencia de muerte celular (Hagemann et al., 2006). Sin embargo, se están desarrollando modelos de rata que podrían esclarecer esta pregunta.

#### 4.7 ¿SON LAS FIBRAS DE ROSENTHAL TÓXICAS PARA ASTROCITOS?

La pregunta de si las fibras de Rosenthal en sí son buenas o malas para los astrocitos nunca se ha esclarecido. Ciertamente, funcionan como un indicador importante de que algo malo está pasando en la célula, pero uno podría verlas como parte de una respuesta de protección (tal vez secuestrando proteínas de GFAP mutantes del resto de la célula) o alternativamente como tóxicas (como interfiriendo con la maquinaria de degradación de proteínas). A pesar de muchos esfuerzos, e incluso algunas alegaciones, no hay data absolutamente convincente de estudios en cultivo de células o modelos animales (Mignot et al., 2007; Wang et al., 2011). La respuesta a esta pregunta es importante, ya que podría guiar el diseño de experimentos que buscan encontrar



estrategias de tratamiento efectivo. Si uno acepta la idea de que las fibras de Rosenthal son tóxicas, estrategias para reducir el número de fibras son valiosas. Por otro lado, si son protectoras, tratamientos beneficiosos podrían o no coincidir con la reducción de fibras de Rosenthal, y uno podría incluso imaginar intentar aumentar el número.

#### 4.8 ¿PODRÍA ALGUIEN TENER LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER SIN FIBRAS DE ROSENTHAL?

Esta es una pregunta interesante para la cual no sabemos la respuesta. Muchas veces, la solicitud para realizar pruebas genéticas viene de imágenes de MRI, las cuales, de cumplir con el criterio clásico, han demostrado ser altamente confiables para diagnóstico. En algunas situaciones, sin embargo, las imágenes de MRI son equívocas, y se realizan pruebas de GFAP como parte de la búsqueda de un diagnóstico. Por lo tanto, hay muchos pacientes que tienen un diagnóstico de la enfermedad de Alexander adquirido principalmente a base de resultados genéticos, con MRI atípico y sin confirmación de la patología. Ya que la mayoría de las variantes reportadas son “privadas” (es decir, solo se conoce un paciente con la misma mutación), como se explicó anteriormente, todavía se desconoce si todos estos presentan fibras de Rosenthal. La asunción actual es que sí las presentan, pero esta es otra indicación de la necesidad continua de autopsias y donación de tejidos para poder entender el espectro completo de la enfermedad. Es importante notar que, actualmente, neuropatología sin fibras de Rosenthal no llevaría a la consideración de la enfermedad de Alexander como un diagnóstico potencial, o a la recomendación de realizar análisis genético de GFAP. Por lo tanto, hay una parcialidad en contra del descubrimiento de enfermedades causadas por variantes de GFAP que no causan la formación de fibras de Rosenthal.

#### 4.9 ¿PODRÍA ALGUIEN TENER FIBRAS DE ROSENTHAL SIN LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER?

La contestación a esta pregunta es probablemente sí. Jacob et al. (2003) describieron 11 pacientes quienes murieron por una variedad de razones (sin síntomas neurológicos evidentes) y que en la autopsia revelaron abundantes fibras de Rosenthal en sus cerebros. Hay dos explicaciones alternativas para este descubrimiento. Primero, estos individuos pudieron haber cargado variantes de GFAP que, de haber sido conocidas, podrían haber sido consideradas un diagnóstico de la enfermedad de Alexander. Sin embargo, su muerte prematura de otras causas previno la aparición eventual de síntomas relacionados a Alexander. Como se mencionó anteriormente, la edad de aparición para la enfermedad de Alexander es extremadamente variable, extendiéndose hasta los 60 e incluso los 70 (dependiendo del criterio para diagnóstico de Alexander). Es completamente posible que existan muchos individuos en el estado pre-sintomático. Desafortunadamente, no se han realizado estudios genéticos en las personas en este estudio con esta designación de “encefalopatía de fibras de Rosenthal”. Segundo, debemos recordar que las fibras de Rosenthal ocurren en muchas condiciones que no tienen relación con la enfermedad de Alexander (Wippold et al., 2006), y en teoría podrían surgir de aumentos en niveles de GFAP extremos y persistentes, de cualquier causa.



#### 4.10 ¿QUÉ TIENE EN COMÚN LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER CON OTROS DESÓRDENES NEUROLÓGICOS?

Claramente los niveles elevados de GFAP en la enfermedad de Alexander son una característica común para casi todos los desórdenes o lesiones del sistema nervioso central, pero se desconoce si esto en sí causa algún problema. Cuando GFAP tiene una secuencia normal de aminoácidos, solo su expresión a niveles altos lleva a fibras de Rosenthal, y tal vez solo en esos casos el GFAP lleva a la toxicidad. Por lo contrario, en la enfermedad de Alexander algunos GFAP contienen secuencias anormales, lo que posiblemente ejerza algunos de sus efectos a través de mecanismos aparte de simplemente los niveles de GFAP.

No obstante, varios aspectos de la enfermedad de Alexander son compartidos con otras enfermedades neurológicas, y atención a estos puede revelar cómo la enfermedad evoluciona y cómo puede ser tratada. Primero es el diagnóstico característico de las fibras de Rosenthal, lo cual coloca a la enfermedad de Alexander junto a otros desórdenes conocidos que involucran agregación de proteína, como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Huntington. Algo en común que tienen estas enfermedades es la disfunción de la maquinaria de degradación de proteína en la célula, principalmente la proteasoma (Bossy-Wetzel et al., 2004; Zheng et al., 2016).

Otra característica, recientemente descubierta, es la localización errónea y agregación de otra proteína, TDP-43, en el citoplasma de astrocitos (Walker et al., 2014). TDP-43 se encuentra normalmente en el núcleo, pero es modificada y llevada al citoplasma en varios desórdenes. TDP-43 normalmente funciona regulando la expresión de otros ARN mensajeros, quizás algunos miles (Huang et al., 2014), así que cambios en este sistema puede tener un efecto amplio en la función general de los astrocitos. Variantes patogénicas de TDP-43 fueron identificadas en sub-grupos de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica y demencia lobar frontotemporal (Sreedharan et al., 2008).

Finalmente, por su puesto, es disfunción del astrocito. La enfermedad de Alexander es considerada el primer ejemplo de desorden primario de astrocitos (es decir, donde los astrocitos son el origen), pero se cree que la disfunción de astrocitos también juega un papel importante en muchos otros desórdenes neurológicos. Desórdenes neurológicos con comienzo en la adultez que se conocen bien y tienen componentes significativos de astrocitos incluyen la enfermedad de Parkinson (Booth et al., 2017), la enfermedad de Alzheimer (Verkhatsky et al., 2010), la enfermedad de Huntington (Khakh et al., 2017), y esclerosis lateral amiotrófica (Lob-siger and Cleveland, 2007). Desórdenes del neurodesarrollo que inicialmente se manifiestan en la niñez donde la disfunción de astrocitos ha ganado más atención incluyen el síndrome de Rett (Lioy et al., 2011), el síndrome de Down (Nelson et al., 1997), y el síndrome de X frágil (Higashimori et al., 2013). De particular interés son dos leucoencefalopatías donde la disfunción de astrocitos lleva a defectos en la materia blanca, leucoencefalopatía megalencefálica con quistes subcorticales (Leegwater et al., 2001), y enfermedad de sustancia blanca evanescente (Dooves et al., 2016).

Una función de astrocitos que ha recibido la mayor atención es el transporte de glutamato, pero en realidad, la naturaleza de toxicidad de astrocito (ya sea un fallo de función preexistente, como transporte de glutamato, o la adquisición de una nueva función, como la secreción de sustancias tóxicas) es pobremente entendida y asunto de gran interés (Nagai et al., 2007; Liddelw et al., 2017). Claramente será importante ver los avances en entendimiento de estos otros desórdenes para aplicaciones que podrían ser de beneficio para la enfermedad de Alexander.

## CAPÍTULO 5 En Busca de Tratamientos

A pesar de nuestro entendimiento incompleto de exactamente cómo las variantes patogénicas de GFAP llevan a disfunción de astrocitos y las muchas manifestaciones de la enfermedad de Alexander, varias ideas de tratamientos están siendo exploradas, y algunos estudios preliminares en pacientes se han llevado a cabo. La racional (o la falta de) para esta variedad de métodos se discute aquí, con un enfoque primario en aquellos que son aplicables a humanos o modelos animales. Estudios que solo utilizaron modelos de cultivo celular no se incluyeron. Repasos extensos en el tema de terapias para la enfermedad de Alexander ya se han realizado (Messing et al., 2010; Brenner and Messing, 2014).

### 5.1 MÉTODOS PASADOS

En el pasado, ocurrieron dos estrategias de tratamiento en pacientes sin una racional fuerte y no se continúan realizando en la actualidad. En la era pre-genética, un infante recibió un trasplante de médula ósea (Staba et al., 1997), bajo la asunción de que la enfermedad de Alexander compartía similitudes con otras leucodistrofias para las cuales esta estrategia de tratamiento era utilizada (como la leucodistrofia metacromática). La niña falleció 4.5 meses después del trasplante, y ningún otro paciente fue tratado utilizando este método. Más recientemente, una niña de 9 años con el Tipo II de la enfermedad de Alexander fue tratada con hormona liberadora de tirotrópina (TRH, por sus siglas en inglés), basado en indicaciones de un efecto favorable en modelos de ratón de otras enfermedades neurogenéticas (Ishigaki et al., 2006). La naturaleza de ese efecto favorable nunca fue bien definida. Se encontró una mejoría transitoria en su condición, pero luego desapareció durante el periodo de cuatro meses del estudio. Un escrito por los mismos investigadores comentó que otros dos pacientes también fueron tratados con TRH sin mejoría alguna (Yoshida et al., 2011<sup>a</sup>). Actualmente no hay ninguna investigación de TRH como terapia.

### 5.2 IDEAS DE GENÉTICA

Estudios genéticos utilizando modelos de ratón de la enfermedad de Alexander sugieren estrategias interesantes para posibles tratamientos. Ambas involucran la manipulación de genes de respuesta a estrés. Estos son genes que son inducidos en astrocitos y muchas otras células como protección natural contra eventos termales, tóxicos u otros perjudiciales. Dos que son de particular interés en la enfermedad de Alexander son  $\alpha$ B-cristalina y Nrf2. Exactamente por qué estos genes se activan en la enfermedad de Alexander es motivo de debate, pero podría estar relacionado a estrés oxidativo (descrito anteriormente). También ofrecen claves acerca de cómo uno podría contrarrestar los efectos de GFAP mutante en astrocitos.

#### 5.2.1 $\alpha$ B-cristalina

$\alpha$ B-cristalina, también conocida como “proteína de choque térmico B5” (HSPB5, por sus siglas en inglés) y *CRYAB*, es una proteína que fue originalmente aislada del lente, pero luego se encontró que está mucho más distribuida en el cuerpo. En el sistema nervioso, los astrocitos normalmente producen niveles bajos, donde se enlaza a GFAP y ayuda a regular su ensamblaje de filamentos

maduros. Goldman y colegas encontraron que  $\alpha$ B-cristalina es un componente principal de las fibras de Rosenthal en la enfermedad de Alexander, donde parece quedar atrapada durante el proceso de agregación (Iwaki et al., 1989). Basado en el trabajo de los laboratorios de Goldman y Quinlan sugiriendo que  $\alpha$ B-cristalina puede promover el desmontaje de los filamentos de GFAP y disolver los agregados (Nicholl and Quinlan, 1994; Koyama and Goldman, 1999), el laboratorio de Messing examinó si elevar los niveles de  $\alpha$ B-cristalina artificialmente en astrocitos de modelos de ratón sería de beneficio. Estos investigadores comenzaron creando ratones que producen  $\alpha$ B-cristalina extra en astrocitos, y luego cruzándolos con modelos de ratón de la enfermedad de Alexander. En el modelo de ratón más severamente afectado, el cual típicamente muere a  $\sim$  4 semanas de edad, altos niveles de  $\alpha$ B-cristalina rescataron al ratón del efecto letal (Hagemann et al., 2009). Queda por verse si estos resultados se pueden trasladar a un tratamiento que pueda ser probado en humanos.

### 5.2.2 Nrf2

Nrf2 es un “factor de transcripción” que normalmente funciona enlazándose a regiones reguladoras de genes para controlar la expresión de dichos genes. Como  $\alpha$ B-cristalina, Nrf2 es un gen de respuesta a estrés que es activado por una variedad de insultos a la célula, y, a su vez activa la expresión de muchos genes de procesos siguientes que actúan juntos para amortiguar los efectos de la lesión. Similar al experimento con ratones y  $\alpha$ B-cristalina descrito anteriormente, el laboratorio de Messing también generó cepas separadas de ratones que artificialmente producen altos niveles de Nrf2 en astrocitos. Cuando son cruzados con ratones que llevan las mutaciones de GFAP en la enfermedad de Alexander, el Nrf2 extra probó ser de beneficio, en parte reduciendo los niveles de GFAP (LaPash Daniels et al., 2012). La activación de Nrf2 es un tema de gran interés para otras enfermedades neurológicas, y programas extensivos de desarrollo de drogas se están llevando a cabo en la industria farmacéutica para desarrollar compuestos que actúen en este objetivo (Johnson and Johnson, 2015). Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha llegado a la etapa de uso clínico. Es interesante que una droga aprobada recientemente para uso en esclerosis múltiple, dimetilfumurato, se presume actúa a través de la vía de Nrf2 (Linker et al., 2011), pero faltan pruebas de este concepto en humanos.

