

monografía

ciclo de
conferencias y debates en

ciencias

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
SPRINGER NATURE



ENFERMEDADES neurodegenerativas

El reto del siglo XXI

Neurodegenerative
DISEASES

A 21st Century Challenge

FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES

SPRINGER NATURE

monografía

ciclo de
conferencias y debates en

ciencias

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
SPRINGER NATURE

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
NEURODEGENERATIVE DISEASES

El reto del siglo XXI
A 21st Century Challenge

Madrid, 7 de febrero de 2017
FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
C/ Vitruvio, 5 • 28006 Madrid



FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES

SPRINGER NATURE

© 2017 Springer Healthcare Ibérica, part of Springer Nature group
Rosario Pino, 14 - 4ª planta
28020 Madrid (España)
Tel.: +34 91 555 40 62
www.springerhealthcare.com
www.formacionspringerhealthcare.com

Depósito legal: M-8999-2017
Impreso en España – Printed in Spain



ÍNDICE

Enfermedades Neurodegenerativas

PRESENTACIÓN

Raimundo Pérez-Hernández y Torra	7
Federico Mayor Zaragoza	8
Soledad Santos	9

INTRODUCCIÓN

Erika Pastrana	13
----------------	----

CONFERENCIAS

MECANISMOS PATOLÓGICOS DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. ÉNFASIS EN ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	
Prof. Jeffrey D. Rothstein	17
RETOS Y AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	
Dr. José A. Obeso	21
DISFUNCIÓN DE LOS CIRCUITOS NEURONALES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	
Prof. Dr. Arthur Konnerth	25
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER - DE LA PATOLOGÍA CEREBRAL A LAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO	
Dr. Christian Haass	29
DEBATE	
Jeffrey D. Rothstein, José A. Obeso, Arthur Konnerth y Christian Haass	35

Neurodegenerative Diseases

PRESENTATION

Raimundo Pérez-Hernández y Torra	41
Federico Mayor Zaragoza	42
Soledad Santos	43

INTRODUCTION

Erika Pastrana	47
----------------	----

CONFERENCES

PATHOLOGICAL MECHANISMS OF NEURODEGENERATIVE DISORDERS. PARTICULARLY ALS	
Prof. Jeffrey D. Rothstein	51
CHALLENGES AND ADVANCES IN THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE	
Dr. José A. Obeso	55
NEURAL CIRCUIT DYSFUNCTION IN ALZHEIMER'S DISEASE	
Prof. Dr. Arthur Konnerth	59
ALZHEIMER'S DISEASE - FROM BRAIN PATHOLOGY TO TREATMENT STRATEGIES	
Dr. Christian Haass	63
DISCUSSION	
Jeffrey D. Rothstein, José A. Obeso, Arthur Konnerth and Christian Haass	69

presentación



Raimundo Pérez-Hernández y Torra

Director de la Fundación Ramón Areces

Federico Mayor Zaragoza

Presidente del Consejo Científico
de la Fundación Ramón Areces

Soledad Santos

Directora Editorial España y Portugal,
Springer Healthcare,
a Springer Nature business





Presentación



La Fundación Ramón Areces es una institución de vocación científica que financia proyectos de investigación en el ámbito de las Ciencias de la Vida y la Materia y las Ciencias Sociales. Forma capital humano a través de un amplio sistema de becas, y difunde el conocimiento y el saber científicos.

Dentro de las Ciencias de la Vida y la Materia, el Consejo Científico y su presidente, el profesor Mayor Zaragoza, han establecido una serie de prioridades en su ámbito de actuación. Entre estas prioridades, la principal la constituyen las enfermedades raras pero, también, las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica [ELA] y el Parkinson). Impulsamos muchas investigaciones en este campo y nos involucramos con otras instituciones, como la Fundación Pascual Maragall de lucha contra el Alzheimer, y en otros proyectos que tienen como objetivo estas enfermedades. Por eso, hemos sido enormemente sensibles a la propuesta que en su día se nos hizo desde Springer Nature de dedicar a las enfermedades neurodegenerativas la 9ª edición del Ciclo de Conferencias y Debates en Ciencias.

Raimundo Pérez-Hernández y Torra
Director de la Fundación Ramón Areces



Desde que se iniciaron las actividades en la Fundación Ramón Areces, la biomedicina ha ocupado un primer lugar y, dentro de ella, ha habido dos grandes prioridades: por un lado, las neuropatías y, por otro lado, el desarrollo oncológico. Estas prioridades se han hermanado con las denominadas *enfermedades raras*, consideradas raras únicamente desde el punto de vista epidemiológico.

Esta 9ª edición de Ciclos de Conferencias y Debates en Ciencias, desarrollados en colaboración con Springer Nature, se centra en los avances y en los cambios sustanciales que se han producido en estos últimos años, tanto en la percepción de la propia naturaleza de las enfermedades neurodegenerativas como en el reconocimiento de sus bases moleculares y la compleja regulación genética y epigenética de las mismas, que se ha visto traducido en una mayor longevidad de los pacientes afectados.

Estos avances científicos están favoreciendo un progreso extraordinario en patologías como el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y el Parkinson. Dejo para último lugar el Parkinson porque es la única alteración de la que ya años atrás, cuando impartía clases de biología molecular, conocíamos las alteraciones y la posibilidad de utilizar tratamientos dirigidos a compensar la dopamina. Sin embargo, en los últimos 10-15 años se ha producido un progreso extraordinario. Este cambio se ha extendido incluso a patologías más estrictamente psiquiátricas como la esquizofrenia, permitiendo establecer las bases moleculares que, en última instancia, serán la base para un tratamiento efectivo.

Siempre recuerdo que la finalidad de D. Ramón Areces, cuando creó esta Fundación que lleva su nombre, fue la de abordar la ciencia precisamente para evitar o paliar el sufrimiento humano. En este sentido, las enfermedades neurodegenerativas cobran cada día mayor importancia, tanto a nivel exclusivamente científico como a nivel traslacional. Son numerosas las peticiones de ayuda que recibimos en nuestra Fundación, en el marco de los Concursos Nacionales de Ayudas a la Investigación en Ciencias de la Vida y de la Materia, a proyectos científicos centrados en el propio enfermo y en una aproximación cada vez más personalizada de sus alteraciones.

Por todo ello, insto a Springer Nature y a su directora editorial para España y Portugal, Soledad Santos Suárez, a que sigamos trabajando juntos, sobre todo en temas de esta naturaleza. ■

Federico Mayor Zaragoza

Presidente del Consejo Científico de la Fundación Ramón Areces

Bienvenidos a esta 9ª conferencia-debate, fruto de la colaboración entre la Fundación Ramón Areces y el grupo Springer Nature, dedicada a las enfermedades neurodegenerativas, principalmente a la esclerosis lateral amiotrófica, a la enfermedad de Parkinson y a la de Alzheimer.

Tras casi una década de conferencias, desde Springer Nature queremos agradecer a la Fundación Ramón Areces esta fructífera colaboración que, durante estos años, nos ha permitido aunar esfuerzos en nuestro objetivo común de servir a la comunidad científica y de divulgar la ciencia. Agradecemos especialmente al Comité Científico, representado en esta mesa por los profesores Federico Mayor Zaragoza y José María Medina, que nos acoge cada año y colabore siempre con gran criterio en la elección de un tema que sea del mayor interés para el público en general. Al Director General de la Fundación, el Sr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra, y al Sr. Manuel Azcona, Director de Comunicación, les agradecemos que nos abran las puertas de la Fundación para realizar estas jornadas.

Hace ya unos meses, cuando empezamos a pensar en esta conferencia, nos preguntamos: ¿son las enfermedades neurodegenerativas el reto del siglo XXI? Con una sociedad que cada vez goza de una mayor esperanza de vida, la prevalencia de estas enfermedades va en aumento, y sin embargo, aún no existe cura para ninguna de ellas. El cerebro y sus enfermedades han sido siempre difíciles de estudiar, pero gracias al avance de las técnicas de biología molecular y las de imagen *in vivo*, ahora conocemos detalles sobre la conectividad neuronal, su desarrollo y su deterioro impensables hace una década. Creemos que las enfermedades neurodegenerativas son el reto del siglo XXI, pero estamos convencidos de que los avances actuales y los de un futuro próximo nos permitirán afrontar este reto permitiendo un diagnóstico precoz y un tratamiento orientado a evitar el deterioro cognitivo que todas ellas producen.

Para conocer de primera mano los avances en este campo, contamos con la participación de los Dres. Jeffrey Rothstein, José Obeso, Arthur Konnerth y Christian Haass. Es para nosotros un honor que hayan aceptado participar en estas conferencias; les estamos muy agradecidos y esperamos que sea para ellos una experiencia tan interesante como para nosotros.

Por último, quisiera dar las gracias a Erika Pastrana, editora de la revista *Nature Communications*, que este año toma las riendas de la moderación de este evento. Gracias por tu disponibilidad y compromiso en la preparación de esta jornada.

Muchas gracias a todos; espero que disfruten de las conferencias y su debate posterior.

Soledad Santos

Directora Editorial España y Portugal,
Springer Healthcare, a Springer Nature business

introducción



Erika Pastrana

Editora Jefa de sección.
Nature Communications,
Nueva York, EE. UU.

Erika es licenciada en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid y obtuvo su doctorado en la misma universidad de la mano del Dr. Javier Díaz-Nido, investigando los mecanismos celulares y moleculares responsables de promover la regeneración de axones dañados en el sistema nervioso central de los mamíferos. Posteriormente se trasladó a Nueva York, donde realizó estudios posdoctorales en la Universidad de Columbia, en el laboratorio de la Dra. Fiona Doetsch, donde estudió la forma en la que se crean nuevas neuronas y se incorporan a los circuitos de ciertas áreas del cerebro de los mamíferos adultos. En 2010 se unió a la revista *Nature Methods* como la editora responsable de Neurociencias, convirtiéndose en editora sénior en el año 2013. Después, Erika se incorporó a *Nature Communications*, donde en estos momentos supervisa al equipo editorial de Neurociencias.





Introducción

Bienvenidos a todos. Hoy vamos a hablar sobre enfermedades neurodegenerativas. Las enfermedades neurodegenerativas son en la actualidad una prioridad dado que se tratan de enfermedades difíciles, se conoce poco sobre ellas y requieren de un tratamiento muy prolongado. Además, son enfermedades con un gran impacto ya que afectan a los pacientes, a sus familias y a toda la comunidad implicada. Se estima que en unos 35 años se duplicará la población mayor de 65 años y, por tanto, es prioritario que los gobiernos y la sociedad entiendan la magnitud de estas enfermedades.