## 5.3 PRUEBAS DE CANDIDÁTOS ESPECÍFICOS DE MEDICAMENTOS

Basado en entendimiento emergente de mecanismos básicos de la enfermedad de Alexander, dos estudios se enfocaron en medicamentos específicos que podrían actuar en estas vías de manera beneficiosa. El primero es ceftriaxona, un antibiótico de la familia de penicilina ampliamente utilizado para tratar enfermedades infecciosas. Experimentos utilizando modelos de ratones al igual que muestras de cerebro de pacientes de la enfermedad de Alexander identificaron una disminución en la proteína de astrocitos, Glt-1, la cual es normalmente responsable de transportar el aminoácido pequeño glutamato a través de la membrana del astrocito (Hagemann et al., 2009; Tian et al., 2010). Se cree que los astrocitos cuidadosamente controlan los niveles de glutamato en el espacio sináptico removiéndolo luego de que es liberado de las neuronas. Demasiado glutamato podría en cambio llevar a enlace excesivo a sus receptores en las neuronas, demasiada excitación, y potencialmente muerte neuronal debido a “excitotoxicidad” (Lipton y Rosenberg, 1994). Por lo tanto, por extensión, muy poco Glt-1 podría

llevar a muerte de neuronas. Este mecanismo de disfunción de astrocitos causando muerte neuronal ha sido propuesto anteriormente para otra enfermedad neurodegenerativa, esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés) (Rothstein et al., 1995). Con esta idea en mente, Rothstein y colegas buscaron medicamentos que pudieran aumentar la producción de Glt-1 en cultivo de tejidos de médula espinal de ratón, e identificaron a ceftriaxona como candidato (Rothstein et al., 2005).

Uniendo estas dos ideas – que la reducción de Glt-1 en la enfermedad de Alexander puede ser la causa de muchos de los problemas, y que la ceftriaxona puede estimular Glt-1 – Sechi y colegas iniciaron un ensayo de este medicamento en un paciente con comienzo de la enfermedad en la adultez. En este estudio no ciego (es decir, ambos el paciente y los doctores sabían que se estaba administrando la droga), se notó una mejoría modesta en algunos, pero no todos los síntomas a los 20 meses (Sechi et al., 2010). Subsecuentemente, los mismos investigadores reportaron un seguimiento a los 4 años de haber comenzado el tratamiento, y alegaron mejoría continua (con algunos de los investigadores haciendo las pruebas sin saber el historial del tratamiento) (Sechi et al., 2013). En conjunto, este estudio de un solo paciente es difícil de interpretar, ya que se conoce que la severidad de los síntomas puede fluctuar y algunos pacientes han experimentado recuperación espontánea a través de periodos de tiempo más largos (Messing et al., 2012b; Namekawa et al., 2012). La ceftriaxona es complicada por requerir una ruta de administración intravenosa, algunas veces realizada a diario, lo cual puede ser difícil de sostener por largos periodos de tiempo. Aunque nunca se publicó, algunos años de esfuerzo en el laboratorio de Messing para demostrar experimentalmente un beneficio de ceftriaxona en modelos de ratón de la enfermedad de Alexander no lograron mostrar ningún efecto, y fueron abandonados por el grupo.

Una serie de pistas totalmente diferentes acerca del control de niveles de GFAP llevó a probar el litio como tratamiento para la enfermedad de Alexander. El litio es un metal alcalino que ha sido utilizado en forma de sal desde la antigüedad en una variedad de escenarios. Todavía se usa ampliamente en trastorno bipolar y otros desórdenes psiquiátricos. El litio tiene muchos efectos diferentes al nivel celular y molecular, y desde luego la base para su eficacia en psiquiatría todavía es motivo de debate, pero dos de estos efectos fueron considerados potencialmente útiles en el contexto de la enfermedad de Alexander. Como se mencionó anteriormente, la acumulación de GFAP a niveles tóxicos es una de las hipótesis principales para explicar la patología y disfunción neurológica de la enfermedad de Alexander, y la acumulación se cree (o se creía) que refleja una combinación de un aumento en síntesis y una disminución en degradación. A través de los años, muchos otros estudios en diferentes tipos de células y enfermedades revelaron que el litio, al menos en teoría, podía actuar para disminuir la síntesis (vía Stat3) y aumentar la degradación (a través de autofagia) de GFAP. Como fue reportado por La Pash Daniels et al. (2015), la administración de litio a ratones a través de la comida por un periodo de cuatro semanas reduce los niveles de GFAP en múltiples áreas del cerebro y la médula espinal, probablemente a través de la inhibición de síntesis. Sin embargo, las reducciones fueron relativamente modestas (~10-30%), y ocurrieron dentro de un rango estrecho de concentraciones de droga, por debajo del cual no hubo ningún efecto y por encima del cual hubo un aumento en mortalidad. Esta ventana estrecha de tratamiento para litio es bien conocida en

la comunidad de psiquiatría, y ya es una limitación principal en su uso. Basado en estas consideraciones (el efecto modesto y los problemas de seguridad), el litio no avanzó a estudios en humanos para la enfermedad de Alexander.

En la descripción original del modelo de *Drosophila*, Wang et al. (2011) demostraron efectos beneficiosos de la vitamina E al igual que el compuesto conocido como 17-AAG (una variación de geldanamicina), este último siendo probado como tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, no se han realizado estudios de ninguno de estos compuestos en modelos de ratón de la enfermedad.

#### 5.4 PRUEBAS IMPARCIALES DE MEDICAMENTOS

Una alternativa al método de genes candidatos, y una que no requiere ninguna presuposición acerca del mecanismo subyacente es el de “pruebas imparciales de medicamentos”. Colecciones de medicamentos que ya han sido aprobadas para uso humano por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) están disponibles a través de suplidores comerciales en formatos que son adaptables a una variedad de pruebas. Utilizando cultivo de células de cerebros de uno de los modelos de ratón de la enfermedad de Alexander, Cho et al. (2010) buscaron identificar medicamentos aprobados por la FDA que redujeran los niveles de GFAP en astrocitos. Un número de compuestos interesantes que parecían prometedores fueron encontrados, y en algunos casos, cumplieron con las pruebas más rigurosas de eficacia *in vivo* al reducir niveles de GFAP en el cerebro de ratones que recibieron inyecciones intraperitoneales. Sin embargo, estudios subsecuentes utilizando ratones con GFAP mutado (con niveles elevados en el cerebro) fallaron en replicar los primeros estudios que utilizaron ratones normales.

Utilizando el modelo de *Drosophila* descrito anteriormente, Wang et al. (2016) llevó a cabo una prueba similar, pero con animales vivos en vez de cultivos de células. Al exponer moscas individuales a uno de 1987 compuestos, y luego examinar sus cerebros para reducciones en una medida de muerte celular (activación de caspasa), estos investigadores identificaron siete compuestos que mostraron el efecto deseado. Un compuesto, glicopirrolato, implicaba el sistema colinérgico (el cual depende de acetilcolina como neurotransmisor en sinapsis) como una nueva vía de disfunción que requería más estudios. La ventaja del modelo de mosca para este tipo de estudio es que se realizó *in vivo*, pero la desventaja, mencionada anteriormente, es que las moscas no son una copia genética exacta de la enfermedad humana y tienen varios aspectos artificiales que se deben mantener en mente.

#### 5.5 TERAPIA ANTISENTIDO

Al presente (finales del 2017), la estrategia más prometedora para tratamiento parece ser terapia antisentido. Este método toma ventaja de la habilidad de sintetizar hebras cortas de ADN que específicamente reconocen el ARN mensajero específico y promueven su destrucción. De esta forma, una reducción de ARN mensajero de GFAP llevaría a una reducción de la proteína de GFAP. Se espera que esto pueda reducir los efectos tóxicos de ambos, el exceso de GFAP y el

GFAP mutante que presuntamente son la raíz de todos los problemas en la enfermedad de Alexander. Resultados prometedores han comenzado a surgir de dichos estudios utilizando modelos de ratón de la enfermedad de Alexander (Powers et al., 2016).

El atractivo a largo plazo de estas estrategias de antisentido es que interrumpen el proceso de enfermedad desde el comienzo, previniendo la producción de GFAP anormal. Por lo tanto, todos los efectos futuros, para ambas neuronas y oligodendrocitos, deberían presuntamente desaparecer. Deberíamos reconocer que pruebas de riesgo actuales se basan en las consecuencias benignas de la deficiencia de GFAP en roedores, la cual no predice a totalidad los efectos de esta misma deficiencia en humanos. Solo ensayos clínicos apropiados de Fase I que cuidadosamente evalúen la seguridad en pacientes humanos pueden contestar esta pregunta.

## 5.6 ¿HAY ALGÚN ROL PARA LAS CÉLULAS MADRE Y TRANSPLANTE DE CÉLULAS?

Las células madre que tienen el potencial de repoblar el cerebro ya pueden ser aisladas en cultura y expandidas como una opción terapéutica potencial para reemplazar tipos de células que se pierden en enfermedad. Dichas células madre han encontrado una amplia aplicación fuera del sistema nervioso, comenzando hace décadas con el trasplante de médula ósea para corregir una variedad de desórdenes en la sangre y más recientemente con investigaciones activas en desórdenes del páncreas, hígado, y corazón. En el sistema nervioso central, trasplante celular para la enfermedad de Parkinson ha ganado mucho interés. Entre las leucodistrofias, se llevó a cabo un estudio para probar el uso de células progenitoras de oligodendrocitos derivadas de células madre embrionarias para el tratamiento de la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (Gupta et al., 2012). Este desorden resulta de variantes en PLP, o proteína proteolipídica, una proteína componente en la capa de mielina que envuelve a los axones. Este fue un ensayo de Fase I principalmente dirigido a establecer seguridad, pero ninguna conclusión fue posible con relación a eficacia.

Para la enfermedad de Alexander, células madre derivadas de muestras de sangre o piel de un paciente y convertidas a estado embrionario (“células madre pluripotentes inducidas”, o células IPS, por sus siglas en inglés, ver sección 4.4.2) están siendo utilizadas activamente en estudios de mecanismos básicos de la enfermedad. Sin embargo, su explotación como un potencial tratamiento está a muchos años e incluso décadas en el futuro. Queda mucho por aprender acerca de los riesgos asociados con dichos trasplantes de células madre al cerebro o médula espinal (podrían formar tumores, por ejemplo), y al presente es incierto si se pierden astrocitos en la enfermedad de Alexander además de ser disfuncionales. Los trasplantes de células tienen un razonamiento más fuerte cuando van dirigidos a reemplazar poblaciones de células que están deficientes en números, pero menor cuando se enfrentan con una población residente que no desaparece. Es interesante que un estudio de células madre humanas trasplantadas al sistema nervioso central de un modelo de ratón con un defecto genético en mielina mostró repoblación extendida de oligodendrocitos humanos, aparentemente desplazando los oligodendrocitos de ratón residentes (Windrem et al., 2008). Todavía se desconoce si una estrategia de trasplante dirigida a reemplazar astrocitos es posible.

Un escenario más probable para la enfermedad de Alexander, en el futuro inmediato, es diseñar un tratamiento que arregle los problemas iniciales con los astrocitos, y solo entonces considerar reparar la mielina ya sea a través de la estimulación de células madre residentes, o trasplante de progenitores gliales para repoblar oligodendrocitos. Como con otros desórdenes del sistema nervioso central, si hay alguna pérdida secundaria o degeneración de axones, estos son déficits que serían mucho más difícil de corregir. Por lo tanto, en el 2017, no hay razones convincentes para terapias de células madre.



## **CAPÍTULO 6: Conclusiones**

A pesar de los avances significativos en el entendimiento de la enfermedad de Alexander en los últimos 20 años, todavía quedan muchas preguntas importantes y fundamentales. Todavía no sabemos cuál de las funciones críticas de astrocitos se vuelve deficiente. Todavía no sabemos exactamente cómo cambios en la secuencia de aminoácidos de GFAP afectan a los astrocitos. Hemos hecho esencialmente ningún progreso en el entendimiento de por qué esto es una leucodistrofia, con cambios dramáticos en oligodendrocitos y/o mielina. ¿Por qué algunas áreas del cerebro y la médula espinal son selectivamente afectadas cuando los astrocitos (y el GFAP) están presente a través de todo el sistema nervioso central? Estas son solo algunas de las preguntas claves que esperamos se contesten en los próximos años. Aquí brevemente discutimos otro rompecabezas – ¿por qué hay tantas diferencias entre pacientes quienes según todas las otras medidas tienen la misma enfermedad?

### **6.1 VARIABILIDAD - ¿POR QUÉ ES LA ENFERMEDAD SEVERA EN ALGUNOS, Y MÁS LEVE EN OTROS?**

Uno de los aspectos más confusos de la enfermedad de Alexander es que las variantes en un solo gen, afectando células que están ampliamente distribuidas en el sistema nervioso central, pueden tener un efecto tan variable en términos de severidad y tipos de síntomas. Incluso dentro de la misma familia, con herencia de la misma mutación, puede haber amplia variabilidad. Por ejemplo, Zang et al., (2013) reportaron una familia con un niño que tuvo un inicio de la enfermedad a los 8 años de edad mientras la madre, con la misma variante (Arg79His), no mostraba síntomas a los 29 años (aunque sí mostraba anormalidades en el MRI). De las variantes patogénicas, Arg75His y Arg416Trp son particularmente variables en sus efectos, con edades de inicio reportadas variando desde el nacimiento hasta 36 años (Arg79His) y de 3 meses a 45 años (Arg416Trp). Esta interrogante ha impulsado la búsqueda de modificadores, ambos genéticos y ambientales, que puedan influenciar el curso de la enfermedad.

#### **6.1.1 Modificadores Ambientales**

Hay varios candidatos de modificadores ambientales, pero ninguno ha sido probado experimentalmente en modelos de animales de la enfermedad. Estos incluyen trauma a la cabeza (Ayaki et al., 2010; Namekawa et al., 2010), fiebre (Ayaki et al., 2010; Zang et al., 2013), y alcohol (Schmidt et al., 2013). Por ejemplo, el paciente descrito por Schmidt et al. (2013) era un adulto quien experimentó una aparición repentina de síntomas luego de un episodio de consumo compulsivo de alcohol, y nunca se recuperó. Cotrina et al. (2014) sometieron a modelos de ratón de la enfermedad de Alexander a lesiones cerebrales traumáticas, esperando ver un aumento en la susceptibilidad a convulsiones post-trauma. A pesar de que los ratones con la mutación sí mostraron anormalidades pre-existentes en sus grabaciones de EEG (descritas como “sub-convulsivas”, o no llegando al nivel de convulsiones obvias), no fueron diferentes a los ratones normales en el desarrollo de convulsiones luego de la lesión.

### 6.1.2 Modificadores Genéticos

Los modificadores genéticos son una alternativa para explicar las diferencias entre individuos quienes podrían compartir la misma variante de GFAP, pero diferir en muchos de los otros ~20,000 genes en sus genomas. La posibilidad de la existencia de estos se puede inferir de la situación opuesta de gemelos idénticos. Tres pares han sido descritos en la literatura, y al comparar el curso de sus enfermedades es sorprendente cuan similar es cada uno de estos gemelos a su hermano (Meins et al., 2002; Shi-roma et al., 2003; Li et al., 2005). Por lo tanto, cuando el resto del genoma es igual, el curso de la enfermedad es igual. Por lo contrario, se conocen gemelos fraternos (pero no identificados en las publicaciones relevantes por motivos de privacidad) y muestran cursos muy diferentes.