Las tres enfermedades que abordamos hoy presentan características comunes como la disfunción de propiedades normales de las neuronas y una sintomatología patológica que las caracteriza y que ayuda a establecer su diagnóstico. El desconocimiento sobre su origen impide que pueda identificarse a los pacientes antes de que se desarrolle la enfermedad y, actualmente, no hay cura para ninguna de ellas. Por tanto, ante esta situación es importante establecer una terapia que permita al menos frenar su evolución y, para ello, es fundamental conocer los mecanismos implicados. |

conferencias



MECANISMOS PATOLÓGICOS DE LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS. ÉNFASIS EN ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Prof. Jeffrey D. Rothstein

Director, Brain Science Institute y del Robert Packard Center for ALS Research, Facultad de Medicina, Johns Hopkins University, Baltimore, EE. UU.



RETOS Y AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Dr. José A. Obeso

HM Hospitales, Centre for Integrative Neuroscience A.C., Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Carlos III, Madrid, España



DISFUNCIÓN DE LOS CIRCUITOS NEURONALES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Prof. Dr. Arthur Konnerth

Instituto de Neurociencia de Technische Universität München, Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Múnich, Alemania

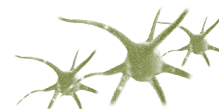


ENFERMEDAD DE ALZHEIMER - DE LA PATOLOGÍA CEREBRAL A LAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO

Dr. Christian Haass

Universidad Ludwig Maximilian de Múnich. Centro Alemán de Enfermedades Neurodegenerativas, Múnich, Alemania





Mecanismos patológicos de las enfermedades neurodegenerativas. Énfasis en esclerosis lateral amiotrófica

Prof. Jeffrey D. Rothstein

Director, Brain Science Institute y del Robert Packard Center for ALS Research, Facultad de Medicina, Johns Hopkins University, Baltimore, EE. UU.

Andy Growth, el consejero delegado de INTEL, empresa que se dedica a la elaboración de chips, hablando del Parkinson comentó que si viniera un meteorito que fuese a aterrizar en EE. UU. o Europa y los astrofísicos lo detectasen nos prepararíamos, ya que su impacto destruiría tierras, ciudades, fábricas, etc. E hizo un símil con las enfermedades degenerativas como de las que vamos a hablar hoy aquí, ya que suponen un «meteorito» para la salud y la economía y van a suponer una carga enorme para nuestra sociedad. Los científicos tenemos que ser conscientes de la magnitud de estas enfermedades y hacer lo que podamos para evitar dicho impacto tratando de esclarecer los mecanismos implicados en ellas y de encontrar terapias eficaces.

Descripción de la patología de la esclerosis lateral amiotrófica

En concreto, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa de tipo neuromuscular que afecta a adultos entre 40 y 70 años y más frecuentemente a varones. Se origina cuando las células del sistema nervioso (SN) llamadas *motoneuronas* disminuyen gradualmente su funcionamiento y mueren, provocando una parálisis y debilitamiento muscular progresivo. Los pacientes afectados



Prof. Jeffrey D. Rothstein

presentan movimientos musculares involuntarios (fasciculaciones), espasticidad y degeneración de las neuronas motoras que afecta virtualmente a todos los nervios corticoespinales. Se inicia en una parte del cuerpo como un brazo, una pierna o ambos brazos o piernas y se generaliza a todo el organismo afectando al habla, la deglución, la respiración; además, tiene un pronóstico mortal.

En un principio, se creyó que esta enfermedad afectaba únicamente al sistema motor, pero en la actualidad sabemos que una proporción alta de pacientes



desarrolla también demencia, una demencia muy leve de la que algunos pacientes no son conscientes y que en un 10-15% de los casos puede ser muy grave y solaparse con otra enfermedad neurodegenerativa, la demencia temporal frontal.

En la ELA, las neuronas motoras corticales de la corteza cerebral, que son neuronas de tracto largo, y las neuronas que se conectan a los músculos se degeneran, mueren y dan lugar a los síntomas característicos de esta enfermedad. También se ven afectadas otras poblaciones de células como las interneuronas.

Implicación de la expansión en el *Chromosome 9, Open Reading Frame 72* en la esclerosis lateral amiotrófica

La ELA es fundamentalmente una enfermedad esporádica (de origen desconocido), aunque en un 5-10% de los pacientes tiene origen genético y se hereda de manera autosómica dominante. Los factores ambientales (alimentación, factores de exposición, etc.) no parecen jugar un papel relevante en esta enfermedad.

Se han producido muchos avances genéticos en los últimos años que han permitido identificar genes relacionados con el desarrollo de la enfermedad y, a principios de los años noventa, se descubrió por primera vez un gen implicado en la patología, el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1), un enzima antioxidante que está presente en casi todas las células. Posteriormente, se ha descubierto otra serie de genes implicados (*TDP43*, *FUS*, etc.) aunque el avance más importante se produjo en 2011, cuando se descubrió el *Chromosome 9, Open Reading Frame 72* (*C9orf72*), que representa casi un 60% de los casos heredados. Más aún, este gen está presente también en el 10% de los pacientes con ELA de EE. UU. sin historia familiar de afectación previa y en el 20% de los afectados en Europa.

Estudios recientes demuestran que los pacientes que tienen esta mutación (*C9orf72*) también pueden desarrollar demencia temporal frontal, pudiendo presentar

un hermano ELA y la hermana demencia. Además, en este caso se trata de una alteración del mismo gen con distinta manifestación fenotípica. Se ha comprobado que la mutación no se produce en un solo punto, sino que se encuentra en el primer fragmento del cromosoma donde se produce una gran expansión de nucleótidos repetidos (GGGGCC)_{exp} pudiendo repetirse hasta miles de veces. Un individuo normal tiene unas 30 repeticiones, pero si se sobrepasa este número (normalmente entre 80 hasta 2.000 repeticiones), la persona desarrollará ELA o demencia temporal frontal.

Sabemos muy poco de este gen y de la función de la proteína que regula, pero se postula que se trata de una proteína DENN (factores de intercambio de nucleótidos de guanina para pequeñas GTPasas) que interviene en el transporte de membranas, y se ha demostrado que hay una relación entre el desarrollo de la enfermedad y esta expansión del intrón. En el gen *C9orf72* mutado, una secuencia de seis nucleótidos se repite muchas más veces de lo normal. Estos tramos repetitivos de ácido desoxirribonucleico (ADN) producen moléculas de ácido ribonucleico (ARN) que pueden interferir con las proteínas de la célula. Sin embargo, hasta ahora se desconocía qué sistemas celulares específicos eran afectados por estos dos productos de la mutación; para explicarlo se propusieron tres teorías. Una primera teoría consideraba que se produce una disfunción de la proteína cuya síntesis regula *C9orf72*, aunque no ha sido respaldada por la evidencia. Una segunda teoría sostenía que, cuando existen grandes expansiones de ARN, este se puede combinar con determinadas proteínas, como ocurre en enfermedades como la distrofia y otras enfermedades musculares, y estos agregados pueden generar focos repetidos de ARN en los núcleos, lo cual se traduce en un nivel tóxico de ARN. La tercera teoría consideraba que estos nucleótidos repetidos codifican dipéptidos tóxicos (traslación RANT [*Repeat Associated Translation*]), cuya codificación todavía no



está muy bien esclarecida ya que carecen de codón, pero que están presentes en el cerebro de los enfermos.

Una forma de estudiarlos es aislar los genes mutados e inocularlos a ratones para ver si reproducen la enfermedad, pero en el caso de la ELA la extrapolación de ratón a humano es difícil. Hace algunos años empezamos a construir otros modelos de estudio a partir de células inducidas pluripotenciales (iPS) obtenidas de la piel o la sangre de los propios pacientes. Estas células pueden convertirse en neuronas motoras, astrocitos, oligodendrocitos, etc., y se han validado como modelos o plataformas para estudiar esta enfermedad.

A partir de estos modelos, tres grupos científicos encontraron evidencia de que la mutación afecta el transporte nuclear en las neuronas cultivadas a partir de células de la piel de los pacientes. El equipo del Dr. Taylor demostró que estas neuronas tienen mucho más ARN en el núcleo en comparación con las creadas a partir de células control sanas, lo que implica que la mutación impide que el ARN salga del núcleo. Los otros dos grupos de investigación descubrieron posteriormente que las neuronas derivadas de pacientes con ELA tenían además problemas para traer ciertas proteínas al núcleo.

Empleando diferentes modelos (modelos en levaduras, moscas, cerebro humano, etc.) se ha demostrado y corroborado en varios laboratorios que el gen *C9orf72* está involucrado en el transporte núcleo-citoplasmático. La expansión repetida de este gen implicado en la enfermedad produce una alteración en el transporte del citoplasma al núcleo y se han observado agregados de RanGAP en células iPS de neuronas motoras y neuronas corticales humanas de pacientes con ELA. Más aún, en las autopsias de pacientes con ELA se ha constatado una acumulación de RanGAP en los márgenes de la membrana nuclear.

«La expansión repetida de C9orf72 interrumpe los poros nucleares y el transporte núcleo-citoplasmático produciendo una acumulación de ARN en el núcleo y de la proteína RanGAP en el citoplasma de las neuronas»

Poros nucleares y tráfico núcleo-citoplasmático: un proceso celular fundamental altamente coordinado

El poro nuclear tiene un tamaño de 120 nm, está constituido por más de 30 proteínas distintas pero todo el complejo en su totalidad está constituido por unas 450 proteínas con rasgos únicos. En el poro se localizan los filamentos citoplasmáticos que contribuyen al transporte atrayendo a las proteínas que se quieren transportar; estas proteínas se filtran a través de las proteínas FG (fenilalanina-glicina). Las proteínas FG presentan semividas muy largas (años), por lo que los defectos en estas proteínas pueden producirse años antes de que se desarrolle la disfunción celular, que es característica de las enfermedades neurodegenerativas.

Hay hasta 1.500 poros nucleares en cada célula del mamífero y varían en cada tipo de célula. Se han utilizado modelos con mutación de C9 en ratones, como el C9-Bac (Ranum Lab) y el (G4C2)⁶⁶ viral Tg, y se ha corroborado que estos ratones desarrollan la misma patología neurodegenerativa que la observada en los pacientes con ELA. Ambos modelos desarrollan agregación de los polipéptidos RAN (*RAs-related Nuclear protein*) y focos de ARN, neurodegeneración y gliosis, así como alteración de *TDP43*.



«Los modelos animales con mutación de C9 desarrollan las mismas alteraciones que las observadas en células iPS humanas y las proteínas FG del poro están alteradas»

Las proteínas FG son proteínas que tienen el dominio hidrofóbico fenilalanina-glicina repetido y dominios de baja complejidad (por sus siglas en inglés, LCDs), de tal manera que forman un hidrogel que actúa como barrera permeable. Las proteínas LCD implicadas en la ELA (TDP-43, FUS, hnRNPA1, y hnRNPA2B) tienen todas ellas la propiedad de interactuar con los poros nucleares. Otras proteínas implicadas en la enfermedad, como GLE1 y pom121, también regulan el transporte a través de los poros y cuando C9 está mutado la funcionalidad del poro se ve alterada observándose una agregación citoplasmática masiva. La patología del poro nuclear GLE1 observada en modelos de ratón se ha corroborado además en el cerebro humano y esta alteración se observa muchos meses antes de que se manifieste la enfermedad.

Polipéptidos repetidos y alteración del transporte núcleo-citoplasmático

También podemos expresar de forma artificial las proteínas dipeptídicas en células humanas. Así se ha constatado que estas proteínas dipeptídicas modifican el transporte nuclear y producen una alteración del gradiente a través del poro. Se ha demostrado que estos dipéptidos pueden alterar el transporte de muchas formas. En las neuronas iPS (C9orf72) no hay una distribución regular de los poros nucleares que regulan la transcripción local. En la ELA esporádica se ha observado una deslocalización de RanGAP y una desregulación del transporte de los TDP-43 que, en vez de estar en el núcleo, se quedan retenidos en el citoplasma. Estu-

dios en transporte nuclear constatan que en neuronas iPS C9orf72 hay un defecto en la importación nuclear.

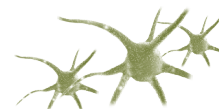
«La expresión excesiva de proteínas dipeptídicas reduce el número de poros y altera el transporte nuclear»

Futuras opciones de tratamiento

En relación con la posible aplicación de estos descubrimientos en el tratamiento de la enfermedad se ha comprobado que si se bloquean estas expansiones de ARN repetidos con oligonucleótidos antisentido (ASO) puede impedirse que se unan a otras proteínas de unión a ARN. Otra de las limitaciones en el desarrollo de estos tratamientos es que debe garantizarse que lleguen al SN y, en este sentido, hemos comprobado que esta terapia inhibe la expansión de ARN en el SN, aunque quedan 1-2 años para corroborar las posibles implicaciones clínicas. Dado que se pueden medir las proteínas dipeptídicas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en las células iPS, hemos corroborado que la terapia con ASO elimina dichos dipéptidos.

En los pacientes con ELA se observa un aumento de estos dipéptidos en el LCR y los pacientes con mutación C9 presentan estos dipéptidos antes de manifestar la enfermedad, aunque no existe correlación entre los niveles y la gravedad de la misma. Es un biomarcador estable y puedo avanzar que los ensayos dirigidos a pacientes se iniciarán dentro de un año.

«Los oligonucleótidos antisentido (ASO) bloquean las expansiones de ARN repetidos y eliminan las proteínas dipeptídicas en el LCR y en las células iPS, por lo que podría ser una opción de tratamiento para esta enfermedad»



Retos y avances en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

Dr. José A. Obeso

HM Hospitales, Centre for Integrative Neuroscience A.C., Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Carlos III, Madrid, España

La enfermedad de Parkinson, tal y como ha comentado previamente el Prof. Mayor Zaragoza, comparte una serie de características generales con el resto de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, hay una diferencia muy notable, como es el hecho de que llevamos treinta o cuarenta años de tratamiento sintomático y se ha conseguido que la esperanza de vida se alargue hasta ser muy cercana a la de la población normal. Con la enfermedad de Parkinson se vive y se envejece y este envejecimiento con una enfermedad neurodegenerativa constituye un reto neurobiológico nuevo. La mayoría de la experimentación animal en Parkinson se ha llevado a cabo con animales jóvenes, lo que supone una pérdida de perspectiva para abordar este aspecto.

También quiero resaltar que este año celebramos 200 años desde que James Parkinson diagnosticó su enfermedad. Dos siglos después los pacientes se parecen bastante, lo que es importante desde un punto de vista etiopatogénico. A continuación, vamos a abordar el estado actual del Parkinson, los desafíos ante los que nos encontramos y la hipótesis de nuestro propio trabajo.

Estado actual del Parkinson

La tríada de la enfermedad de Parkinson está constituida por temblor, rigidez y acinesia. En esta enfermedad se observa una pérdida de neuronas



Dr. José A. Obeso

pigmentadas de la sustancia nigra, por causas que todavía se desconocen, con el consiguiente déficit de dopamina.

El tratamiento es sintomático y está basado en compensar el déficit de dopamina mediante la administración de levodopa u otros fármacos dopaminérgicos. Con esta terapia se puede alterar el proceso, pero sin detener el mecanismo neurogenerativo. Esto ha hecho que los pacientes no lleguen a situaciones extremas como hace 20 años, en los que presentaban movimientos involuntarios incapacitantes. Las neuronas



que sobreviven, un 4% aproximadamente, presentan agregados de proteínas denominados *cuerpos de Lewy*, que resultan tóxicas. Además, ahora se puede medir *in vivo* el déficit de dopamina con pruebas de neuroimagen.

Retos de la enfermedad de Parkinson

Actualmente, se sabe que la tríada clásica de la enfermedad de Parkinson puede ir acompañada de otros síntomas motores (alteración del equilibrio, habla, etc.) o no motores (hiposmia, depresión, alteraciones del sueño o deterioro cognitivo), y algunos de estos últimos pueden ser marcadores precoces de la enfermedad.

Los dos hechos capitales del tratamiento sintomático de la enfermedad son el descubrimiento de levodopa como precursor de la dopamina y la recuperación mediante cirugía por ultrasonidos. Se ha avanzado en el tratamiento de tal manera que las manifestaciones motoras típicas están bastante controladas. Nuestro reto actual consiste en tratar de detener la enfermedad, que en la fase inicial está muy focalizada en el déficit de dopamina, y evitar la neurodegeneración progresiva límbico-cortical con el consecuente desarrollo de trastornos serios en todo el organismo, como afectación de la marcha y del equilibrio, habla, posturas anormales, problemas no motores (estreñimiento, salivación, hipotensión y sueño) y sobre todo trastornos cognitivos. En los pacientes con Parkinson se aumenta seis veces el riesgo de desarrollar demencia.

Los patólogos alemanes Braak y su esposa desarrollaron como hipótesis un mapa de agregados (proteínas tóxicas) y postularon que las alteraciones se inician desde el tronco del encéfalo e incluso desde el plexo mesentérico y estos agregados van invadiendo todo el cerebro hasta desarrollar una encefalopatía. De hecho,

se planteó la hipótesis de detener la enfermedad a nivel digestivo; esta fue criticada en una publicación en *Nature Reviews*. Actualmente estamos estudiando esta hipótesis en un estudio con 50 babuinos a los que se administró agregados proteicos patológicos de pacientes para desarrollar un modelo de la enfermedad y corroborar si desde el sistema digestivo u otras partes del cerebro puede reproducirse esta extensión del proceso.

«El reto actual del tratamiento para la enfermedad de Parkinson es detener la enfermedad antes de que se produzca la neurodegeneración límbico-cortical»

Investigaciones en el HM Centro Integral de Neurociencias A.C.

El objetivo del HM Centro Integral de Neurociencias A.C. (CINAC) es detener el avance de la enfermedad y para ello es importante conocer el inicio y la progresión en la pérdida de las neuronas del SN. Se han identificado las neuronas dopaminérgicas más vulnerables, y se localizan en el nivel ventro-lateral de la sustancia nigra y se proyectan al putamen motor. Estas neuronas se dedican al aprendizaje y a la ejecución de los procesos automáticos (habituales) que permiten llevar a cabo varias tareas al mismo tiempo, y su sobre-estimulación es causa de manifestaciones importantes de la enfermedad.

En personas jóvenes la enfermedad de Parkinson se caracteriza por una pérdida de neuronas en la sustancia nigra y por la aparición de acúmulos de sinucleína en muchas localizaciones. Un 25-30% de los jóvenes desarrolla la enfermedad antes de los 30 años,



pero conforme se envejece aumenta la vulnerabilidad a la enfermedad.

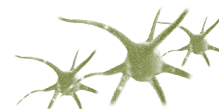
«Las neuronas dopaminérgicas situadas a nivel ventro-lateral de la sustancia nigra encargadas del desarrollo de procesos automáticos multitarea son especialmente vulnerables a la degeneración»

La dopamina es el neurotransmisor que controla las tareas motoras habituales (hablar, correr, conducir, etc.) pero también se activa la vía de la dopamina

cuando realizamos tareas más complejas o cuando hay una gran emoción. Las neuronas descritas como especialmente vulnerables son neuronas con gran arborización sináptica, lo que genera gran estrés metabólico por multitarea. Estas neuronas están siempre activas, lo que constituye una ventaja evolutiva si la esperanza de vida fuera 50 años. Pero en nuestra sociedad, con una esperanza de vida mucho mayor, constituye un grupo de neuronas especialmente vulnerables a la neurodegeneración.

Como conclusión, el objetivo del tratamiento actual es parar el deterioro cognitivo del SN autónomo y considero que pronto podremos establecer cortafuegos y detener la enfermedad.