Dando seguimiento a la hipótesis de que el nivel de acumulación de GFAP es un determinante clave de la severidad de la enfermedad, dos grupos han alegado que una variante en la región reguladora secuencia arriba del gen de *GFAP* podría contribuir a la variabilidad observada en la población de pacientes. Se alega que esta variante altera la afinidad de enlace para un factor de transcripción (proteína reguladora) llamado “AP-1”, y por ende influencia el nivel de actividad del gen y últimamente la producción de la proteína (Bachetti et al., 2010). Yoshida et al. (2013), en un estudio de 10 pacientes con inicio en la adultez, presentaron evidencia de que la variante que se creía causaba altos niveles de expresión estaba asociada con un inicio más temprano y una progresión más rápida. Esta conclusión estaba basada en el curso de la enfermedad de tres de los cuatro pacientes para quienes ambas copias de *GFAP* contenían la variante. Se debe aclarar que estos descubrimientos son extremadamente preliminares y sujetos a debate considerable, y esperan ser replicados por otros grupos en una serie más grande de pacientes.

Ya se están llevando a cabo evaluaciones de genoma completo para identificar modificadores genéticos en modelos de mosca y ratón. El primer resultado de surgir de estos modelos genéticos poderosos proviene de las moscas, donde la delección del gen de sintasa de óxido nítrico significativamente reduce la toxicidad glial para neuronas (Wang et al., 2015). En última instancia, la esperanza es que a través de la identificación de estos modificadores mejoraremos la habilidad de ofrecer predicciones acerca del curso futuro para pacientes individuales además de descubrir nuevas formas posibles de tratar la enfermedad.

## 6.2 ¿PODEMOS CURAR LA ENFERMEDAD DE ALEXANDER?

Para ser honesto, probablemente no, o al menos no en el futuro cercano. Pero las curas son solo posibles algunas veces en la medicina, y es importante distinguir entre tratamientos y curas. Las curas eliminan una enfermedad de forma permanente. Gracias a la era de los antibióticos, uno puede ser curado de muchas enfermedades causadas por bacterias y algunos virus. En algunos casos de cáncer, las células cancerosas son completamente eliminadas del cuerpo, y el largo de la vida se vuelve indistinguible de aquellos quienes nunca tuvieron un diagnóstico de cáncer.

En el caso de la enfermedad de Alexander, la meta realista para el futuro inmediato es encontrar tratamientos en vez de curas, unos que puedan modificar el curso de la enfermedad y mejorar la calidad de vida. Al final, podríamos mirar a un futuro en el cual métodos nuevos de edición de genes u otras técnicas podrían permitir la corrección de los cambios en la secuencia de ADN del gen de GFAP que lleva a la enfermedad de Alexander (Suzuki et al., 2016). La tecnología para lograr este reto probablemente tenga su primera aplicación en desórdenes de la médula ósea y sangre, similar a los orígenes de trasplantes en medicina, donde las células se pueden remover del cuerpo, modificar, y luego re-introducir. Sin embargo, el sistema nervioso central y los astrocitos presentan un reto adicional el cual debe ser sobrellevado para que esta estrategia se vuelva una realidad para la enfermedad de Alexander. Ya sabemos la causa genética de la (mayoría) enfermedad de Alexander. Estamos comenzando a entender los mecanismos. Estos son primeros pasos esenciales.

Los astrocitos llevan su nombre debido a su parecido a las estrellas. Cerramos con un mensaje de esperanza de un astrónomo pionero:

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”

Carl Sagan

## Otros Recursos y Organizaciones

Actualmente no existen organizaciones o fundaciones que se dediquen exclusivamente a la enfermedad de Alexander. La Fundación Unida de Leucodistrofias (ulf.org) en los Estados Unidos y la Asociación Europea de Leucodistrofias en Europa (ela-asso.com) son organizaciones sombrilla que incluyen a la enfermedad de Alexander entre sus intereses. Dos fuentes de información confiables que están disponibles en el internet, aunque principalmente dirigidas a una audiencia de médicos, son las siguientes:

Online Mendelian Inheritance in Man (<https://omim.org/entry/203450>)

Gene Reviews (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1172/>).

La página web de la enfermedad de Alexander del Centro Waisman de la Universidad de Wisconsin-Madison también mantiene una bibliografía virtual completa de publicaciones de investigación y una lista actualizada de variantes (además de enlaces a la literatura): [www.waisman.wisc.edu/alexander](http://www.waisman.wisc.edu/alexander)

## Agradecimientos

Estoy agradecido con los muchos estudiantes, colaboradores, y especialmente pacientes y familias que contribuyeron y apoyaron nuestro trabajo. Los fondos para nuestra investigación en GFAP y la enfermedad de Alexander provienen principalmente de Los Institutos Nacionales de Salud (NICHD, NINDS), el Waisman Center, y el Juanma Fund. Apoyo adicional ha sido provisto por el Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF), el Jelte Rijkaart Fund, el Palamaro Fund, Elise's Corner, la United Leukodystrophy Foundation, y Children Living with Inherited Metabolic Disease. De igual manera, gracias a Jennifer Belton, Phil Blake, Maureen Durkin, Michael Jaynes, Marsha Mailick, y Robert Steiner por comentar en un borrador, aunque los errores son solo del autor. Estoy particularmente agradecido con los miembros que llevan mucho tiempo en mi laboratorio, Tracy Hagemann y Denice Springman, y con mi esposa, MRM, por su consejo, amor, y paciencia.

Este libro es dedicado a la memoria de María Antonia Fenoy Ramon, la madre de un niño con la enfermedad de Alexander, cuya visión increíble y esfuerzo para recaudar fondos permitieron mucho del progreso que fue descrito en este libro.

Todas las regalías al autor que procedan de este libro serán donadas para apoyar la investigación de la enfermedad de Alexander.



## References

- Abbott, N.J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629–638. doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x
- Adermark, L., and Bowers, M.S. (2016). Disentangling the role of astrocytes in alcohol use disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 40, 1802–1816. doi:10.1111/acer.13168
- Alexander, W.S. (1949). Progressive fibrinoid degeneration of fibrillary astrocytes associated with mental retardation in a hydrocephalic infant. *Brain* 72, 373–381. doi:10.1093/brain/72.3.373
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y.L., Ao, Y., O’Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195–+. doi:10.1038/nature17623
- Apte, M.V., Haber, P.S., Applegate, T.L., Norton, I.D., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., and Wilson, J.S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas—identification, isolation, and culture. *GUT* 43, 128–133. doi:10.1136/gut.43.1.128
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22, 208–215. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
- Ayaki, T., Shinohara, M., Tatsumi, S., Namekawa, M., and Yamamoto, T. (2010). A case of sporadic adult Alexander disease presenting with acute onset, remission and relapse. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 1292–1293. doi:10.1136/jnnp.2009.178079
- Bachetti, T., Di Zanni, E., Lantieri, F., Caroli, F., Regis, S., Filocamo, M., Rainero, I., Gallone, S., Cilia, R., Romano, S., Savoiaro, M., Pareyson, D., Biancheri, R., Ravazzolo, R., and Ceccherini, I. (2010). A novel polymorphic AP-1 binding element of the GFAP promoter is associated with different allelic transcriptional activities. *Ann Hum Genet* 74, 506–515.
- Balbi, P., Salvini, S., Fundarò, C., Frazzitta, G., Maestri, R., Mosah, D., Uggetti, C., and Sechi, G. (2010). The clinical spectrum of late-onset Alexander disease: a systematic literature review. *J Neurol* 257, 1955–1962. doi:10.1007/s00415-010-5706-1
- Barczykowski, A.L., Foss, A.H., Duffner, P.K., Yan, L., and Carter, R.L. (2012). Death rates in

- the U.S. due to Krabbe disease and related leukodystrophy and lysosomal storage diseases. *Am J Med Genet A* 158A, 2835–2842. doi:10.1002/ajmg.a.35624
- Barkovich, A.J., and Messing, A. (2006). Alexander disease: not just a leukodystrophy anymore. *Neurology* 66, 468–469. doi:10.1212/01.wnl.0000200905.43191.4d
- Becker, L.E., and Teixeira, F. (1988). Alexander's disease. In *The Biochemical Pathology of Astrocytes*, M.D. Norenberg, L. Hertz, and A. Schousboe, eds. (New York, Alan R. Liss, Inc.), pp. 179–190.
- Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18, 31–41.
- Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., Baldoli, C., Martino, S., Calabria, A., Canale, S., Benedicenti, F., Vallanti, G., Biasco, L., Leo, S., Kabbara, N., Zanetti, G., Rizzo, W.B., Mehta, N.A.L., Cicalese, M.P., Casiraghi, M., Boelens, J.J., Del Carro, U., Dow, D.J., Schmidt, M., Assanelli, A., Neduva, V., Di Serio, C., Stupka, E., Gardner, J., von Kalle, C., Bordignon, C., Ciceri, F., Rovelli, A., Roncarolo, M.G., Aiuti, A., Sessa, M., and Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 341, 864–U858. doi:10.1126/science.1233158
- Blechingberg, J., Holm, I.E., Nielsen, K.B., Jensen, T.H., Jørgensen, A.L., and Nielsen, A.L. (2007). Identification and characterization of GFAP- $\kappa$ , a novel glial fibrillary acidic protein isoform. *Glia* 55, 497–507.
- Bomont, P., Cavalier, L., Blondeau, F., Hamida, C.B., Belal, S., Tazir, M., Demir, E., Topaloglu, H., Korinthenberg, R., Tuysuz, B., Landrieu, P., Hentati, F., and Koenig, M. (2000). The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. *Nat Genet* 26, 370–374.
- Booth, H.D.E., Hirst, W.D., and Wade-Martins, R. (2017). The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis. *Trends Neurosci* 40, 358–370.
- Bossy-Wetzell, E., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S.A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, S2–S9. doi:10.1038/nm1067
- Bouameur, J.E., and Magin, T.M. (2017). Lessons from animal models of cytoplasmic intermediate filament proteins. *Subcell Biochem* 82, 171–230. doi:10.1007/978-3-319-49674-0\_7
- Brenner, M. (1994). Glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Brain Pathol* 4, 219–220. doi:10.1111/j.1750-3639.1994.tb00836.x
- Brenner, M., Goldman, J.E., Quinlan, R.A., and Messing, A. (2009). Alexander disease: a genetic disorder of astrocytes. In *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*, V. Parpura, and P.G. Haydon, eds. (New York, Springer), pp. 591–648. doi:10.1016/B978-0-12-809324-5.00468-5

- Brenner, M., Johnson, A.B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J.E., and Messing, A. (2001). Mutations in *GFAP*, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27, 117–120.
- Brenner, M., and Messing, A. (2014). Alexander disease and astrotherapeutics. In *Pathological Potential of Neuroglia*, V. Parpura, and A. Verkhratsky, eds. (New York, Springer Science+ Business Media), pp. 89–105. doi:10.1007/978-1-4939-0974-2\_5
- Cajal, S.R. (1909). *Histologie du Système Nerveux de l'Homme & des Vertébrés* (Paris, Maloine).
- Camargo, N., Goudriaan, A., van Deijk, A.L.F., Otte, W.M., Brouwers, J.F., Lodder, H., Gutmann, D.H., Nave, K.A., Dijkhuizen, R.M., Mansvelder, H.D., Chrast, R., Smit, A.B., and Verheijen, M.H.G. (2017). Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids. *PLoS Biol* 15. doi:10.1371/journal.pbio.1002605
- Cartier, N., Hacin-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrère, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Le-boulch, P., l'Homme, B., Bougnères, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., and Aubourg, P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823. doi:10.1126/science.1171242
- Castellani, R.J., Perry, G., Brenner, D.S., and Smith, M.A. (1999). Alexander disease: Alzheimer disease of the developing brain? *Alzheimer Dis Assoc Disord* 13, 232–235. doi:10.1097/00002093-199910000-00010
- Castellani, R.J., Perry, G., Harris, P.L.R., Monnier, V.M., Cohen, M.L., and Smith, M.A. (1997). Advanced glycation modification of Rosenthal fibers in patients with Alexander disease. *Neurosci Lett* 231, 79–82. doi:10.1016/S0304-3940(97)00521-1
- Chan, Y., Anton-Lamprecht, I., Yu, Q.C., Jäckel, A., Zabel, B., Ernst, J.P., and Fuchs, E. (1994). A human keratin 14 “knockout”: The absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes Dev* 8, 2574–2587.
- Chen, N., Sugihara, H., Kim, J., Fu, Z., Barak, B., Sur, M., Feng, G., and Han, W. (2016). Direct modulation of GFAP-expressing glia in the arcuate nucleus bi-directionally regulates feeding. *Elife* 5, e18716. doi:10.7554/eLife.18716
- Chen, Y.S., Lim, S.C., Chen, M.H., Quinlan, R.A., and Perng, M.D. (2011). Alexander disease causing mutations in the C-terminal domain of GFAP are deleterious both to assembly and network formation with the potential to both activate caspase 3 and decrease cell viability. *Exp Cell Res* 317, 2252–2266. doi:10.1016/j.yexcr.2011.06.017