Disfunción de los circuitos neuronales en la enfermedad de Alzheimer

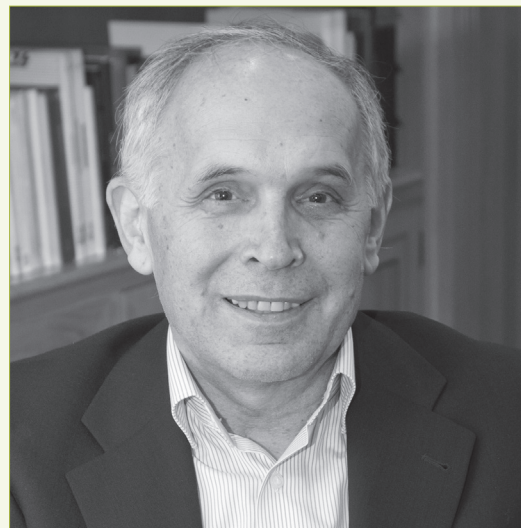
Prof. Dr. Arthur Konnerth

Instituto de Neurociencia de Technische Universität München, Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Múnich, Alemania

En la enfermedad de Alzheimer se conoce mucho sobre los mecanismos moleculares, la importancia del beta-amiloide y los síntomas clínicos de la patología cerebral desde que los describió Alzheimer. Sin embargo, existe un gran vacío respecto a los problemas precisos de las funciones de las neuronas debido a la falta de herramientas que nos permitan conocer la función cerebral, y como alternativa la opción que tenemos es remitirse a modelos animales. Incluso en los modelos animales es difícil analizar en células aisladas o cortes cerebrales la actividad eléctrica de las neuronas de forma precisa. El objetivo de estos experimentos fue siempre determinar qué componentes (beta-monómeros, oligómeros, placas, etc.) estaban implicados en la toxicidad observada en la enfermedad de Alzheimer.

Estudios experimentales *in vivo* en la enfermedad de Alzheimer

La aparición de un método de imagen óptica, como es la imagen de dos fotones *in vivo* de circuitos neuronales, permitió que pudiésemos teñir varias células del tejido cerebral del ratón y medir su funcionalidad simultáneamente. Para ello, la cabeza del ratón se fija frente a una pantalla y se analiza el cambio en la fluorescencia, lo cual indica un cambio en la concentración de calcio intracelular y en el potencial de acción, lo que, en última instancia, permite analizar cómo las moléculas de amiloide alteran la homeos-



Prof. Dr. Arthur Konnerth

tasis neuronal. Mediante este método podemos teñir diferentes células nerviosas, las placas de amiloide y las células de la glía, y analizar si la función de estas células está alterada cuando las placas de amiloide están presentes.

Para ello, hemos utilizado modelos animales con mutaciones en la presenilina (o proteína precursora de amiloide) en los que se ha constatado la aparición de placas de amiloide ya a la edad de seis meses y una presencia abundante de estas placas a los nueve meses. Cuando analizamos la actividad neuronal, en un experimento controlado, podemos observar que las células



control tienen una distribución normal de actividad, pero en aquellas células con mutaciones en la prenilina se obtienen registros de hipo- o hiperactividad, que se traducen en un silenciamiento general o una hiperactividad prolongada debido a una desregulación entre la excitación e inhibición neuronal. En concreto, se observaron neuronas hiperactivas cerca de las placas de amiloide que dan lugar a una actividad epileptoide.

«Las células nerviosas mutadas de los modelos experimentales de Alzheimer presentan una actividad alterada caracterizada por un silenciamiento general o una hiperactividad prolongada debido a una desregulación entre excitación e inhibición de la actividad neuronal»

Mecanismo celular implicado en la desregulación de la actividad

Respecto al mecanismo celular, tratamos de determinar si existe una implicación de las placas o si la parte implicada era la parte soluble de las moléculas que preceden a la formación de las placas en la zona del hipocampo. Para ello, llevamos a cabo un estudio en la zona del hipocampo de estos animales y analizamos el desarrollo de la enfermedad en un estadio precoz (1,8 meses) sin placas y en otro más tardío (6 meses), en el que ya se observaba la presencia de las mismas. En la etapa precoz, la actividad estaba aumentada en una fracción de células de los ratones mutantes con Alzheimer, por lo que concluimos que la hiperactividad precede a la formación de placas en el hipocampo y otras partes de la corteza. Esta hiperactividad es reversible y puede ser tratada con inhibidores de la gamma-secretasa.

El silenciado neuronal se corresponde con un estadio tardío que requiere la presencia de placas, en el que la parte soluble está activamente implicada. Todos estos experimentos nos llevaron a proponer un modelo en el que el primer paso es un aumento de los niveles de beta-amiloide que inducen la hiperactividad. Esta hiperactividad puede producir deterioro cognitivo de dos maneras distintas, una es la hiperactividad fásica relacionada con la epilepsia y otra manera es la hiperactividad tónica. En esta patología parece ser más importante la hiperactividad que la hipoactividad o muerte neuronal, dado que la falta de función puede ser compensada por la red neuronal, pero el aumento de función puede enviar una señal errática al sistema que altera el proceso normal de información. Estas células hiperactivas, debido probablemente a la acumulación de calcio o a través de otros mecanismos, derivan finalmente en un silenciamiento y muerte celular.

Deterioro de la onda lenta al desplazar el equilibrio entre excitación/inhibición

Analizamos a continuación cómo puede afectar el mal funcionamiento local a la función a largo plazo. Mediante estudios de resonancia funcional en pacientes se ha visto que se produce una desincronización entre determinadas áreas del cerebro y observamos una descomposición severa de la actividad oscilatoria de onda lenta. Estas ondas pueden estudiarse en estados de sueño profundo y durante la anestesia, y son intrínsecas de la función cerebral difíciles de inhibir. Estas ondas se inician en la corteza y se proyectan al tálamo y al hipocampo. Están presentes desde antes del nacimiento y para estudiarse pueden emplearse medios ópticos. En animales anestesiados puede observarse en la parte posterior de la corteza unos destellos de luz que se corresponden con la actividad de los neurocitos y que se propaga en el cerebro de forma coordinada al córtex, el tálamo y el hipocampo, pudiendo determinar



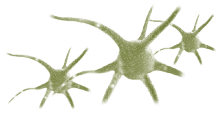
la velocidad de propagación en menos de un segundo y garantizando la adquisición de los recuerdos. Estos registros eléctricos se pueden correlacionar con la actividad de las concentraciones de calcio. Se observa una gran diferencia entre los animales *wild-type* y los transgénicos. La inserción de una fibra óptica en la parte frontal y posterior permite registrar la actividad en estas zonas que se superponen en los animales *wild-type*. Sin embargo, en los ratones transgénicos no se observa ninguna correlación debido a un aumento de la actividad y a la desaparición del sincronismo. Se ha estudiado también en humanos, mediante tomografía por emisión de positrones (PET), electroencefalograma y resonancia funcional, y se ha corroborado el inicio de estas ondas espontáneas en la corteza frontal con problemas de estabilización de la memoria y funcionales.

Este desglose puede tener un impacto directo en la consolidación de las huellas recientes de la memoria, en las que el beta-amiloide juega un papel clave en el

deterioro de la onda lenta al desplazar el equilibrio entre excitación/inhibición. El deterioro puede restaurarse mediante la administración de fármacos psicoactivos (benzodiazepinas) que reducen la excitabilidad neuronal al potenciar la inhibición GABAérgica.

¿Es efectiva la inmunoterapia?

Se ha testado en modelos de ratones la efectividad de la inmunoterapia empleando anticuerpos monoclonales contra el beta-amiloide. Estos anticuerpos se habían utilizado en ensayos clínicos fase 3 en los que se comprobó que reducían la carga amiloide cerebral y se ha corroborado también en ratones. Sin embargo, no hay evidencia de mejoría clínica. En los ratones se observó hiperactividad antes de tratarse, pero después de tratarlos se produjo una reducción de amiloide en placa acompañada de un empeoramiento de la hiperactividad, lo que explicaría el fracaso de la terapia, probablemente asociado a la movilización de fragmentos solubles tóxicos.



Enfermedad de Alzheimer - De la patología cerebral a las estrategias de tratamiento

Dr. Christian Haass

Universidad Ludwig Maximilian de Múnich. Centro Alemán de Enfermedades Neurodegenerativas, Múnich, Alemania

Cascada amiloide y enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la formación de placas del péptido beta-amiloide hidrófobo. Estas placas se agregan con otras fibras constituyendo las denominadas *tangles* o marañas sobre las neuronas y producen muerte celular.

El péptido beta-amiloide se sintetiza mediante la acción de enzimas proteolíticos que escinden los péptidos en determinados puntos y los separan de sus precursores. El precursor es una proteína mucho más grande que, tras la acción de los enzimas beta- y gamma-secretasas, libera el péptido beta-amiloide, el cual se agrega posteriormente formando las placas de amiloide. Este no es un mecanismo patológico, sino que se trata de un mecanismo que tienen todos los cerebros y, por tanto, todos tenemos en teoría el riesgo de presentar Alzheimer. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer los péptidos amiloides están aumentados. En personas con síndrome de Down, que presentan trisomía en el cromosoma 21, se ha observado también un aumento de la producción de amiloide que desemboca en el desarrollo de Alzheimer a la temprana edad de 50 años.



Dr. Christian Haass

«El aumento de la producción de beta-amiloide es el mecanismo desencadenante de la enfermedad de Alzheimer»



Mutaciones en la enfermedad de Alzheimer

Existe un 1-2% de los casos de Alzheimer de origen genético e inicio temprano de la enfermedad (a los 20 años aproximadamente) en el que la transmisión se produce de manera autosómica dominante entre familiares y en el que existen tres genes mutados: el gen que codifica la proteína precursora de beta-amiloide (mutación en el lugar de unión del enzima secretasa), y el gen que codifica la presenilina 1 (mutación en el centro activo de g-sec) y la presenilina 2 (mutación en el centro activo de g-sec). La primera mutación se traduce en un aumento en la síntesis de beta-amiloide y la consiguiente activación de las secretasas, mientras que las otras mutaciones generan un aumento de la segregación. Se han identificado más de 200 mutaciones en las presenilinas (gamma-secretasas) que en última instancia contribuyen desplazando el punto de corte en dos aminoácidos a la derecha, generando péptidos más largos, facilitando la agregación y produciendo placas de amiloide más rápidamente. Este es el mecanismo descrito en aquellos casos de desarrollo de Alzheimer a edad temprana. Otra prueba a favor de que el aumento de la producción de beta-amiloide es el mecanismo desencadenante de la enfermedad de Alzheimer la encontramos en Islandia, donde existen factores de protección frente al Alzheimer y la demencia, que se han localizado en una mutación que protege el desarrollo de Alzheimer al reducir la producción de beta-amiloide en un 30-40%.

¿Por qué fracasan los tratamientos que actúan sobre la cascada amiloide?