- Cho, W., Brenner, M., Peters, N., and Messing, A. (2010). Drug screening to identify suppressors of GFAP expression. *Hum Mol Genet* 19, 3169–3178. doi:10.1093/hmg/ddq227
- Cho, W., and Messing, A. (2009). Properties of astrocytes cultured from GFAP over-expressing and GFAP mutant mice. *Exp Cell Res* 315, 1260–1272. doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.012
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C.A., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B.A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421–433. doi:10.1016/j.cell.2004.12.020
- Chung, W.S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C.F., Smith, S.J., and Barres, B.A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–+. doi:10.1038/nature12776
- Condorelli, D.F., Nicoletti, V.G., Barresi, V., Conticello, S.G., Caruso, A., Tendi, E.A., and Stella, A.M.G. (1999). Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *J Neurosci Res* 56, 219–228. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990501)56:3%3C219::AID-JNR1%3E3.0.CO;2-2
- Cotrina, M.L., Chen, M., Han, X., Iliff, J., Ren, Z., Sun, W., Hagemann, T., Goldman, J., Messing, A., and Nedergaard, M. (2014). Effects of traumatic brain injury on reactive astrogliosis and seizures in mouse models of Alexander disease. *Brain Res* 1582, 211–219. doi:10.1016/j.brainres.2014.07.029
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A.S., and Fuchs, E. (1991). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 66, 1301–1311. doi:10.1016/0092-8674(91)90051-Y
- Coulter, D.A., and Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60, 1215–1226. doi:10.1002/glia.22341
- Cox, N.R., Kwapien, R.P., Sorjonen, D.C., and Braund, K.G. (1986). Myeloencephalopathy resembling Alexander's disease in a Scottish terrier dog. *Acta Neuropathol (Berl)* 71, 163–166.
- Crome, L. (1953). Megaloencephaly associated with hyaline pan-neuropathy. *Brain* 76, 215–228.
- Crow, J.F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 1, 40–47. doi:10.1038/35049558
- Cui, W., Mizukami, H.P., Yanagisawa, M., Aida, T., Nomura, M., Isomura, Y., Takayanagi, R., Ozawa, K., Tanaka, K., and Aizawa, H. (2014). Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance. *J Neurosci* 34, 16273–16285. doi:0.1523/JNEUROSCI.1465-14.2014

- De Gobbi, M., Viprakasit, V., Hughes, J.R., Fisher, C., Buckle, V.J., Ayyub, H., Gibbons, R.J., Vernimmen, D., Yoshinaga, Y., de Jong, P., Cheng, J.F., Rubin, E.M., Wood, W.G., Bowden, D., and Higgs, D.R. (2006). A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science* 312, 1215–1217. doi:10.1126/science.1126431
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716. doi:10.1016/S0092-8674(00)80783-7
- Dooves, S., Bugiani, M., Postma, N.L., Polder, E., Land, N., Horan, S.T., van Deijk, A.L.F., van de Kreeke, A., Jacobs, G., Jacobs, G., Vuong, C., Klooster, J., Kamermans, M., Wortel, J., Loos, M., Wisse, L.E., Scheper, G.C., Abbink, T.E.M., Heine, V.M., and van der Knaap, M.S. (2016). Astrocytes are central in the pathomechanisms of vanishing white matter. *J Clin Invest* 126, 1512–1524. doi:10.1172/JCI83908
- Duckett, S., Schwartzman, R.J., Osterholm, J., Rorke, L.B., Friedman, D., and McLellan, T.L. (1992). Biopsy diagnosis of familial Alexander’s disease. *Pediatr Neurosurg* 18, 134–138.
- Elsayed, M., and Magistretti, P.J. (2015). A new outlook on mental illnesses: glial involvement beyond the glue. *Front Cell Neurosci* 9, 468. doi:10.3389/fncel.2015.00468
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res* 25, 1439–1451.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28, 351–354. doi:10.1016/0006-8993(71)90668-8
- Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.-M., and Goldman, R.D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119, 1763–1771. doi:10.1172/JCI38339
- Fankhauser, R., Fatzer, R., Bestetti, G., Deruaz, J.P., and Perentes, E. (1980). Encephalopathy with Rosenthal fibre formation in a sheep. *Acta Neuropathol (Berl)* 50, 57–60. doi:10.1007/BF00688535
- Farina, L., Pareyson, D., Minati, L., Ceccherini, I., Chiapparini, L., Romano, S., Gambaro, P., Fancellu, R., and Savoiano, M. (2008). Can MR imaging diagnose adult-onset Alexander disease? *Am J Neuroradiol* 29, 1190–1196. doi:10.3174/ajnr.A1060
- Ferreira, M.C., Dorboz, I., Rodriguez, D., and Boespflug-Tanguy, O. (2015). Screening for GFAP rearrangements in a cohort of Alexander disease and undetermined leukoencephalopathy patients. *Eur J Med Genet* 58, 466–470. doi:10.1016/j.ejmg.2015.07.002
- Flint, D., Li, R., Webster, L.S., Naidu, S., Kolodny, E., Percy, A., van der Knaap, M., Powers, J.M., Mantovani, J.F., Ekstein, J., Goldman, J.E., Messing, A., and Brenner, M. (2012). Splice site, frameshift and chimeric *GFAP* mutations in Alexander disease. *Hum Mutat* 11, 1141–1148.

- Franzoni, E., van der Knaap, M.S., Errani, A., Colonnelli, M.C., Bracceschi, R., Malaspina, E., Moscano, F.C., Garone, C., Sarajlija, J., Zimmerman, R.A., Salomons, G.S., and Bernardi, B. (2006). Unusual diagnosis in a child suffering from juvenile Alexander disease: Clinical and imaging report. *J Child Neurol* 21, 1075–1080. doi:10.1177/7010.2006.00235
- Friede, R.L. (1964). Alexander's disease. *Arch Neurol* 11, 414–422. doi:10.1007/978-3-642-73697-1\_43
- Fujii, S., Tanaka, K.F., Ikenaka, K., and Yamazaki, Y. (2014). Increased adenosine levels in mice expressing mutant glial fibrillary acidic protein in astrocytes result in failure of induction of LTP reversal (depotentiation) in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 1578, 1–13. doi:10.1016/j.brainres.2014.07.005
- Garcia, A.D.R., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., and Sofroniew, M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7, 1233–1241. doi:10.1038/nn1340
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y.Q., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.X., Thuc, O.L., Szigeti-Buck, K., Cai, W.K., Meyer, C.W., Pfluger, P.T., Fernandez, A.M., Luquet, S., Woods, S.C., Torres-Alemán, I., Kahn, C.R., Götz, M., Horvath, T.L., and Tschöp, M.H. (2016). Astrocytic insulin signaling couples brain glucose uptake with nutrient availability. *Cell* 166, 867–880.
- Gard, A.L., White, F.P., and Dutton, G.R. (1985). Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol* 8, 359–375. doi:10.1016/S0165-5728(85)80073-4
- Goebel, H.H., Bode, G., Caesar, R., and Kohlschütter, A. (1981). Bulbar palsy with Rosenthal fiber formation in the medulla of a 15-year-old girl. Localized form of Alexander's disease? *Neuropediatrics* 12, 382–391.
- Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ideka, T., Katoh, A., Itoh, T., and Itohara, S. (1995). Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron* 14, 29–41. doi:10.1016/0896-6273(95)90238-4
- Gorospe, J.R., Naidu, S., Johnson, A.B., Puri, V., Raymond, G.V., Jenkins, S.D., Pedersen, R.C., Lewis, D., Knowles, P., Fernandez, R., De Vivo, D., van der Knaap, M.S., Messing, A., Brenner, M., and Hoffman, E.P. (2002). Molecular findings in symptomatic and pre-symptomatic Alexander disease patients. *Neurology* 58, 1494–1500.
- Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F.G., Figueiredo, M.L., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571–575. doi:10.1126/science.1190721

- Gupta, N., Henry, R.G., Strober, J., Kang, S.M., Lim, D.A., Bucci, M., Caverzasi, E., Gaetano, L., Mandelli, M.L., Ryan, T., Perry, R., Farrell, J., Jeremy, R.J., Ulman, M., Huhn, S.L., Barkovich, A.J., and Rowitch, D.H. (2012). Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci Transl Med* 4, 155ra137. doi:10.1126/scitranslmed.3004373
- Hagemann, T.L., Boelens, W., Wawrousek, E., and Messing, A. (2009). Suppression of GFAP toxicity by  $\alpha$ B-crystallin in mouse models of Alexander disease. *Hum Mol Genet* 18, 1190–1199. doi:10.1093/hmg/ddp013
- Hagemann, T.L., Connor, J.X., and Messing, A. (2006). Alexander disease-associated glial fibrillary acidic protein mutations in mice induce Rosenthal fiber formation and a white matter stress response. *J Neurosci* 26, 11162–11173. doi:10.1523/JNEUROSCI.3260-06.2006
- Hagemann, T.L., Gaeta, S.A., Smith, M.A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., and Messing, A. (2005). Gene expression analysis in mice with elevated glial fibrillary acidic protein and Rosenthal fibers reveals a stress response followed by glial activation and neuronal dysfunction. *Hum Mol Genet* 14, 2443–2458. doi:10.1093/hmg/ddi248
- Hagemann, T.L., Paylor, R., and Messing, A. (2013). Deficits in adult neurogenesis, contextual fear conditioning and spatial learning in a *Gfap* mutant mouse model of Alexander disease. *J Neurosci* 33, 18698–18706. doi:10.1523/JNEUROSCI.3693-13.2013
- Haydon, P.G. (2017). Astrocytes and the modulation of sleep. *Curr Opin Neurobiol* 44, 28–33. doi:10.1016/j.conb.2017.02.008
- Heaven, M.R., Flint, D., Randall, S.M., Sosunov, A.A., Wilson, L., Barnes, S., Goldman, J.E., Muddiman, D.C., and Brenner, M. (2016). The composition of Rosenthal fibers, the protein aggregate hallmark of Alexander disease. *J Proteome Res* 15, 2265–2282. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00316
- Hedberg, K.K., and Chen, L.B. (1986). Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line. *Exp Cell Res* 163, 509–517. doi:10.1016/0014-4827(86)90081-9
- Heim, P., Claussen, M., Hoffmann, B., Conzelmann, E., Gärtner, J., Harzer, K., Hunneman, D.H., Köhler, W., Kurlemann, G., and Kohlschütter, A. (1997). Leukodystrophy incidence in Germany. *Am J Med Genet* 71, 475–478. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19970905)71:4%3C475::AID-AJMG20%3E3.0.CO;2-C
- Higashimori, H., Morel, L., Huth, J., Lindemann, L., Dulla, C., Taylor, A., Freeman, M., and Yang, Y. (2013). Astroglial FMRP-dependent translational down-regulation of mGluR5 underlies glutamate transporter GLT1 dysregulation in the fragile X mouse. *Hum Mol Genet* 22, 2041–2054. 3633372 doi:10.1093/hmg/ddt055

- Hsiao, V.C., Tian, R., Long, H., Der Perng, M., Brenner, M., Quinlan, R.A., and Goldman, J.E. (2005). Alexander-disease mutation of GFAP causes filament disorganization and decreased solubility of GFAP. *J Cell Sci* 118, 2057–2065. doi:10.1242/jcs.02339
- Huang, C., Huang, B., Bi, F.F., Yan, L.H., Tong, J.B., Huang, J.F., Xia, X.G., and Zhou, H.X. (2014). Profiling the genes affected by pathogenic TDP-43 in astrocytes. *J Neurochem* 129, 932–939. doi:10.1111/jnc.12660
- Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S.V., Stewart, C.L., and Fields, R.D. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49, 823–832. doi:10.1016/j.neuron.2006.02.006
- Ishigaki, K., Ito, Y., Sawaishi, Y., Funatsuka, M., Hattori, N., Nakano, K., Saito, K., and Osawa, M. (2006). TRH therapy in a patient with juvenile Alexander disease. *Brain Dev* 28, 663–667. doi:10.1016/j.braindev.2006.05.001
- Iwaki, A., Iwaki, T., Goldman, J.E., Ogomori, K., Tateishi, J., and Sakaki, Y. (1992). Accumulation of alpha B-crystallin in brains of patients with Alexander's disease is not due to an abnormality of the 5'-flanking and coding sequence of the genomic DNA. *Neurosci Lett* 140, 89–92.
- Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R.K.H., and Goldman, J.E. (1989).  $\alpha$ B-Crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 57, 71–78.
- Jacob, J., Robertson, N.J., and Hilton, D.A. (2003). The clinicopathological spectrum of Rosenthal fibre encephalopathy and Alexander's disease: a case report and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 807–810.
- Jany, P.L., Agosta, G.E., Benko, W.S., Eickhoff, J.C., Keller, S.R., Köehler, W., Koeller, D.M., Mar, S., Naidu, S., Ness, J.M., Pareyson, D., Renaud, D.L., E., S., Schiffmann, R., Simon, J., Vanderver, A., Eichler, F., van der Knaap, M.S., and Messing, A. (2015). Cerebrospinal fluid and blood levels of GFAP in Alexander disease. *eNeuro* 2, e0080–0015.2015.
- Jany, P.L., Hagemann, T.L., and Messing, A. (2013). GFAP expression as an indicator of disease severity in mouse models of Alexander disease. *ASN Neuro* 5, art:e00109. doi:10.1042/AN20130003
- Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1984). Nonmyelin-forming Schwann cells coexpress surface proteins and intermediate filaments not found in myelin-forming cells: a study of Ran-2, A5E3 antigen and glial fibrillary acidic protein. *J Neurocytol* 13, 923–934. doi:10.1007/BF01148594
- Jessen, K.R., Thorpe, R., and Mirsky, R. (1984). Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol* 13, 187–200. doi:10.1007/BF01148114

- Johnson, A.B., and Bettica, A. (1989). On-grid immunogold labeling of glial intermediate filaments in epoxy-embedded tissue. *Am J Anat* 185, 335–341. doi:10.1002/aja.1001850228
- Johnson, D.A., and Johnson, J.A. (2015). Nrf2—a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 88, 253–267.
- Kessell, A.E., Finnie, J.W., Manavis, J., Cheetham, G.D., and Blumbergs, P.C. (2012). A Rosenthal fiber encephalomyelopathy resembling Alexander’s disease in 3 sheep. *Vet Pathol* 49, 248–254.
- Khakh, B.S., Beaumont, V., Cachope, R., Munoz-Sanjuan, I., Goldman, S.A., and Grantyn, R. (2017). Unravelling and exploiting astrocyte dysfunction in Huntington’s disease. *Trends Neurosci* 40, 422–437.
- Kondo, T., Funayama, M., Miyake, M., Tsukita, K., Era, T., Osaka, H., Ayaki, T., Takahashi, R., and Inoue, H. (2016). Modeling Alexander disease with patient iPSCs reveals cellular and molecular pathology of astrocytes (see erratum). *Acta Neuropathol Commun* 4, 69.
- Koyama, Y., and Goldman, J.E. (1999). Formation of GFAP cytoplasmic inclusions in astrocytes and their disaggregation by  $\alpha$ B-crystallin. *Am J Pathol* 154, 1563–1572. doi:10.1016/S0002-9440(10)65409-0
- Krencik, R., and Zhang, S.C. (2011). Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 6, 1710–1717. 3198813 doi:10.1038/nprot.2011.405
- Kyllerman, M., Rosengren, L., Wiklund, L.M., and Holmberg, E. (2005). Increased levels of GFAP in the cerebrospinal fluid in three subtypes of genetically confirmed Alexander disease. *Neuropediatrics* 36, 319–323. doi:10.1055/s-2005-872876
- LaPash Daniels, C.M., Austin, E., Rockney, D., Jacka, E., Hagemann, T.L., Johnson, D., Johnson, J.A., and Messing, A. (2012). Beneficial effects of Nrf2 overexpression in a mouse model of Alexander disease. *J Neurosci* 32, 10507–10515.
- LaPash Daniels, C.M., Paffenroth, E., Austin, E.V., Glebov, K., Lewis, D., Walter, J., and Messing, A. (2015). Lithium decreases glial fibrillary acidic protein in a mouse model of Alexander disease. *PLoS ONE* 10, e0138132. doi:10.1371/journal.pone.0138132
- Lee, H.U., Yamazaki, Y., Tanaka, K.F., Furuya, K., Sokabe, M., Hida, H., Takao, K., Miyakawa, T., Fujii, S., and Ikenaka, K. (2013). Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61, 210–224. doi:10.1002/glia.22427
- Leegwater, P.A.J., Yuan, B.Q., van der, S.J., Mulders, J., Konst, A.A.M., Boor, P.K.I., Mejaski-Bosnjak, V., van der, M.S., Frants, R.R., Oudejans, C.B.M., Schutgens, R.B.H., Pronk, J.C., and van der Knaap, M.S. (2001). Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative



- membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet* 68, 831–838. doi:10.1086/319519
- Li, R., Johnson, A.B., Salomons, G., Goldman, J.E., Naidu, S., Quinlan, R., Cree, B., Ruyle, S.Z., Banwell, B., D’Hooghe, M., Siebert, J.R., Rolf, C.M., Cox, H., Reddy, A., Gutiérrez-Solana, L.G., Collins, A., Weller, R.O., Messing, A., van der Knaap, M.S., and Brenner, M. (2005). Glial fibrillary acidic protein mutations in infantile, juvenile, and adult forms of Alexander disease. *Ann Neurol* 57, 310–326.
- Li, R., Johnson, A.B., Salomons, G.S., van der Knaap, M.S., Rodriguez, D., Boespflug-Tanguy, O., Gorospe, J.R., Goldman, J.E., Messing, A., and Brenner, M. (2006). Propensity for paternal inheritance of de novo mutations in Alexander disease. *Hum Genet* 119, 137–144.
- Liddelw, S.A., and Barres, B.A. (2017). Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 46, 957–967. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006
- Liddelw, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Munch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Stevens, B., and Barres, B.A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. doi:10.1038/nature21029
- Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P.L., Chiu, F.C., Cowan, N.J., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607–615.
- Liem, R.K.H., and Messing, A. (2009). Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* 119, 1814–1824. doi:10.1172/JCI38003
- Lin, N.H., Huang, Y.S., Opal, P., Goldman, R.D., Messing, A., and Perng, M.D. (2016). The role of gigaxonin in the degradation of the glial-specific intermediate filament protein GFAP. *Mol Biol Cell* 27, 3980–3990. doi:10.1091/mbc.E16-06-0362
- Linker, R.A., Lee, D.H., Ryan, S., van Dam, A.M., Conrad, R., Bista, P., Zeng, W., Hronowsky, X., Buko, A., Chollate, S., Ellrichmann, G., Bruck, W., Dawson, K., Goelz, S., Wiese, S., Scannevin, R.H., Lukashev, M., and Gold, R. (2011). Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 134, 678–692.
- Lioy, D.T., Garg, S.K., Monaghan, C.E., Raber, J., Foust, K.D., Kaspar, B.K., Hirrlinger, P.G., Kirchhoff, F., Bissonnette, J.M., Ballas, N., and Mandel, G. (2011). A role for glia in the progression of Rett’s syndrome. *Nature* 475, 497–U490.
- Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Mechanisms of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330, 613–622.

- Lobsiger, C.S., and Cleveland, D.W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 10, 1355–1360.
- Lowe, J., Blanchard, A., Morrell, K., Lennox, G., Reynolds, L., Billett, M., Landon, M., and Mayer, R.J. (1988). 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* 155, 9–15.
- MacArthur, D.G., Manolio, T.A., Dimmock, D.P., Rehm, H.L., Shendure, J., Abecasis, G.R., Adams, D.R., Altman, R.B., Antonarakis, S.E., Ashley, E.A., Barrett, J.C., Biesecker, L.G., Conrad, D.F., Cooper, G.M., Cox, N.J., Daly, M.J., Gerstein, M.B., Goldstein, D.B., Hirschhorn, J.N., Leal, S.M., Pennacchio, L.A., Stamatoyannopoulos, J.A., Sunyaev, S.R., Valle, D., Voight, B.F., Winckler, W., and Gunter, C. (2014). Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 508, 469–476. doi:10.1038/nature13127
- MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020388. doi:10.1101/cshperspect.a020388
- Mahammad, S., Murthy, S.N., Didonna, A., Grin, B., Israeli, E., Perrot, R., Bomont, P., Julien, J.P., Kuczmariski, E., Opal, P., and Goldman, R.D. (2013). Giant axonal neuropathy-associated gigaxonin mutations impair intermediate filament protein degradation. *J Clin Invest* 123, 1964–1975.
- Martinez-De Luna, R.I., Ku, R.Y., Aruck, A.M., Santiago, F., Viczian, A.S., San Mauro, D., and Zuber, M.E. (2017). Muller glia reactivity follows retinal injury despite the absence of the glial fibrillary acidic protein gene in *Xenopus*. *Dev Biol* 426, 219–235. doi:10.1016/j.ydbio.2016.03.005
- Mathelier, A., Shi, W.Q., and Wasserman, W.W. (2015). Identification of altered cis-regulatory elements in human disease. *Trends Genet* 31, 67–76. doi:10.1016/j.tig.2014.12.003
- McCall, M.A., Gregg, R.G., Behringer, R.R., Brenner, M., Delaney, C.L., Galbreath, E.J., Zhang, C.L., Pearce, R.A., Chiu, S.Y., and Messing, A. (1996). Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (*Gfap*) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6361–6366. doi:10.1073/pnas.93.13.6361
- McConnell, H.L., Kersch, C.N., Woltjer, R.L., and Neuwelt, E.A. (2017). The translational significance of the neurovascular unit. *J Biol Chem* 292, 762–770. doi:10.1074/jbc.R116.760215
- McGrath, J.T. (1980). Fibrinoid leukodystrophy (Alexander's disease). In *Spontaneous Animal Models of Human Disease*, vol. 2, E.J. Andrews, B.C. Ward, and H.N. Altman, eds. (New York, Academic Press), pp. 147–148.



- Meins, M., Brockmann, K., Yadav, S., Haupt, M., Sperner, J., Stephani, U., and Hanefeld, F. (2002). Infantile Alexander disease: a GFAP mutation in monozygotic twins and novel mutations in two other patients. *Neuropediatrics* 33, 194–198. doi:10.1055/s-2002-34495
- Messing, A. (in press). Alexander Disease. In D.H. Geschwind, H. L. Paulson, and C. Klein (Eds.), *Neurogenetics Part II. Handbook of Clinical Neurology, Volume 148*, Elsevier, Amsterdam. doi:10.1016/B978-012439510-7/50089-9
- Messing, A., and Brenner, M. (2013). Genetic disorders affecting astrocytes. In Neuroglia, H. Kettenmann, and B. Ransom, eds. (New York, Oxford University Press), pp. 884–895. doi:10.1093/med/9780199794591.003.0069
- Messing, A., Brenner, M., Feany, M.B., Nedergaard, M., and Goldman, J.E. (2012a). Alexander disease. *J Neurosci* 32, 5017–5023. doi:10.1523/JNEUROSCI.5384-11.2012
- Messing, A., Daniels, C.M., and Hagemann, T.L. (2010). Strategies for treatment in Alexander disease. *Neurotherapeutics* 7, 507–515. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.013
- Messing, A., Head, M.W., Galles, K., Galbreath, E.J., Goldman, J.E., and Brenner, M. (1998). Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am J Pathol* 152, 391–398.
- Messing, A., Li, R., Naidu, S., Taylor, J.P., Silverman, L., Flint, D., van der Knaap, M.S., and Brenner, M. (2012b). Archetypal and new families with Alexander disease and novel mutations in *GFAP*. *Arch Neurol* 69, 208–214.
- Mignot, C., Delarasse, C., Escaich, S., della Gaspera, B., Noé, E., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Pekny, M., Vicart, P., Boespflug-Tanguy, O., Dautigny, A., Rodriguez, D., and Pham-Dinh, D. (2007). Dynamics of mutated GFAP aggregates revealed by real-time imaging of an astrocyte model of Alexander disease. *Exp Cell Res* 313, 2766–2779. doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.035
- Mignot, C., Desguerre, I., Burglen, L., Hertz-Pannier, L., Renaldo, F., Gadisseux, J.F., Gallet, S., Pham-Dinh, D., Boespflug-Tanguy, O., and Rodriguez, D. (2009). Tumor-like enlargement of the optic chiasm in an infant with Alexander disease. *Brain Dev* 31, 244–247. doi:10.1016/j.braindev.2008.05.005
- Moody, L.R., Barrett-Wilt, G.A., Sussman, M.R., and Messing, A. (2017). Glial fibrillary acidic protein exhibits altered turnover kinetics in a mouse model of Alexander disease. *J Biol Chem* 292, 5814–5824. doi:10.1074/jbc.M116.772020
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., and Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10, 615–622. doi:10.1038/nm1876
- Nam, T.S., Kim, J.H., Chang, C.H., Yoon, W., Jung, Y.S., Kang, S.Y., Shin, B.A., Perng, M.D., Choi, S.Y., and Kim, M.K. (2015). Identification of a novel nonsense mutation in the rod

- domain of GFAP that is associated with Alexander disease. *Eur J Hum Genet* 23, 72–78. doi:10.1038/ejhg.2014.68
- Namekawa, M., Takiyama, Y., Aoki, Y., Takayashiki, N., Sakoe, K., Shimazaki, H., Taguchi, T., Tanaka, Y., Nishizawa, M., Saito, K., Matsubara, Y., and Nakano, I. (2002). Identification of GFAP gene mutation in hereditary adult-onset Alexander's disease. *Ann Neurol* 52, 779–785.
- Namekawa, M., Takiyama, Y., Honda, J., Sakoe, K., Naoi, T., Shimazaki, H., Yamagata, T., Momoi, M.Y., and Nakano, I. (2012). A novel adult case of juvenile-onset Alexander disease: complete remission of neurological symptoms for over 12 years, despite insidiously progressive cervicomedullary atrophy. *Neurol Sci* 33, 1389–1392. doi:10.1007/s10072-011-0902-z
- Namekawa, M., Takiyama, Y., Honda, J., Shimazaki, H., Sakoe, K., and Nakano, I. (2010). Adult-onset Alexander disease with typical “tadpole” brainstem atrophy and unusual bilateral basal ganglia involvement: a case report and review of the literature. *BMC Neurology* 10, 21.
- Nelson, P.G., Fitzgerald, S., Rapoport, S.I., Neale, E.A., Galdzicki, Z., Dunlap, V., Bowers, L., and Von Agoston, D. (1997). Cerebral cortical astroglia from the trisomy 16 mouse, a model for Down syndrome, produce neuronal cholinergic deficits in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12644–12648. doi:10.1073/pnas.94.23.12644
- Nicholl, I.D., and Quinlan, R.A. (1994). Chaperone activity of  $\alpha$ -crystallins modulates intermediate filament assembly. *EMBO J* 13, 945–953.
- Niinikoski, H., Haataja, L., Brander, A., Valanne, L., and Blaser, S. (2009). Alexander disease as a cause of nocturnal vomiting in a 7-year-old girl. *Pediatr Radiol* 39, 872–875. doi:10.1007/s00247-009-1289-3
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29, 3276–3287. doi:10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009
- Olabarria, M., and Goldman, J.E. (2017). Disorders of astrocytes: Alexander disease as a model. *Annu Rev Pathol* 12, 131–152. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100218
- Olabarria, M., Putilina, M., Riemer, E.C., and Goldman, J.E. (2015). Astrocyte pathology in Alexander disease causes a marked inflammatory environment. *Acta Neuropathol* 130, 469–486. doi:10.1007/s00401-015-1469-1
- Omary, M.B. (2009). “IF-pathies”: a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest* 119, 1756–1762. doi:10.1172/JCI39894
- Pareyson, D., Fancellu, R., Mariotti, C., Romano, S., Salmaggi, A., Carella, F., Girotti, F.,

- Gattellaro, G., Carriero, M.R., Farina, L., Ceccherini, I., and Savoiaro, M. (2008). Adult-onset Alexander disease: a series of eleven unrelated cases with review of the literature. *Brain* 131, 2321–2331. doi:10.1093/brain/awn178
- Pekny, M., Levéen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C.H., Westermark, B., and Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J* 14, 1590–1598.
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J.M., Parpura, V., Hol, E.M., Sofroniew, M.V., and Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131, 323–345. doi:10.1007/s00401-015-1513-1
- Pekny, T., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Curtis, M.A., Matej, R., Skalli, O., and Pekny, M. (2014). Synemin is expressed in reactive astrocytes and Rosenthal fibers in Alexander disease. *APMIS* 122, 76–80. doi:10.1111/apm.12088
- Perng, M.D., Su, M., Wen, S.F., Li, R., Gibbon, T., Prescott, A.R., Brenner, M., and Quinlan, R.A. (2006). The Alexander disease-causing GFAP mutant, R416W, accumulates into Rosenthal fibers by a pathway involving filament aggregation and the association of  $\alpha$ B-crystallin and HSP27. *Am J Hum Genet* 79, 197–213.
- Perng, M.D., Wen, S.F., Gibbon, T., Middeldorp, J., Sluijs, J., Hol, E.M., and Quinlan, R.A. (2008). Glial fibrillary acidic protein filaments can tolerate the incorporation of assembly-compromised GFAP- $\delta$ , but with consequences for filament organization and  $\alpha$ B-crystallin association. *Mol Biol Cell* 19, 4521–4533.
- Powers, B., Hagemann, T., Wheeler, S., Mazur, C., Swayze, E.E., and Messing, A. (2016). Antisense oligonucleotides (ASOs) targeting mouse *Gfap* reverse pathology in a model of Alexander disease. Program No. 692.605, Society for Neuroscience.
- Pridmore, C.L., Baraitser, M., Harding, B., Boyd, S.G., Kendall, B., and Brett, E.M. (1993). Alexander's disease: clues to diagnosis. *J Child Neurol* 8, 134–144.
- Probst, E.N., Hagel, C., Weisz, V., Nagel, S., Wittkugel, O., Zeumer, H., and Kohlschütter, A. (2003). Atypical focal MRI lesions in a case of juvenile Alexander's disease. *Ann Neurol* 53, 118–120.
- Prust, M., Wang, J., Morizono, H., Messing, A., Brenner, M., Gordon, E., Hartka, T., Sokohl, A., Schiffmann, R., Gordish-Dressman, H., Albin, R., Amartino, H., Brockman, K., Dinopoulos, A., Dotti, M.T., Fain, D., Fernandez, R., Ferreira, J., Fleming, J., Gill, D., Griebel, M., Heilstedt, H., Kaplan, P., Lewis, D., Nakagawa, M., Pedersen, R., Reddy, A., Sawaishi, Y., Schneider, M., Sherr, E., Takiyama, Y., Wakabayashi, K., Gorospe, J.R., and Vanderver, A. (2011). *GFAP* mutations, age of onset, and clinical sub-types in Alexander disease. *Neurology* 77, 1287–1294.