El hecho de que numerosos ensayos clínicos centrados en la regulación de este mecanismo hayan fracasado se debe a que, al inhibir las beta-secretasas, se afectan a numerosos mecanismos regulados por estas enzimas. Experimentos llevados a cabo en peces cebra y ratones en los que se había modificado

genéticamente el funcionamiento de las beta-secretasas provocaron una alteración de la mielinización. Recientemente, se ha demostrado que hay otra alteración en los pacientes con Alzheimer que altera el punto de unión de las n-secretasas a la proteína del péptido de amiloide y genera un fragmento más largo y otro más corto. Se ha comprobado que el fragmento más largo reduce en gran medida el funcionamiento neuronal.

En nuestro grupo estamos llevando a cabo un estudio en el que tratamos ratones con inhibidores de la beta-secretasa y hemos observado un aumento dramático de los péptidos amiloides neurotóxicos y de otros 34 sustratos cerebrales adicionales de la beta-secretasa, de los cuales no sabemos cuál es realmente su función. En el caso de las intervenciones sobre la regulación de la gamma-secretasa, las consecuencias son aún mayores ya que es un enzima encargado de regular la transcripción genética y afecta a mecanismos de diferenciación celular.

Opciones de tratamiento

Una tercera opción sería el desarrollo de una vacuna frente al Alzheimer, opción que en modelos con ratones ha resultado muy eficaz. En estudios *in vitro*, llevados a cabo sobre fragmentos de cerebro a los que se administró anticuerpos y macrófagos cerebrales, se comprobó que las células microgliales eliminaban las placas amiloides.

Cuando se desarrollan las placas de amiloide hay un mecanismo por el cual las células microgliales actúan para degradar estas placas. En aquellos pacientes con alteraciones en el gen *TREM2*, las microglías tienen alterado este mecanismo produciendo una acumulación de las mismas y un desarrollo tardío de la enfermedad. La vacunación podría prevenir esta acumulación, pero datos recientes señalan que la eliminación de estas placas no se correlaciona con una mejoría en las funciones



de memoria de los pacientes. Esto se debe a que la patología empieza décadas antes de que se manifiesten los síntomas clínicos.

Un pequeño estudio llevado a cabo en pacientes todavía en la fase temprana de la enfermedad constató cierta estabilización en la memoria de los pacientes tras la eliminación de las placas de amiloide y, actualmente, se está desarrollando un estudio más amplio para constatar estos datos preliminares.

Ante esta situación, en nuestro laboratorio estamos reclutando familiares de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer de transmisión genética. Una vez constatado que presentan la mutación, el objetivo es tratarlos con inhibidores de la beta-secretasa y determinar si podemos prevenir el desarrollo de la enfermedad.

Por último, necesitamos biomarcadores funcionales de la enfermedad de Alzheimer en su fase precoz que permitan prevenirla y monitorizarla, y por eso, estamos tratando de detectar la molécula TREM2 en el LCR de estos pacientes. Los estudios que hemos desarrollado demuestran que la molécula TREM2

aumenta durante el envejecimiento, tanto en personas con Alzheimer como en controles sanos, y un aumento de la concentración de TREM2 se correlaciona con la pérdida de memoria observada en los pacientes, con la muerte celular y con el aumento de la concentración de T-tau en el LCR. El aumento de amiloide en el LCR viene seguido por un aumento de T-tau y, finalmente, aumentan los niveles de TREM2, lo que favorece la degradación de amiloide por las células de microglía. Esto constituye una importante diana para el tratamiento de la enfermedad, siempre teniendo en cuenta que las células de microglía se activarían después de la muerte celular.

«La detección de los niveles de TREM2, el cual favorece la degradación de amiloide por las células de microglía, podría ser un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en su fase precoz»

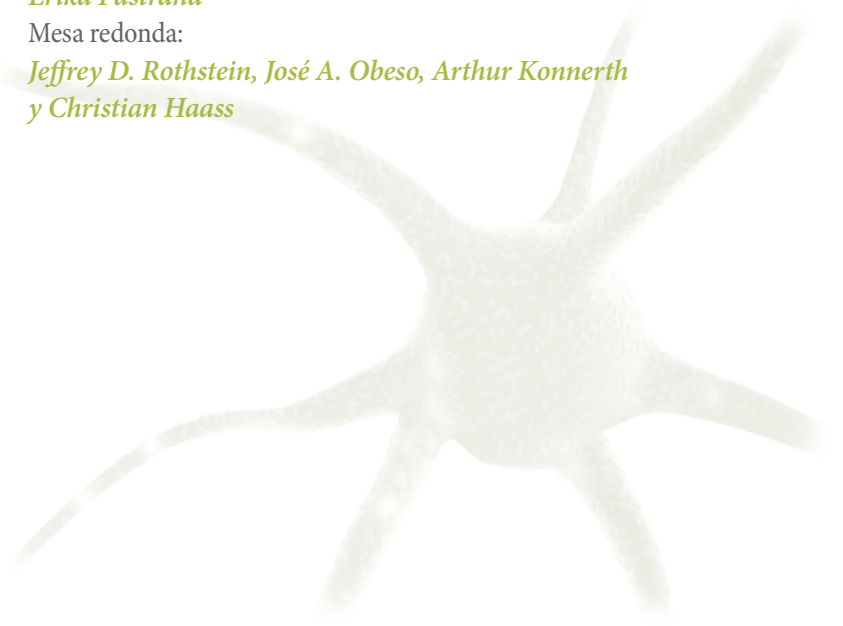
debate

Moderadora:

Erika Pastrana

Mesa redonda:

*Jeffrey D. Rothstein, José A. Obeso, Arthur Konnerth
y Christian Haass*





Debate

Hemos oído mucho sobre los efectos particulares de todas estas enfermedades en las neuronas y en la actividad neuronal, así como que la microglía se ve afectada. En los experimentos in vivo han analizado los astrocitos y me gustaría saber si los astrocitos y la glía podrían estar implicados en parte de estos efectos.

Dr. Konnerth: Nosotros no hemos estudiado los astrocitos concretamente pero sí existe evidencia de otros investigadores que se produce un aumento de la concentración de calcio en los mismos. Sin embargo, este análisis adolece de considerar que la activación glial depende en gran medida de la anestesia y, por tanto, debería realizarse en animales no anestesiados. Los astrocitos presentan además el problema de que tienen unos cuerpos muy pequeños y unos largos filamentos que no se ven con microscopia estándar y que están muy implicados en los procesos.

Dr. Rothstein: Quería añadir que en nuestras investigaciones debemos considerar que hay dife-



De izquierda a derecha: Soledad Santos (sentada), José A. Obeso, Christian Haass, Federico Mayor Zaragoza, Arthur Konnerth, Jeffrey D. Rothstein y Erika Pastrana (sentada).

rentes subgrupos de astrocitos con funciones muy diferentes.

Dr. Haass: Las células microgliales son importantísimas, no solo porque se comen la placa de amiloide, sino que, cuando tienen la mutación del *TREM2*, ya no se comen dichas placas y se ve afectado el metabolismo energético de todo el cerebro, aunque el *TREM2* solo esté presente en las células microgliales. Respecto a

los subtipos, los oligodendrocitos también desempeñan un papel importante.

Ha enfatizado el Dr. Rothstein las modificaciones nucleares en el proceso del envejecimiento. ¿Se encuentran estas anomalías también en otros tejidos metabólicamente activos?

Dr. Rothstein: Las mutaciones que causan la ELA están en todas las



células, pero la composición de los poros nucleares varía de unas células a otras. Por ejemplo, las mutaciones del NUX causan la enfermedad de Huntington, mientras que la mutación en el GLI1 está implicada en la ELA.

En España han hecho pruebas con síndrome de Down y las catequinas de té verde, y se ha visto que disminuye la progresión del Alzheimer. ¿Sabe algo al respecto?

Dr. Haass: No estoy convencido de que el consumo de té verde detenga la enfermedad. También se ha analizado en Parkinson.

Dr. Rothstein: Todos mis pacientes me preguntan sobre nutrientes, pero hoy en día no hay ningún alimento específico que tenga la misma potencia de un fármaco y que haya demostrado detener la enfermedad.

En relación con los biomarcadores, la presencia de tau en el LCR no es útil para el seguimiento de los pacientes. ¿Hay algún marcador en el caso del Parkinson como es el caso de marcadores de la dopamina, ya que la neuroimagen en muchas ocasiones se ve comprometida para llevar a cabo un buen seguimiento?

Dr. Obeso: En el Parkinson y el Alzheimer nos dirigimos hacia marcadores en la neuroimagen que marquen la muerte celular, como

tau, ubiquitina, etc. Sueño con el día que podamos hacer cartografiado *in vivo* de estos procesos.

Dr. Rothstein: La mayor parte de los neurólogos no tiene un marcador de muerte celular. El neurofilamento en el LCR podría dar un marcador en bruto, pero, a diferencia de lo que ocurre en otras enfermedades como el cáncer, en el que puedes ver el tumor y valorar su posible reducción, nosotros no disponemos de dichos marcadores y únicamente contamos con algunas imágenes de inflamación.

Usted habló de los depósitos de amiloide y nosotros los vemos en las células beta de los diabéticos. ¿Sabe si hay alguna asociación? En principio, nosotros no hemos visto ninguna asociación entre el Alzheimer y esta enfermedad metabólica.

Dr. Haass: La diabetes es considerada un factor de riesgo para el Alzheimer pero no sabemos si es a través del péptido amiloide. El motivo molecular no está claro, pero hay muchos laboratorios trabajando en ello.

Quería plantear una pregunta sobre los biomarcadores, que considero que son críticos. Todos habéis hablado que cuando las placas se desarrollan ya es tarde para frenar la enfermedad. ¿Cómo podríamos

abordar esta situación científicamente? ¿Qué tendríamos que hacer para descubrir biomarcadores que nos ayuden en fases más precoces? ¿Necesitaríamos marcadores funcionales, conductuales?

Dr. Haass: Considero que los marcadores de imagen son una herramienta espectacular. Las imágenes PET permiten ver los amiloides y saber qué está pasando. Sin embargo, es carísimo ya que supone más de 3.000 euros por paciente, y además, dado que no hay un tratamiento, supone un gasto sin repercusión clínica para el paciente.

Dr. Obeso: Creo que el problema no es que sea caro, sino que, además, las imágenes no nos permiten diagnosticar la enfermedad, me refiero a la enfermedad, no al proceso. Por ejemplo, yo acabo de ver un paciente esta mañana sin síntomas claros de Parkinson, sin ningún síntoma motor, pero en la imagen del escáner indica que tiene depleción de dopamina. No puedo asegurar que tenga Parkinson.

Dr. Rothstein: En el caso de la dopamina está más desarrollado, pero no tenemos equivalente de neuronas gabérgicas, de densidad sináptica, y necesitamos poder desarrollar esas herramientas. Puede que no sean útiles para hacer el seguimiento de los pacientes, pero sí servirían para hacer estudios y alguien, como la industria, debería implicarse en aportar la financiación.

Soy endocrinólogo, mi nombre es Carlos Rodríguez y estoy interesado en la neuropsicoendocrinología y, más concretamente, en la relación de microbiota y enfermedades neurodegenerativas. ¿Hasta qué punto consideran que una alimentación mal dirigida puede desencadenar estas enfermedades? Me llama la atención el caso de Islandia, país con una base de alimentación piscícola y la relación de los ácidos grasos omega-3 que actúa sobre la mielina y la fisiología de las neuronas.

Dr. Haass: Se están haciendo muchas investigaciones sobre microbiota y Alzheimer. Concretamente, se están llevando a cabo investigaciones en ratones con modelos de Alzheimer con modificación o no de la microbiota y, en aquellos en los que se altera la microbiota, se

observan cambios profundos en términos de formación de placas. Sin embargo, estos resultados no son replicables. En otra investigación desarrollada muy elegantemente en peces, se ha visto que la microbiota afecta al proceso de envejecimiento de los peces, de tal forma que, si regeneras la microbiota de los peces viejos con microbiota de peces jóvenes, los peces viejos rejuvenecen. Sin embargo, todavía queda por establecer los mecanismos implicados. En el caso de Islandia, la resistencia a desarrollar Alzheimer se produce en algunas familias que tienen una mutación en la producción de amiloides y no sé a ciencia cierta si tiene relación con la dieta piscícola. En Japón se han llevado a cabo estudios sobre la relación de la dieta y estas enfermedades

que indican que podría retrasar la enfermedad de Alzheimer.

Me gustaría saber por qué hay algunos enfermos con Alzheimer con deterioro físico profundo y otros, sin embargo, no tienen deterioro físico y solo presentan deterioro cognitivo.

Dr. Rothstein: Se debe a que hay diferentes subtipos dentro de estas enfermedades y, de hecho, igual estamos tratando a todos con el mismo tratamiento y estamos perdiendo eficacia.

Dr. Obeso: Todos los enfermos acaban teniendo alteraciones en las funciones básicas (presión arterial, salivación, etc.) y un deterioro físico (tragar, respirar, etc.). En las fases finales, el impacto de la enfermedad sobre las funciones básicas es muy grave.

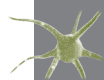
presentation



Raimundo Pérez-Hernández y Torra
Director of Ramón Areces Foundation

Federico Mayor Zaragoza
President of the Scientific Board
at Ramón Areces Foundation

Soledad Santos
Editorial Director Spain and Portugal,
Springer Healthcare,
a Springer Nature Business





Presentation



The Ramón Areces Foundation is an institution with scientific vocation that finances research projects in the fields of Life and Earth Sciences and Social Sciences. Throughout its large system of scholarship, it promotes human capital training and spreads scientific knowledge.

Within the Life and Earth Sciences, the Scientific Board and its President, Professor Mayor Zaragoza, have established a number of priorities in its scope. Among these priorities, rare diseases are the main concern, although neurodegenerative disorders (Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's disease) are also paramount. We promote many investigations in this field and we engage with other institutions, such as Pascual Maragall Foundation devoted to fight against Alzheimer's disease, and other projects aimed at these disorders. For this reason, we have been very sensitive to the proposal made by Springer Nature to dedicate the 9th Edition of the Conferences and Debates on Science to neurodegenerative disorders. ■

Raimundo Pérez-Hernández y Torra
Director of Ramón Areces Foundation



Since the activities in Ramón Areces Foundation started, Biomedicine has held the first position in our priorities and within this field, neuropathy and oncology development. These priorities have been included in the so-called rare diseases, which are rare only from an epidemiological viewpoint.

This 9th Edition of Conferences and Debates on Science, developed in collaboration with Springer Nature, focuses on the advances and substantial changes that have occurred in recent years, both in the perception of the nature of neurodegenerative disorders and in the recognition of their molecular basis and complex genetic and epigenetic regulation, which has been translated into a greater longevity of the patients affected.

These scientific advances are favouring an extraordinary progress in pathologies such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Parkinson's disease. I mention Parkinson's disease last because, years ago when I was teaching molecular biology, it was the only disorder in which the characteristics of the changes and the possible use of treatments aimed at increasing dopamine levels had been determined. However, extraordinary progress has been made in the last 10-15 years. This change has spread to even more strictly psychiatric pathologies such as schizophrenia, which has allowed to establish the molecular basis that, ultimately, will be the foundation for an effective treatment.

I always keep in mind that the purpose of Mr. Ramón Areces, when creating the Foundation bearing his name, was to address Science in order to avoid or alleviate human suffering. In this sense, neurodegenerative disorders are becoming more important, not only at an exclusively scientific level, but also at a translational one. In our Foundation, we receive numerous support applications within the framework of the National Competition Grants for Research in Life and Earth Sciences for funding scientific projects focused on patients and a more personalized approach to their disorders.

That is why I urge Springer Nature and its editor-in-chief for Spain and Portugal, Soledad Santos Suárez, to continue our mutual collaboration, especially in matters of this nature.

Federico Mayor Zaragoza

President of the Scientific Board at Ramón Areces Foundation

Welcome to this ninth conference-debate, which arises as a result of the collaboration between the Fundación Ramón Areces and the Springer-Nature group devoted to the study of neurodegenerative diseases, particularly amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and Alzheimer's.

After almost a decade of conferences, Springer-Nature wants to thank Ramón Areces Foundation for this fruitful collaboration which, over the years, has enabled us to work together in our common goal of serving the scientific community and popularize science. Especially, we would like to thank the Scientific Committee, represented at this table by professors Federico Mayor Zaragoza and José María Medina, who welcome us every year and always collaborate with great discretion in the choice of a topic that is of major interest to the public in general. We would also like to thank the General Director of the Foundation, Mr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra, and Mr. Manuel Azcona, Director of Communication, for opening up the doors of the Foundation to carry out these conferences.

A few months ago, when we began to think about this conference, we asked ourselves if neurodegenerative diseases were the challenge of the 21st century. With a society that increasingly enjoys a longer life expectancy, the prevalence of these diseases is on the rise; and yet, there is still no cure for any of them. The brain and its diseases have always been difficult to study; but thanks to the advances in molecular biology techniques and *in vivo* imaging, we now know details of the neuronal connectivity, its development and its deterioration, something that was unthinkable a decade ago. We believe that neurodegenerative diseases are the challenge of the 21st century, but we are also convinced that current and near future advances will enable us to confront this challenge, allowing diagnosis and treatment focused on preventing the cognitive impairment they all cause.

To learn first-hand of the advances in this field, we count on the participation of Drs. Jeffrey Rothstein, José Obeso, Arthur Konnerth, and Christian Haass. We are honoured and grateful that they have agreed to participate in these conferences and we hope the experience will be as rewarding for them as it is for us.

Finally, I would like to thank Erika Pastrana, editor of the Nature Communications journal, who will be the chairperson of this event. Thank you for your availability and commitment in the preparation of this conference.

I would like to thank you all for coming. I hope you enjoy the lectures and the subsequent discussions.

Soledad Santos

Editorial Director Spain and Portugal,
Springer Healthcare, a Springer Nature Business

introduction



Erika Pastrana

Team Manager-Editorial Nature Communications, New York, USA

Erika received her degree in Biochemistry and Molecular Biology from the Universidad Autonoma de Madrid and obtained her PhD from the same university with Dr Javier Diaz-Nido, studying cellular and molecular mechanisms responsible for promoting the regeneration of injured axons in the mammalian central nervous system. She later moved to New York where she did postdoctoral studies at Columbia University in the laboratory of Dr. Fiona Doetsch, studying how new neurons arise and get incorporated into circuits in certain areas of the adult mammalian brain. In 2010 she joined Nature Methods as the editor responsible for neuroscience, becoming Senior editor in 2013. Erika later moved to Nature Communications where she now oversees the neuroscience editorial team.





Introduction



Welcome you all. Today we are going to talk about neurodegenerative disorders. Neurodegenerative disorders are currently a priority since they are difficult diseases of which little is known and require long-term treatment. Furthermore, they are high-impact diseases since not only do they affect patients, but also their families and the community concerned. It is estimated that in 35 years' time, the population of over 65-year-olds will have doubled. Therefore, it is a priority that governments and society understand the magnitude of these diseases.

The three diseases we are dealing with today have common features such as a dysfunction of the normal properties of neurons and a specific pathological symptomatology that helps us to establish a diagnosis. The lack of knowledge about their origin prevents us from indentifying patients before the disease develops and, currently, there is no cure for any of them. Therefore, in this situation it is important to establish a therapy that can, at least, slow down their progression and, therefore, it is essential to know the mechanisms involved. |

lectures



PATHOLOGICAL MECHANISMS OF NEURODEGENERATIVE DISORDERS - PARTICULARLY ALS

Prof. Jeffrey D. Rothstein

Director, Brain Science Institute and Robert Packard Center for ALS Research, Faculty of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, USA



CHALLENGES AND ADVANCES IN THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE

Dr. José A. Obeso

HM Hospitales, Centre for Integrative Neuroscience A.C., Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases, Institute Carlos III, Madrid, Spain



NEURAL CIRCUIT DYSFUNCTION IN ALZHEIMER'S DISEASE

Prof. Dr. Arthur Konnerth

Neuroscience Institute at Technische Universität München, Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany

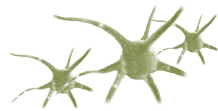


ALZHEIMER'S DISEASE - FROM BRAIN PATHOLOGY TO TREATMENT STRATEGIES

Dr. Christian Haass

Ludwig Maximilian University of Munich, German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany





Pathological mechanisms of neurodegenerative disorders - particularly ALS

Prof. Jeffrey D. Rothstein

Director, Brain Science Institute and Robert Packard Center for ALS Research, Faculty of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, USA

Andy Growth, CEO at INTEL, a company dedicated to the production of chips, when speaking about Parkinson's disease, said that if a meteorite were to crash in the USA or Europe and astrophysicists could detect it beforehand, we would prepare ourselves since its impact would destroy land, cities, factories, etc. He made a comparison with degenerative diseases like those we will be talking about today, since they are a "meteorite" for our health and economy systems and impose a huge burden on our society. As scientists, we must be aware of the magnitude of these diseases and do what we can to avoid their impact by trying to elucidate the mechanisms involved and finding effective therapies.