- Restrepo, J., Bernardin, L., and Hammeke, T. (2011). Neurocognitive decline in Alexander disease. *Clin Neuropsychol* 25, 1266–1277. doi:10.1080/13854046.2011.604043
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., and Rehm, H.L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–424. doi:10.1038/gim.2015.30
- Richardson, J.A., Tang, K., and Burns, D.K. (1991). Myeloencephalopathy with Rosenthal fiber formation in a miniature poodle. *Vet Pathol* 28, 536–538. doi:10.1177/030098589102800612
- Rodriguez, D., Gauthier, F., Bertini, E., Bugiani, M., Brenner, M., N'guyen, S., Goizet, C., Gelot, A., Surtees, R., Pedespan, J.M., Hernandorena, X., Troncoso, M., Uziel, G., Messing, A., Ponsot, P., Pham-Dinh, D., Dautigny, A., and Boespflug-Tanguy, O. (2001). Infantile Alexander disease: spectrum of GFAP mutations and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69, 1134–1140. doi:10.1086/323799
- Rosenthal, W. (1898). Über eine eigenthümliche, mit syringomyelie complicirte geschwulst des rückenmarks. *Bietr Pathol Anat* 23, 111–143.
- Rothstein, J.D., Patel, S., Regan, M.R., Haenggeli, C., Huang, Y.H., Bergles, D.E., Jin, L., Hoberg, M.D., Vidensky, S., Chung, D.S., Toan, S.V., Bruijn, L.I., Su, Z.Z., Gupta, P., and Fisher, P.B. (2005).  $\beta$ -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73–77. doi:10.1038/nature03180
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38, 73–84. doi:10.1002/ana.410380114
- Rugg, E.L., McLean, W.H.I., Lane, E.B., Pitera, R., McMillan, J.R., Dopping-Hepenstal, P.J.C., Navsaria, H.A., Leigh, I.M., and Eady, R.A.J. (1994). A functional “knockout” of human keratin 14. *Genes Dev* 8, 2563–2573. doi:10.1101/gad.8.21.2563
- Russo, L.S., Jr., Aron, A., and Anderson, P.J. (1976). Alexander’s disease: a report and reappraisal. *Neurology* 26, 607–614.
- Salvi, F., Aoki, Y., Della, N.R., Vella, A., Pastorelli, F., Scaglione, C., Matsubara, Y., and Mascacchi, M. (2005). Adult Alexander’s disease without leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 58, 813–814.
- Sato, K., Kurita, T., Chitose, S.I., Umeno, H., and Nakashima, T. (2014). Cytoskeleton of newborn vocal fold stellate cells. *Laryngoscope* 124, 2551–2554. doi:10.1002/lary.24776
- Schmidt, H., Kretzschmar, B., Lingor, P., Pauli, S., Schramm, P., Otto, M., Ohlenbusch, A.,

- and Brockmann, K. (2013). Acute onset of adult Alexander disease. *J Neurol Sci* 331, 152–154. doi:10.1016/j.jns.2013.05.006
- Sechi, G., Ceccherini, I., Bachetti, T., Deiana, G.A., Sechi, E., and Balbi, P. (2013). Ceftriaxone for Alexander’s disease: a four-year follow-up. *JIMD Rep* 9, 67–71.
- Sechi, G., Matta, M., Deiana, G.A., Balbi, P., Bachetti, T., Di Zanni, E., Ceccherini, I., and Serra, A. (2010). Ceftriaxone has a therapeutic role in Alexander disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34, 416–417. doi:10.1016/j.pnpbp.2009.11.021
- Seil, F.J., Schochet, S.S., Jr., and Earle, K.M. (1968). Alexander’s disease in an adult. Report of a case. *Arch Neurol* 19, 494–502.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21, 7153–7160.
- Shiroma, N., Kanazawa, N., Kato, Z., Shimozawa, N., Imamura, A., Ito, M., Ohtani, K., Oka, A., Wakabayashi, K., Iai, M., Sugai, K., Sasaki, M., Kaga, M., Ohta, T., and Tsujino, S. (2003). Molecular genetic study in Japanese patients with Alexander disease: a novel mutation, R79L. *Brain Dev* 25, 116–121. doi:10.1016/S0387-7604(02)00167-5
- Singh, R., Nielsen, A.L., Johansen, M.G., and Jørgensen, A.L. (2003). Genetic polymorphism and sequence evolution of an alternatively spliced exon of the glial fibrillary acidic protein gene, *GFAP*☆. *Genomics* 82, 185–193.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Springer, S., Erlewein, R., Naegele, T., Becker, I., Auer, D., Grodd, W., and Krageloh-Mann, I. (2000). Alexander disease - Classification revisited and isolation of a neonatal form. *Neuropediatrics* 31, 86–92. doi:10.1055/s-2000-7479
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J.D., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A., Miller, C.C., Nicholson, G., and Shaw, C.E. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 319, 1668–1672. doi:10.1126/science.1154584
- Sreedharan, J., Shaw, C.E., Jarosz, J., and Samuel, M. (2007). Alexander disease with hypothermia, microcoria, and psychiatric and endocrine disturbances. *Neurology* 68, 1322–1323. doi:10.1212/01.wnl.0000259543.95222.9d
- Staba, M.J., Goldman, S., Johnson, F.L., and Huttenlocher, P.R. (1997). Allogeneic bone marrow transplantation for Alexanders disease. *Bone Marrow Transplant* 20, 247–249.
- Steindler, D.A., and Laywell, E.D. (2003). Astrocytes as stem cells: Nomenclature, phenotype, and translation. *Glia* 43, 62–69. doi:10.1002/glia.10242

- Stevenson, L.D., and Vogel, F.S. (1952). A case of macrocephaly associated with feeble-mindedness and encephalopathy with peculiar deposits throughout the brain and spinal cord. *Ciencia (Mex)* 12, 71–74.
- Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018
- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E.J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R.D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C.R., Berggren, W.T., Lajara, J., Nunez-Delicado, E., Guillen, P., Campistol, J.M., Matsuzaki, F., Liu, G.H., Magistretti, P., Zhang, K., Callaway, E.M., Zhang, K., and Belmonte, J.C. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144–149. doi:10.1038/nature20565
- Tanaka, K.F., Takebayashi, H., Yamazaki, Y., Ono, K., Naruse, M., Iwasato, T., Itohara, S., Kato, H., and Ikenaka, K. (2007). The murine model of Alexander disease: analysis of GFAP aggregate formation and its pathological significance. *Glia* 55, 617–631. doi:10.1002/glia.20486
- Tang, G., Perng, M.D., Wilk, S., Quinlan, R., and Goldman, J.E. (2010). Oligomers of mutant glial fibrillary acidic protein (GFAP) inhibit the proteasome system in Alexander disease astrocytes, and the small heat shock protein,  $\alpha$ B-crystallin, reverses the inhibition. *J Biol Chem* 285, 10527–10537. doi:10.1074/jbc.M109.067975
- Tang, G., Xu, Z., and Goldman, J.E. (2006). Synergistic effects of the SAPK/JNK and the proteasome pathway on glial fibrillary acidic protein (GFAP) accumulation in Alexander disease. *J Biol Chem* 281, 38634–38643. doi:10.1074/jbc.M604942200
- Tang, G., Yue, Z., Tallozy, Z., Hagemann, T., Cho, W., Messing, A., Sulzer, D.L., and Goldman, J.E. (2008). Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum Mol Genet* 17, 1540–1555. doi:10.1093/hmg/ddn042
- Tavasoli, A., Armangue, T., Ho, C.Y., Whitehead, M., Bornhorst, M., Rhee, J., Hwang, E.I., Wells, E.M., Packer, R., van der Knaap, M.S., Bugiani, M., and Vanderver, A. (2017). Alexander disease: a leukodystrophy that may mimic brain tumor. *J Child Neurol* 32, 184–187. doi:10.1177/0883073816673263
- Thrane, A.S., Rangroo Thrane, V., Zeppenfeld, D., Lou, N., Xu, Q., Nagelhus, E.A., and Nedergaard, M. (2012). General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18974–18979. 3503159 doi:10.1073/pnas.1209448109



- Tian, R., Wu, X., Hagemann, T.L., Sosunov, A.A., Messing, A., McKhann, G.M., and Goldman, J.E. (2010). Alexander disease mutant GFAP compromises glutamate transport in astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 69, 335–345.
- Tian, R.J., Gregor, M., Wiche, G., and Goldman, J.E. (2006). Plectin regulates the organization of glial fibrillary acidic protein in Alexander disease. *Am J Pathol* 168, 888–897. doi:10.2353/ajpath.2006.051028
- Uyeda, C.T., Eng, L.F., and Bignami, A. (1972). Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 37, 81–89. doi:10.1016/0006-8993(72)90347-2
- van der Knaap, M.S., Naidu, S., Breiter, S.N., Blaser, S., Stroink, H., Springer, S., Begeer, J.C., Van Coster, R., Barth, P.G., Thomas, N.H., Valk, J., and Powers, J.M. (2001). Alexander disease: diagnosis with MR imaging. *Am J Neuroradiol* 22, 541–552. doi:10.1007/3-540-27660-2\_57
- van der Knaap, M.S., Ramesh, V., Schiffmann, R., Blaser, S., Kyllerman, M., Gholkar, A., Ellison, D.W., van der Voorn, J.P., van Dooren, S.J.M., Jakobs, C., Barkhof, F., and Salomons, G.S. (2006). Alexander disease: ventricular garlands and abnormalities of the medulla and spinal cord. *Neurology* 66, 494–498. doi:10.1212/01.wnl.0000198770.80743.37
- van der Knaap, M.S., Salomons, G.S., Li, R., Franzoni, E., González Gutiérrez-Solana, L., Smit, L.M.E., Robinson, R., Ferrie, C., Cree, B., Reddy, A., Thomas, N., Banwell, B., Barkhof, F., Jakobs, C., Johnson, A., Messing, A., and Brenner, M. (2005). Unusual variants of Alexander disease. *Ann Neurol* 57, 327–338.
- van der Knaap, M.S., and Valk, J. (2005). Magnetic resonance of myelin and myelin disorders, vol. third (Berlin, Springer). doi:10.1007/3-540-27660-2
- van der Voorn, J.P., Pouwels, P.J., Salomons, G.S., Barkhof, F., and van der Knaap, M.S. (2009). Unraveling pathology in juvenile Alexander disease: serial quantitative MR imaging and spectroscopy of white matter. *Neuroradiology* 10, 669–675. doi:10.1007/s00234-009-0540-9
- Van Poppel, K., Broniscer, A., Patay, Z., and Morris, E.B. (2009). Alexander disease: An important mimicker of focal brainstem glioma. *Pediatr Blood Cancer* 53, 1355–1356. doi:10.1002/pbc.22232
- Van Poucke, M., Martlé, V., Van Brantegem, L., Ducatelle, R., Van Ham, L., Bhatti, S., and Peelman, L.J. (2016). A canine orthologue of the human GFAP c.716G>A (p.Arg239His) variant causes Alexander disease in a Labrador retriever. *Eur J Hum Genet* 24, 852–856. doi:10.1038/ejhg.2015.223
- Vasile, F., Dossi, E., and Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 222, 2017–2029 doi:10.1007/s00429-017-1383-5

- Vassar, R., Coulombe, P.A., Degenstein, L., Albers, K., and Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64, 365–380. doi:10.1016/0092-8674(91)90645-F
- Vázquez, E., Macaya, A., Mayolas, N., Arévalo, S., Poca, M.A., and Enriquez, G. (2008). Neonatal Alexander disease: MR imaging prenatal diagnosis. *Am J Neuroradiol* 29, 1973–1975. doi:10.3174/ajnr.A1215
- Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H.N., Yeh, C.Y., and Rodríguez, J.J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 7, 399–412.
- Viale, G., Doglioni, C., Dell'Orto, P., Zanetti, G., Iuzzolino, P., Bontempini, L., and Coggi, G. (1988). Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in human respiratory tract cartilages and pulmonary chondromatous hamartomas. *Am J Pathol* 133, 363–373.
- Vogel, F.S., and Hallervorden, J. (1962). Leukodystrophy with diffuse Rosenthal fiber formation. *Acta Neuropathol* 2, 126–143. doi:10.1007/BF00685171
- Walker, A.K., LaPash Daniels, C.M., Goldman, J.E., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., and Messing, A. (2014). Astrocytic TDP-43 pathology in Alexander disease. *J Neurosci* 34, 6448–6458. doi:10.1523/JNEUROSCI.0248-14.2014
- Wang, F.S., Smith, N.A., Xu, Q.W., Fujita, T., Baba, A., Matsuda, T., Takano, T., Bekar, L., and Nedergaard, M. (2012). Astrocytes modulate neural network activity by Ca<sup>2+</sup>-dependent uptake of extracellular K<sup>+</sup>. *Sci Signal* 5, ra26. doi:10.1126/scisignal.2002334
- Wang, L., Hagemann, T.L., Kalwa, H., Michel, T., Messing, A., and Feany, M.B. (2015). Nitric oxide mediates glial-induced neurodegeneration in Alexander disease. *Nat Commun* 6, 8966. doi:10.1038/ncomms9966
- Wang, L., Hagemann, T.L., Messing, A., and Feany, M.B. (2016). An *in vivo* pharmacological screen identifies cholinergic signaling as a therapeutic target in glial-based nervous system disease. *J Neurosci* 36, 1445–1445. doi:10.1523/JNEUROSCI.0256-15.2016
- Wang, L.Q., Colodner, K.J., and Feany, M.B. (2011). Protein misfolding and oxidative stress promote glial-mediated neurodegeneration in an Alexander disease model. *J Neurosci* 31, 2868–2877. doi:10.1523/JNEUROSCI.3410-10.2011
- Wang, X., and Rivière, I. (2017). Genetic engineering and manufacturing of hematopoietic stem cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5, 96–105. doi:10.1016/j.omtm.2017.03.003
- Weissenböck, H., Obermaier, G., and Dahme, E. (1996). Alexander's disease in a Bernese mountain dog. *Acta Neuropathol* 91, 200–204.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that



- remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17513–17518. doi:10.1073/pnas.0602841103
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Guo, M., Tian, G.F., Washco, V., Stanwood, N., Rasband, M., Roy, N.S., Nedergaard, M., Havton, L.A., Wang, S., and Goldman, S.A. (2008). Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell* 2, 553–565. doi:10.1016/j.stem.2008.03.020
- Wippold, F.J., Perry, A., and Lennerz, J. (2006). Neuropathology for the neuroradiologist: Rosenthal fibers. *Am J Neuroradiol* 27, 958–961.
- Wohlwill, F.J., Bernstein, J., and Yakovlev, P.I. (1959). Dysmyelinogenic leukodystrophy: report of a case of a new, presumably familial type of leukodystrophy with megalobarencephaly. *J Neuropathol Exp Neurol* 18, 359–383. doi:10.1097/00005072-195907000-00001
- Yang, E., and Prabhu, S.P. (2014). Imaging manifestations of the leukodystrophies, inherited disorders of white matter. *Radiol Clin North Am* 52, 279–319. doi:10.1016/j.rcl.2013.11.008
- Yoshida, T., Mizuta, I., Saito, K., Ohara, R., Kurisaki, H., Ohnari, K., Riku, Y., Hayashi, Y., Suzuki, H., Shii, H., Fujiwara, Y., Yonezu, T., Nagaishi, A., and Nakagawa, M. (2013). Effects of a polymorphism in the GFAP promoter on the age of onset and ambulatory disability in late-onset Alexander disease. *J Hum Genet* 58, 635–638. doi:10.1038/jhg.2013.83
- Yoshida, T., and Nakagawa, M. (2012). Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocytes induced by GFAP mutation. *Neuropathology* 32, 440–446. doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01268.x
- Yoshida, T., Sasaki, M., Yoshida, M., Namekawa, M., Okamoto, Y., Tsujino, S., Sasayama, H., Mizuta, I., and Nakagawa, M. (2011a). Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. *J Neurol* 258, 1998–2008.
- Yoshida, T., Sasayama, H., Mizuta, I., Okamoto, Y., Yoshida, M., Riku, Y., Hayashi, Y., Yonezu, T., Takata, Y., Ohnari, K., Okuda, S., Aiba, I., and Nakagawa, M. (2011b). Glial fibrillary acidic protein mutations in adult-onset Alexander disease: clinical features observed in 12 Japanese patients. *Acta Neurol Scand* 124, 104–108. doi:10.1111/j.1600-0404.2010.01427.x
- Yoshida, T., Sasayama, H., and Nakagawa, M. (2009). The process of inducing GFAP aggregates in astrocytoma-derived cells is different between R239C and R416W mutant GFAP. A time-lapse recording study. *Neurosci Lett* 458, 11–14. doi:10.1016/j.neulet.2009.04.032

- Zang, L., Wang, J.M., Jiang, Y.W., Gu, Q., Gao, Z.J., Yang, Y.L., Xiao, J.X., and Wu, Y. (2013). Follow-up study of 22 Chinese children with Alexander disease and analysis of parental origin of de novo GFAP mutations. *J Hum Genet* 58, 183–188. doi:10.1038/jhg.2012.152
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., Kleinert, R., Prinz, M., Aguzzi, A., and Denk, H. (2002). p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 160, 255–263. doi:10.1016/S0002-9440(10)64369-6
- Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H., and Wang, X. (2016). Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 8, 303. doi:10.3389/fnagi.2016.00303

• • • •

## Apéndice – 6 de agosto de 2021

### Introducción

La primera edición de “La Enfermedad de Alexander: una Guía para Pacientes y Familiares” salió a la imprenta en noviembre del 2017. Ha salido nueva información desde entonces y una actualización puede ser de provecho. La casa editora no ha permitido la revisión de la versión original, así que esta actualización está provista aquí a manera de apéndice.

### Repasos

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés), la proteína afectada cuya forma anormal causa la enfermedad de Alexander, fue primero descubierta en el 1971. Para conmemorar el 50 aniversario de este evento seminal de neuroquímica, Messing y Brenner escribieron un repaso comprensivo que está disponible en línea de manera gratuita en la revista de la Asociación Americana de Neuroquímica, *ASN Neuro* (Messing and Brenner, 2020), disponible en el siguiente enlace:

<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1759091420949680>

### Genética (12M15S)

Al tiempo del último escrito, todas las variantes de GFAP que causan la enfermedad de Alexander involucran a la isoforma principal, GFAP- $\alpha$ . Se comentó que “no existía evidencia clara” para variantes en las secuencias de aminoácido únicas a las isoformas menores conocidas como GFAP- $\delta$  y GFAP- $\kappa$ . Esto ha cambiado, al menos con respecto a GFAP- $\delta$ . Helman et al. (2020) reportó acerca de tres familias, dos de las cuales tenían una variante con un cambio de arginina a histidina en la posición 430 en la secuencia de GFAP- $\delta$ . Este cambio en el ADN (y ARN resultante) también alteró el proceso de empalme que normalmente genera el ARN mensajero (ARNm) para cada una de las isoformas. En una situación normal, los últimos aminoácidos de la secuencia de GFAP $\alpha$  (posiciones 391 a 432) son reemplazados por una secuencia de aminoácidos completamente diferente en GFAP $\delta$  (posiciones 391 a 431). Sin embargo, cuando la arginina en la posición 430 de GFAP $\delta$  es en cambio histidina (variante ARG430His), este estrecho de 41 aminoácidos se fusiona con la secuencia de GFAP $\alpha$  en vez de reemplazarla. La fusión de isoformas es ahora llamada GFAP $\lambda$ . No se conoce cómo GFAP $\lambda$  resulta en la enfermedad de Alexander. Sorprendentemente, la tercera familia contenía una variante de ADN en esta misma posición como una mutación “silenciosa” que llevó a la misma alteración de empalme y producción de la isoforma GFAP $\lambda$  pero son ningún cambio al aminoácido en sí (por ejemplo, Arg430Arh). Este hallazgo en la tercera familia apoya la idea de que lo más importante es el cambio en empalme, y no el cambio de aminoácido.

### Mecanismos

Una característica consistente de la enfermedad de Alexander es que GFAP, en adición a tener una secuencia de aminoácido alterada, se acumula a niveles más altos de lo normal. Ya que solo una de las dos copias del gen de GFAP necesita estar afectada para causar la enfermedad, el estado natural refleja una combinación de ambos mutante y proteína normal.

Al nivel de transcripción genética (por ejemplo, ADN a ARN) ambos alelos parecen expresarse por igual. Pero no se conocía si esto es mantenido al nivel de proteína (luego de traducción de ARN a proteína y reflejando el estado estable entre síntesis y degradación). Heaven et al. (2019) reportó un conteo de proteínas mutantes versus normales en tejido cerebral de tres individuos con la enfermedad de Alexander, y sorprendentemente encontraron que en dos de los tres individuos la proteína mutante representaba mucho menos de la mitad del total. Estos resultados sugieren que, por razones desconocidas, la mutante de GFAP es menos estable que la proteína normal. Esto es consistente con un reporte anterior por Moody et al (2017), quienes, utilizando modelos de ratón, encontraron un aumento en volumen del total de GFAP en mutantes versus animales control. También es consistente con los estudios de supresión anti-sentido de Hagemann et al (2018) (discutido luego en más detalle) en el cual la limpieza de la proteína de GFAP luego del fin de la síntesis ocurrió mucho más rápido de lo esperado.

Otros entendimientos de los mecanismos provienen de nuevos modelos de culturas de células que permiten la generación de astrocitos que contienen la variante de GFAP que causa la enfermedad. Dos grupos crearon una línea de células madre pluripotentes inducidas de pacientes con la enfermedad de Alexander y examinaron la amplia gama de cambios que ocurrió en la expresión de miles de otros genes. En un estudio, Jones et al. (2018) encontró que astrocitos de Alexander tenían alteraciones en su organización y la estructura de una variedad de compartimientos sub-celulares, junto a cambios en movimientos de pequeños paquetes (llamados vesículas) de una parte de la célula a otra. En adición, estos astrocitos de Alexander mostraron daños en la secreción de ATP y movimiento de calcio, ambas moléculas importantes que afectan una variedad de procesos biológicos. En el segundo estudio, Li et al. (2018) encontraron un aumento en expresión de genes relacionados a función inmune, inflamación, proliferación, y adhesión, además de una disminución de expresión de genes relacionados a sinapsis y transporte de iones. Uno de los genes cuya expresión aumentó, conocido como CHI3L1, fue de particular interés ya que su secreción desde astrocitos interfería con una población de células progenitoras que normalmente dan lugar a oligodendrocitos, las células responsables de formar mielina en el sistema nervioso central. Un aumento en la secreción de CHI3L1 es la primera explicación potencial de por qué la enfermedad de Alexander envuelve anomalías en mielina tan frecuentemente, de ahí su clasificación como leucodistrofia.

Otros tres estudios recientes resaltan nuevos aspectos de posibles mecanismos. Utilizando un modelo celular que expresa la variante Arg239His de GFAP, y un sistema que permite la cultura de astrocitos junto con neuronas, Gao et al. (2019) descubrió que hay una transferencia de mitocondria de una célula a otra. La mitocondria es el organelo productor de energía en el citoplasma de todas las células en el cuerpo. Sin embargo, los astrocitos con el GFAP mutante no pudieron transferir mitocondria a las neuronas tan fácilmente como los astrocitos control. Se desconoce si esto se traduce a una deficiencia en energía celular en la enfermedad de Alexander. Wang et al. (2018), en un modelo de la enfermedad de Alexander en *Drosophila*, buscó al modificador de genes que alteró las consecuencias de la mutante de GFAP en la glía de la mosca, enfocándose en algunos que sugerían un cambio fundamental en la habilidad de las células de detectar y responder a estrés mecánico (como la rigidez) del ambiente alrededor. Identificaron varios otros actores moleculares en esta trayectoria, y

confirmaron que estos mismos cambios también fueran evidentes en ambos el modelo animal y el cerebro humano. Ahora hay un interés en ver si estos modificadores pueden ser manipulados de tal manera que alteren el curso de la enfermedad, ofreciendo nuevas estrategias de tratamiento. Por último, Battaglia et al. (2019) identificaron la adición de fosfato a serina-13 (el decimotercer aminoácido en el dominio principal de GFAP) como una característica importante que distingue entre el comienzo temprano o tardío de la enfermedad de Alexander (el comienzo temprano tenía más fosforilación que comienzo tardío), sin embargo, se desconoce el por qué. La serina fosforilada promovió la agregación de GFAP y también fue asociada con el clivaje por caspasa 6 cerca del centro de la proteína.

### **Tratamientos**

Las convulsiones son un síntoma común en individuos con la enfermedad de Alexander tipo I, y en algunos casos pueden ser difíciles de controlar. Hamada et al. (2020) reportaron que una dieta cetogénica (la cual es alta en grasa y baja en carbohidratos) puede ser útil para estos pacientes. Dichas dietas han sido estudiadas anteriormente en otros tipos de epilepsia (Martin-McGill, Bresnahan, Levy and Cooper, 2020). Hamada et al. estudiaron a tres pacientes con comienzo temprano de la enfermedad de Alexander, dos de los cuales eran gemelos idénticos, con convulsiones intratables que no respondían a ningún medicamento (aunque los autores no especificaron qué medicamentos intentaron). Le hicieron un cambio a dieta cetogénica a la edad de 14 meses para un individuo, y a la edad de 7 meses para los gemelos. En los tres individuos las convulsiones se detuvieron dentro de un mes de iniciar la dieta, con efectos duraderos (12-16 meses, fechas del último reporte). Sin embargo, aunque las convulsiones fueron controladas, hubo una progresión continua de la enfermedad, evidenciada por resonancia magnética y medidas de varios marcadores de inflamación en el fluido cerebroespinal. Por lo tanto, la dieta cetogénica podría ser útil para un grupo de pacientes, pero no altera el curso de la enfermedad fundamentalmente.

El tratamiento en el horizonte más prometedor para la enfermedad de Alexander utiliza oligonucleótidos anti-sentido (segmentos cortos de ADN diseñados específicamente para enlazarse a, y promover la degradación de ARNm), administrado directamente al fluido cerebroespinal para reducir la producción de la variante de GFAP que es tóxica para el cerebro y espina dorsal. Lo atractivo de anti-sentido como estrategia de tratamiento fue solo insinuado en la edición previa, ya que el primer reporte que proveyó data apoyando este método, utilizando modelos de ratón, no había completado el proceso de revisión de pares y sido aceptado para publicación. En la publicación de la revista *Annals of Neurology* de enero del 2018, Hagemann et al (2018) proveyeron un caso convincente para la habilidad de los oligonucleótidos anti-sentido para eficientemente eliminar prácticamente por completo el GFAP del cerebro y la espina dorsal de los ratones. Muchos aspectos de la patología (como las distintivas fibras de Rosenthal) desaparecieron. Más importante aún, el tratamiento con anti-sentido específico para GFAP no solo previno la enfermedad al ser administrado temprano, si no que también revirtió la enfermedad al ser administrada a los ratones que ya habían desarrollado la patología al máximo.