Prof. Jeffrey D. Rothstein

Description of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative motor neuron disease that affects adults between 40 and 70 years of age, and is more frequent in men. It starts when nervous system cells called motor neurons gradually decrease their performance and die, causing progressive muscle weakness and paralysis. Affected patients have involuntary muscle movements (twitching), spasticity and degeneration of the motor neurons that affect virtually all corticospinal nerves.

It starts in one part of the body such as an arm, a leg, or both arms or legs and spreads to the entire body affecting speech, swallowing, and breathing. In addition, it has a fatal outcome.

Initially, it was believed that this disease only affected the motor system, but we now know that a high percentage of patients also develop a very mild dementia of which some are not aware and in 10-15% of cases can be very serious and hidden under another neurodegenerative disorder, frontotemporal dementia.



In ALS, cortical motor neurons in the cerebral cortex, which are long tract neurons, and neurons connecting to muscles, degenerate and die, causing the characteristic symptoms of this disease. Other cell populations, such as interneurons, are also affected.

Involvement of C9orf72 (Chromosome 9, Open Reading Frame 72) expansion in ALS

ALS is mainly a sporadic disease (of unknown origin), although it has a genetic origin in 5-10% of patients, and is inherited in an autosomal dominant manner. Environmental factors (diet, exposure factors, etc.) do not seem to play an important role in this disease.

In recent years, there have been many advances in genetics that have allowed the identification of genes related to the development of the disease and, at the beginning of the 1990s, a disease-related gene, superoxide dismutase 1 (SOD1), an antioxidant enzyme which is present in almost all cells, was discovered for the first time. Subsequently, a number of other genes involved have also been discovered. The most important breakthrough came in 2011 with the discovery of C9orf72 (Chromosome 9 Open Reading Frame 72), which represents almost 60% of the inherited cases. Moreover, this gene is also present in 10% of ALS patients in the USA without family history and in 20% of European patients.

Recent studies have shown that patients with this mutation (C9orf72) can also develop frontotemporal dementia, and may have a brother with ALS and a sister with dementia. Furthermore, if this occurs, it means that there is an alteration of the same gene with different phenotypic manifestations. It has been proven that the mutation does not occur at a single point, but it is located in the first fragment of the chromosome where a great expansion of repeated nucleotides (GGGGCC)_{exp} occurs and can be repeated even

thousands of times. A normal individual has around some 30 repetitions, but if this number is exceeded (normally between 80 to 2,000 repetitions), the person will develop ALS or frontotemporal dementia.

We know very little of this gene and the function of the protein that it regulates, but it is hypothesized that it is a DENN protein (Rab-specific guanine nucleotide exchange factors of small GTPases) involved in the transport of membranes, and it has been shown that there is a relationship between the development of the disease and this intron expansion. In the C9orf72 mutated gene, a sequence of six nucleotides is repeated many more times than normal. These repetitive stretches of DNA produce RNA molecules that may interfere with cell proteins. However, until now, the specific cellular systems affected by these two products of the mutation have been unknown; three theories have been proposed. A first theory considered that there is a dysfunction in the protein whose synthesis regulates C9orf72, although there is no evidence supporting this. A second theory stated that when major expansions of RNA occur, this can be combined with certain proteins, as happens in dystrophy and other muscle diseases, and these aggregates may generate repeated focuses of RNA in nuclei, which translate into toxic levels of RNA. The third theory was that these repeated nucleotides encode toxic dipeptides (Repeat Associated Translation - RANT), whose encoding is not yet very clear since they lack codon, but are present in the patient's brain.

One way of studying them is to isolate the mutated genes and inoculate them into mice to see if they reproduce the disease; however, for ALS, the extrapolation from mouse to human is difficult. Some years ago we started to create other trial models from induced pluripotent stem cells (iPS) obtained from patients' skin or blood. These cells may turn into motor neurons, astrocytes, oligodendrocytes, etc. and have been validated as models or platforms for studying this disease.



From these models, three scientific groups found evidence that the mutation affected the nuclear transport in cultured neurons taken from patients' skin cells. Dr. Taylor's team showed that these neurons have much more RNA in the nucleus compared with those created from healthy control cells, implying that the mutation prevents RNA from leaving the nucleus. The other two research teams subsequently discovered that neurons obtained from ALS patients also had problems in bringing certain proteins to the nucleus.

Using several models (models in yeast, flies, human brain, etc.), it has been proven and corroborated in various laboratories that the C9orf72 gene is involved in the nucleocytoplasmic transport. The repeated expansion of this gene involved in the disease causes a change in the transport of cytoplasm to the nucleus and, furthermore, RanGAP aggregates in iPS cells of motor neurons and human cortical neurons of ALS patients have been observed. Moreover, an accumulation of RanGAP on the margins of the nuclear membrane in autopsies of ALS patients has been confirmed.

"The repeated expansion of C9orf72 interrupts nuclear pores and the nucleocytoplasmic transport causing an accumulation of RNA in the nucleus and of the RanGAP protein in the cytoplasm of neurons"

Nuclear pores and nucleocytoplasmic transport - a highly coordinated essential cell process

The nuclear pore has a size of 120 nm, it is composed of more than 30 different proteins, although the complex as a whole consists of some 450 proteins with unique features. The pore also contains cyto-

plasmic filaments that contribute to the transport by attracting the proteins that are to be transported; these proteins are filtered through FG proteins. FG proteins have very long half-lives (years), so defects in these proteins may occur years before cellular dysfunction, which is characteristic of neurodegenerative disorders.

There are up to 1,500 nuclear pores in each mammalian cell and may vary in different types of cells. Mice models with the C9 mutation, such as the C9-Bac (Ranum Lab) and the 66 viral Tg (G4C2), have been used and it has been verified that these mice developed the same neurodegenerative disorder as that observed in ALS patients. Both models developed aggregates of the RAN (*RAs-related Nuclear protein*) polypeptides and RNA foci, neurodegeneration and gliosis, as well as TDP43 changes.

"Animal models with Cg mutation develop the same alterations as those observed in human iPS cells, and pore FG proteins are also altered"

FG proteins are proteins that have their hydrophobic phenylalanine-glycine (FG) domain repeated and low complexity domains (LCDs), in such a way that they form a hydrogel that acts as a permeable barrier. LCD proteins involved in ALS (TDP-43, FUS, hnRNPA1, and hnRNPA2B) have the property of interacting with nuclear pores. Other proteins involved in the disease, such as GLE1 and pom121, also regulate the transport through the pores and when C9 is mutated, pore functionality is altered showing a massive cytoplasmic aggregation. Nuclear pore GLE1 pathology observed in mouse models has also been confirmed in the human brain and this alteration is observed many months before the disease appears.



Repeated polypeptides and nucleocytoplasmic transport alteration

We can also express dipeptide proteins artificially in human cells. Thus, these dipeptide proteins have been found to modify nuclear transport and cause an alteration of the gradient through the pore. These dipeptides have been shown to alter the transport in many ways. In iPS (C9orf72) neurons there is a regular distribution of nuclear pores regulating local transcript. In sporadic ALS, a relocation of RanGAP and a deregulation of TDP-43 transport have been observed, which rather than being at the nucleus, are retained in the cytoplasm. Studies in nuclear transport show that C9orf72 iPS neurons have a defect in the nuclear import.

"The excessive expression of dipeptide proteins reduces the number of pores and alters nuclear transport"

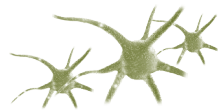
Future treatment options

Regarding the possible application of these discoveries in the treatment of the disease, it has been shown that if these RNA repeat expansions are blocked with

antisense oligonucleotides (ASOs), their binding to other RNA-binding proteins may be prevented. Another limitation in the development of these treatments is that it must be ensured that they reach the nervous system and, in this regard, we have seen that this therapy inhibits RNA expansion in the nervous system, although there are 1-2 years to confirm the potential clinical implications. Since dipeptide proteins can be measured in the cerebrospinal fluid (CSF) and iPS cells, we have confirmed that antisense oligonucleotide therapy clears these dipeptides.

Patients with ALS show an increase of these dipeptides in the CSF and those patients with a mutation in C9 have these dipeptides before presenting with the disease, although there is no correlation between levels of dipeptides and the severity of the disease. It is a stable biomarker and I can advise that trials in patients will begin within a year.

"Antisense oligonucleotides (ASOs) block RNA repeat expansions and eliminate dipeptide proteins in CSF and iPS cells, which could constitute a treatment option for this disease"



Challenges and advances in the treatment of Parkinson's disease

Dr. José A. Obeso

HM Hospitales, Centre for Integrative Neuroscience A.C., Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases, Institute Carlos III, Madrid, Spain

Parkinson's disease, as previously mentioned by Professor Mayor Zaragoza, shares a number of characteristics with other neurodegenerative disorders. However, a noticeable difference is that we have thirty or forty years of symptomatic treatment, and the life expectancy of Parkinson's disease sufferers has been extended to be very close to that of the normal population. The aging process when living and getting older with Parkinson's disease constitutes a new neurobiological challenge. The majority of animal experimentation in Parkinson's has been conducted with young animals, which represents a loss of perspective when addressing this aspect.

I also want to emphasize that this year we celebrate 200 years since James Parkinson diagnosed his illness. Two centuries later, patients are very similar, which is important from an etiopathogenic viewpoint. We will address the current status of Parkinson's disease, the challenges we face and the hypothesis of our own work.

Current status of Parkinson's disease

Parkinson's disease is characterized by a triad of symptoms, tremor, rigidity and akinesia. In this disease there is a loss of pigmented neurons in the substantia nigra for reasons that are still unknown, resulting in dopamine deficiency.



Dr. José A. Obeso

Treatment is symptomatic and is based on compensating dopamine deficiency by administering levodopa or other dopaminergic medications. The process can be altered with this therapy but without stopping the neurodegenerative mechanism. This means that patients do not reach extreme situations as happened 20 years ago when they experienced disabling involuntary movements. Surviving neurons, approximately 4%, have protein aggregates called Lewy bodies, which are toxic. In addition, we are now able to measure dopamine deficiency *in vivo* using neuroimaging techniques.