Sin embargo, los modelos de ratón existentes no son ideales. Aunque muestran varias características claves de la enfermedad humana, como fibras de Rosenthal, astrogliosis, y mayor susceptibilidad a convulsiones, no tienen deficiencias motoras, ni leucodistrofia evidente, y solo tiene deficiencias sutiles de aprendizaje y memoria. Más recientemente, Hagemann et al. (2029) reportaron un nuevo modelo en ratas que tiene varias ventajas sobre previos modelos de ratones (una versión preliminar del reporte, no revisado por pares está disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.29.428244v1>). Estas ratas, diseñadas para llevar una variante de GFAP equivalente a la variante Arg239His frecuentemente vista en humanos, son mucho más severamente afectadas que el modelo de ratón correspondiente, con anormalidades en materia blanca y síntomas clínicos relacionados a la función motora (debilidad, falta de coordinación). Las ratas son el primer modelo animal en proveer un sistema en el cual el mecanismo causante de leucodistrofia puede ser estudiado. En cuanto a los experimentos en ratones descritos en la publicación del 2018, tratar a las ratas con oligodendrocitos anti-sentido previene de manera efectiva la enfermedad, e incluso revierte muchos aspectos de la misma, incluyendo las deficiencias clínicas.

Basado en estos dos estudios, un ensayo clínico aleatorio (placebo controlado, doble ciego) está en marcha y hay esperanzas de que tenga resultados en los próximos años. Más información acerca del ensayo clínico aquí: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04849741>

## References

Battaglia, R. A., Beltran, A. S., Delic, S., Dumitru, R., Robinson, J. A., Kabiraj, P., Herring, L. E., Madden, V. J., Ravinder, N., Willems, E., Newman, R. A., Quinlan, R. A., Goldman, J. E., Perng, M. D., Inagaki, M. and Snider, N. T. (2019). Site-specific phosphorylation and caspase cleavage of GFAP are new markers of Alexander Disease severity. *eLife* 8, e47789.

Gao, L., Zhang, Z., Lu, J. and Pei, G. (2019). Mitochondria are dynamically transferring between human neural cells and Alexander disease-associated GFAP mutations impair the astrocytic transfer. *Front Cell Neurosci* 13, 00316.

Hagemann, T. L., Powers, B., Mazur, C., Kim, A., Wheeler, S., Hung, G., Swayze, E. and Messing, A. (2018). Antisense suppression of GFAP as a treatment for Alexander disease. *Ann Neurol* 83, 27-39.

Hamada, S., Kato, T., Kora, K., Kawaguchi, T., Okubo, T., Ide, M., Tanaka, T., Yoshida, T. and Sakakibara, T. (2020). Ketogenic diet therapy for intractable epilepsy in infantile Alexander disease: a small case series and analyses of astroglial chemokines and proinflammatory cytokines. *Epilepsy Res* 170, 106519.

Heaven, M. R., Wilson, L., Barnes, S. and Brenner, M. (2019). Relative stabilities of wild type and mutant glial fibrillary acidic protein in patients with Alexander disease. *J Biol Chem* 294, 15604-15612.

Helman, G., Takanohashi, A., Hagemann, T. L., Perng, M. D., Walkiewicz, M., Woidill, S., Sase, S., Cross, Z., Du, Y., Zhao, L., Waldman, A., Haake, B. C., Fatemi, A., Brenner, M., Sherbini, O., Messing, A., Vanderver, A. and Simons, C. (2020). Type II Alexander disease caused by splicing errors and aberrant overexpression of a GFAP isoform. *Hum Mutat* 41, 1131-1137.

Jones, J. R., Kong, L., Hanna IV, M. G., Hoffmann, B., Krencik, R., Bradley, R., Hagemann, T., Choi, J., Doers, M., Dubovis, M., Sherafat, M. A., Bhattacharyya, A., Kendzioriski, C., Audhya, A., Messing, A. and Zhang, S. C. (2018). Mutations in GFAP disrupt the distribution and function of organelles in human astrocytes. *Cell Rep* 25, 947-958.

Li, L., Tian, E., Chen, X., Chao, J., Klein, J., Qu, Q., Sun, G., Sun, G., Huang, Y., Warden, C. D., Ye, P., Feng, L., Li, X., Cui, Q., Sultan, A., Douvaras, P., Fossati, V., Sanjana, N. E., Riggs, A. D. and Shi, Y. (2018). GFAP mutations in astrocytes impair oligodendrocyte progenitor proliferation and myelination in an hiPSC model of Alexander disease. *Cell Stem Cell* 23, 239-251.e6.

Martin-McGill, K. J., Bresnahan, R., Levy, R. G. and Cooper, P. N. (2020). Ketogenic diets for drug-resistant epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev* 6, Cd001903.

Messing, A. and Brenner, M. (2020). GFAP at 50. *ASN Neuro* 12, 1759091420949680.

Moody, L. R., Barrett-Wilt, G. A., Sussman, M. R. and Messing, A. (2017). Glial fibrillary acidic protein exhibits altered turnover kinetics in a mouse model of Alexander disease. *J Biol Chem* 292, 5814-5824.

Wang, L., Xia, J., Li, J., Hagemann, T. L., Jones, J. R., Fraenkel, E., Weitz, D. A., Zhang, S. C., Messing, A. and Feany, M. B. (2018). Tissue and cellular rigidity and mechanosensitive signaling activation in Alexander disease. *Nat Commun* 9, 1899.

## Glosario

**Anticuerpo** proteínas del sistema inmune que selectivamente reconocen a otras moléculas y que pueden ser modificados como herramientas para reconocer esas moléculas en varios tipos de pruebas

**Astrocito** uno de los cuatro tipos de células principales del sistema nervioso central

**Ataxia** problemas con el balance y la coordinación, especialmente involucrando el caminar

**Autofagia** un medio particular de degradar proteínas y otros componentes de una célula

**Bovina** un grupo de animales que incluye ganado doméstico

**Células madre embrionarias** células derivadas de embriones tempranos y capaces de convertirse en virtualmente cualquier tipo de organismo maduro

**cifosis** curvatura de la espina, principalmente en la dirección frontal-trasera

**Citoplasma** la porción de la célula fuera del núcleo

**Cognición** se refiere a la amplia gama de actividades mentales incluyendo aprendizaje, memoria, atención, razonamiento, lenguaje, y otros

**Colinérgico** relacionado al sistema de neuronas que se comunican entre sí utilizando la acetilcolina como neurotransmisor

**Diploide** tiene el complemento completo de cromosomas de ambos padres

**Disartria** anormalidades del habla que afectan cuan claro o alto alguien puede generar sonidos

**Disfagia** anormalidades al tragar

**Dominio principal** en referencia a filamentos intermedios, una porción de la proteína al principio de la cadena de aminoácido (el primero en ser sintetizado durante el proceso de traducción del ARN mensajero)

**empalme (de ARN)** proceso a través del cual las secuencias de ARN correspondientes a intrones en un gen son removidas, y las secuencias correspondientes a exones se unen para formar el ARN mensajero maduro (empalme alternativo se refiere a cuando no todos los exones son utilizados, y en combinaciones variadas)

**Epiglotis** tapa de cartílago elástico en la parte posterior de la boca

**escoliosis** curvatura del hueso de la espina dorsal de manera lateral, lo cual puede afectar la función de órganos internos como los intestinos o pulmones

**espasticidad** estado de función motora alterada, caracterizada por aumento en rigidez

**Espina dorsal cervical** región de la espina dorsal en el cuello, importante porque esta región controla directamente los nervios de la cara, brazos, y la respiración, también actúa como un conducto para fibras que controlan otras áreas del cuerpo y las piernas



**Expresividad** el grado en el cual un rasgo o característica particular está mostrado por un individuo con genotipo particular

**factor de transcripción** proteínas que se unen a regiones regulatorias de genes para controlar el nivel de transcripción de la secuencia de ADN a una hebra complementaria de ARN

**Fibroso** en medicina, típicamente referente a uno de los tejidos conectivos, mayormente compuesto por un tipo de célula llamado fibroblasto

**Filamentos intermedios** familia de proteínas que forman largas estructuras filamentosas dentro de la célula, con un diámetro característico de 10nm

**función motora** lograda a través de la acción de los músculos, y representada por la habilidad de caminar, usar las manos, hablar, entre otros

**Glioma** una categoría de tumores en el cerebro o espina dorsal que se derivan de o comparten ciertas características con células gliales (p. ej. astrocitos y oligodendrocitos)

**Gliosis** reacción de astrocitos a lesión o enfermedad del sistema nervioso central que involucra proliferación, cambio en tamaño y forma de la célula, y alteraciones complejas de expresión genética

**Heterocigoto** tiene dos formas diferentes de un gen en particular

**Hidrocefalia** agrandamiento de uno o más ventrículos del cerebro, usualmente relacionados a una variedad de problemas con el flujo del fluido en el cerebro

**Hipoxia** deficiencia de oxígenos en órganos o tejidos

**Histología** rama de las ciencias de anatomía que envuelve examinación microscópica de células y tejidos – a veces utiliza secciones delgadas de tejido montado en una laminilla de cristal y teñido de diferentes maneras

**Intra-peritoneal** ruta de inyección en el espacio peritoneal, el cual envuelve la mayoría de los órganos en la cavidad abdominal entre la superficie de esos órganos y la pared abdominal

**kDa** abreviación de kilo Dáltones, una medida de peso molecular (para proteínas que reflejan el número de pares de bases unidos en la cadena)

**leucodistrofia** trastorno de materia blanca, a menudo, pero no exclusivamente, de origen genético

**macrocefalia** agrandamiento de la cabeza

**macrófago** uno de los tipos de células principales del sistema inmune, responsable por ingerir y degradar diferentes tipos de moléculas e incluso organismos, al igual que interactuar con y regular las funciones de otros tipos de células del sistema inmune

**materia blanca** regiones del sistema nervioso central compuesto principalmente de axones con mielina

**mediana** el punto medio de un rango de valores, en el cual mitad están debajo y mitad están por encima

**médula** parte del tallo cerebral, frente al cerebelo, ambos localizados en la base del cráneo y conectando el cerebro al cordón espinal

**megaloencefalia** agrandamiento del tejido cerebral

**microglía** uno de los cuatro tipos principales de células del sistema nervioso central, cercanamente relacionadas a los macrófagos en otras partes del cuerpo

**mielina** capas de membranas de grasa que rodean los axones, producida en el sistema nervioso central por oligodendrocitos

**mielinización** el proceso de formación de mielina

**mioclonía palatina** contracciones rítmicas de los músculos en el paladar blando, en la parte trasera de la parte superior de la boca

**mitocondria** organelo sub-celular responsable de la producción de energía

**núcleo** en la biología celular de organismos superiores, una estructura dentro de la célula envuelta por una membrana, que contiene los cromosomas y el ADN

**oligodendrocito** uno de los cuatro tipos de células principales del sistema nervioso central, y la fuente de mielina

**Par de bases** componentes de la doble hélice de ADN en el cual los nucleótidos se emparejan con el nucleótido complementario en la hebra opuesta de la hélice

**parálisis** inhabilidad para moverse, usualmente debido a la pérdida de control o función muscular

**patogénico** capaz de causar enfermedad

**penetrancia** el porcentaje de individuos con un genotipo particular que demuestran un rasgo o característica correlacionado – para enfermedades altamente penetrantes esto puede ser un 100%

**polipéptido** término general que denota una larga cadena de aminoácidos – todas las proteínas son polipéptidos

**Presión intracraneal** presión dentro del cráneo, relacionado a la cantidad de fluido en los tejidos y ventrículos (puede ser fatal)

**prevalencia** número de pacientes que actualmente existen en una población definida, expresado en porcentos o proporción

**proteasoma** estructura celular responsable de degradar muchos tipos de proteínas, actuando como un “basurero” para la célula

**quiasma óptico** parte del sistema nervioso central donde los dos nervios ópticos de los ojos se unen y se cruzan parcialmente para continuar sus proyecciones al cerebro y permitir la visión

**Región codificadora** la región de la secuencia de ADN que contiene el código de 3 pares de bases por cada aminoácido, arreglados en el orden de la secuencia final de estos aminoácidos en la proteína

**sinapsis** sitio de contacto y comunicación entre dos neuronas

**tipo silvestre** la forma “normal” o más común

**transportador** proteína que atraviesa la membrana celular, responsable de transportar moléculas específicas de un lado a otro

## Biografía del Autor

**Albee Messing, V.M.D., Ph.D.**, es un profesor de neuropatología en el Departamento de Biociencias Comparativas, y el director del Centro Waisman (un centro internacional dedicado a la investigación, educación, y servicios clínicos en el campo de discapacidades intelectuales y del desarrollo), en la Universidad de Wisconsin-Madison. El Dr. Messing recibió su bachillerato en biología en Yale en el 1974, y su grado de veterinaria y doctorado de la Universidad de Pensilvania, en el 1978 y 1982, respectivamente. Continuó sus estudios postdoctorales en neuropatología clínica y experimental en Penn bajo la tutoría de Nicholas K. Gonatas, M.D., y luego se unió a la facultad de Wisconsin en el 1985. Es el recipiente de los galardones Weil y Moore de la Sociedad Americana de Neuropatólogos, fue un Alumno Shaw de la Fundación Milwaukee, y presentó la charla en memoria de Peter Lampert en UCSD en el 2003, la charla Santiago Ramón y Cajal para la Sociedad Neurológica Española en el 2010, y la charla Parisi para la Sociedad Americana de Neuropatólogos en el 2013. La investigación del Dr. Messing va dirigida a entender los aspectos patológicos y de desarrollo de la biología de la célula glial. Junto a sus colaboradores, desarrolló herramientas para modificar la expresión genética en glía in vivo, y descubrió la proteína GFAP como la base genética para la enfermedad de Alexander. Por más de 30 años ha dirigido un programa de investigación auspiciado por los Institutos Nacionales de Salud enfocado en entender los mecanismos de la enfermedad de Alexander y desarrollar estrategias para su tratamiento. Es un miembro de la junta asesora científica para la Fundación Unida de Leucodistrofia y la Asociación Charcot-Marie-Tooth. Ha publicado más de 160 manuscritos por revisión de pares, artículos de revisión de literatura, capítulos de libros, y libros.



## Biografía de la traductora



Charlene N. Rivera-Bonet, PhD, es escritora científica en el Waisman Center. Recibió un bachillerato en biología general de la Universidad de Puerto Rico en Cayey, y un doctorado en neurociencias de la Universidad de Wisconsin-Madison. Además del doctorado, obtuvo un grado secundario en comunicación científica. En el verano del 2021, la Dra. Rivera-Bonet trabajó como escritora científica para el periódico El Nuevo Día como parte del programa AAAS Mass Media Fellowship.