Challenges of Parkinson's disease

It is currently known that the classic triad of symptoms of Parkinson's disease may be accompanied by other motor symptoms (balance, speech or other dysfunctions) or non-motor symptoms (hyposmia, depression, sleep disorders or cognitive impairment), and some of the latter may be early markers of the disease.

The two main facts of the symptomatic treatment of the disease are the discovery of levodopa as a precursor of dopamine and the recovery by ultrasound surgery. Treatment has progressed in such a way that typical motor manifestations are largely controlled. Our current challenge is to try to stop the disease in the early stage where it is very focused on dopamine deficiency, and avoid progressive limbic-cortical neurodegeneration with the consequent development of serious disorders throughout the body such as gait and balance disorders, speech, abnormal postures, non-motor dysfunctions (constipation, salivation, hypotension and sleep) and, above all, cognitive impairment. The risk of developing dementia is 6-fold higher in patients with Parkinson's disease.

German pathologists, Braak and his wife, advanced an hypothesis of a map of aggregates (toxic proteins) and stated that alterations are initiated from the brain stem and even from the mesenteric plexus, and that these aggregates invade the entire brain resulting in encephalopathy. In fact, it was hypothesized that the disease could be stopped at a digestive level, which was criticized in a publication in *Nature Reviews*. We are currently studying this hypothesis in a study with 50 baboons that were given patients' pathological

protein aggregates to develop a model of the disease and verify if this extension of the process may be reproduced from the digestive system or other parts of the brain.

"The current challenge of Parkinson's disease management is to stop the disease before limbic-cortical neurodegeneration occurs"

CINAC research

The aim of CINAC (HM *Centro Integral de Neurociencias* A.C. [CINAC]) is to stop the progression of the disease and, for that purpose, it is important to know when the loss of nervous system neurons starts and its progression. The most vulnerable dopaminergic neurons have been identified, and are located in the ventro-lateral level of the substantia nigra and projected to the motor putamen. These neurons are dedicated to learning and implementation of (usual) automatic processes that allow performing several tasks at the same time, and their overstimulation is the cause of important manifestations of the disease.

Parkinson's disease is characterized by a loss of neurons in the substantia nigra and the emergence of synuclein accumulation in many locations in young people. Between 25% and 30% of young people develop the disease before the age of 30 but as the patient gets older the vulnerability to the disease increases.



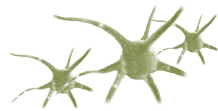
"Dopaminergic neurons located at ventro-lateral level of the substantia nigra, responsible for the development of multitasking automatic processes, are particularly vulnerable to degeneration"

Dopamine is the neurotransmitter that controls common motor tasks (talking, running, driving, etc.)

but the dopamine pathway is also activated when we perform more complex tasks, or when there is excitement. The neurons described as particularly vulnerable are those with large synaptic trees, which generate great metabolic stress by multitasking. These neurons are always active, which constitutes an evolutionary advantage if life expectancy were 50 years. But in our society, with a life expectancy far longer, this group of neurons is especially vulnerable to neurodegeneration.

We may conclude that the aim of the current treatment is to stop the cognitive impairment of the autonomous nervous system, and I believe that we will soon be able to establish firewalls and stop the disease.





Neural circuit dysfunction in Alzheimer's disease

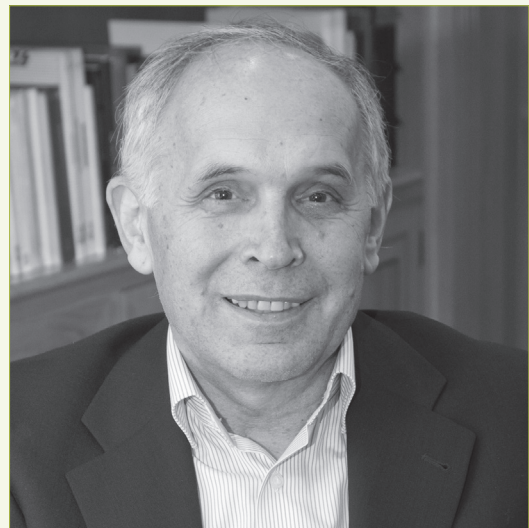
Prof. Dr. Arthur Konnerth

Neuroscience Institute at Technische Universität München, Cluster for Systems Neurology (SyNergy),
Munich, Germany

The molecular mechanism of Alzheimer's disease, the importance of amyloid- β and the clinical symptoms of the brain pathology are well known since Alzheimer described them. However, a huge gap in the knowledge of the precise problems of nerve cell functions is due to the lack of tools that allow us to learn about brain function. Alternatively, we have the option of referring to animal models. But even then, it is difficult to accurately analyze the electrical activity of neurons in isolated cells or brain cuts. The purpose of these experiments was always to determine which components (β -monomers, oligomers, plaques, etc.) were involved in the toxicity observed in Alzheimer's disease.

"In vivo" experimental studies in Alzheimer's disease

The emergence of an optical imaging method such as *in vivo* imaging with two-photon excitation microscopy of neuronal circuits allowed us to stain several cells of mouse brain tissue and measure their performance simultaneously. To do this, the mouse head is set against a screen and the change in fluorescence is analyzed, which indicates a change in the intracellular calcium concentration and in the potential action, which ultimately allows analyzing of the way in which amyloid molecules alter neuronal homeostasis. Using this method we can dye various nerve cells, amyloid plaques and glial



Prof. Dr. Arthur Konnerth

cells and analyze whether the function of these cells is altered when amyloid plaques are present.

To this end, we have used animal models with mutations in the presenilin (or amyloid precursor protein) in which the emergence of amyloid plaques occurred as soon as 6 months of age and the abundant presence of these plaques could be established at 9 months. When we look at the neuronal activity in a controlled experiment, we can observe that control cells have a normal distribution of activity, but in those cells with mutations in the presenilin, records of



hypoactivity or hyperactivity are obtained, which translates into a general silencing or a prolonged hyperactivity due to a deregulation between neuronal excitation and inhibition. In particular, we observed that overactive neurons close to amyloid plaques resulted in an increased epileptoid activity.

"Mutated nerve cells in experimental models of Alzheimer's disease have an altered activity characterized by a general silencing or a prolonged hyperactivity due to a deregulation between excitation and inhibition of the neuronal activity"

Cell mechanism involved in activity deregulation

Regarding the cell mechanism, we tried to determine whether plaques or the soluble part of the molecules preceding plaque formation in the hippocampus were involved. Thus, we conducted a study in the hippocampus of these animals and analyzed the development of the disease in an early stage (1.8 months) without plaques and in a later stage (6 months) in which the presence of plaques was already observed. In the early stage, activity was increased in a fraction of cells of mutant mice with Alzheimer's, so we concluded that hyperactivity precedes plaque formation in the hippocampus and other parts of the cortex. This hyperactivity is reversible and can be treated with γ -secretase inhibitors.

Neuronal silencing corresponds to a later stage of the disease requiring the presence of plaques and in which the soluble part is actively involved. All these experiments led us to propose a model in which the first step was an increase in the levels of amyloid- β

inducing hyperactivity. This hyperactivity can produce cognitive impairment in two different ways, seizure-related phasic hyperactivity or tonic hyperactivity. In this pathology, hyperactivity seems to be more important than hypoactivity or neuronal death since the lack of function can be compensated by the neural network. However, the increase in function may send an erratic signal to the system altering the normal processing of information. These hyperactive cells, probably due to the accumulation of calcium or through other mechanisms, finally result in silencing and cell death.

Deterioration of the slow wave when changing the excitation/inhibition balance

We analyze here below how local malfunction can affect long-term function. Using functional resonance studies in patients, we have seen a desynchronization among certain areas of the brain as well as a severe breakdown of the oscillatory slow-wave activity. These waves can be studied in states of deep sleep and during anaesthesia, and are intrinsic to the brain function, thus difficult to inhibit. These waves start in the cortex and project to the thalamus and the hippocampus. They are present before birth and optical imaging is required to study them. In anaesthetized animals, a few flashes of light, that correspond to neurocite activity, can be seen in the back of the cortex, which spread in a coordinated manner to the rest of the brain reaching cortex, thalamus and hippocampus. The speed of propagation is determined in less than 1 second and ensures the acquisition of the memories. These electric registries can be correlated with the activity of calcium concentrations. A great difference between wild-type and transgenic animals is observed. The insertion of an optical fibre in the front and back allows the recording of the activity in these areas that are overlapped in wild-type animals. However, in transgenic mice there is no correlation due to an increase in the acti-

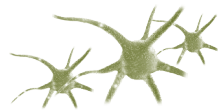


vity and the disappearance of synchronism. It has also been studied in humans, using PET, electroencephalogram and functional resonance, and the onset of these spontaneous waves in the frontal cortex is related to memory and functional stabilization problems.

This breakdown can have a direct impact on the consolidation of recent traces of memory, in which the amyloid- β plays a key role in the deterioration of the slow wave when changing the balance between excitation/inhibition. Deterioration may be restored by administering psychoactive drugs (benzodiazepines) that reduce neuronal excitability when promoting GABAergic inhibition.

Is immunotherapy effective?

The effectiveness of immunotherapy with monoclonal antibodies against amyloid- β has been tested in mouse models. These antibodies were used in phase 3 clinical trials in which it was found that they reduced brain amyloid load, which was also confirmed in mice. However, there is no evidence of clinical improvement. Hyperactivity was observed in mice before treatment, but after treatment there was a reduction of amyloid in plaque accompanied by a worsening of hyperactivity, which would explain the treatment failure, probably associated with the mobilization of toxic soluble fragments.



Alzheimer's disease - from brain pathology to treatment strategies

Dr. Christian Haass

Ludwig Maximilian University of Munich, German Centre for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany

Amyloid cascade and Alzheimer's disease

Alzheimer's disease is characterized by the formation of hydrophobic amyloid- β peptide plaques. These plaques are aggregated to other fibres constituting the so-called tangles on the neurons and causing cell death.

The amyloid- β peptide is synthesized by the action of proteolytic enzymes that divide peptides in certain places and separate them from their precursors. The precursor is a much larger protein that after the action of β enzyme and γ -secretases releases the amyloid- β peptide, which is subsequently aggregated forming amyloid plaques. This is not a pathological mechanism since every brain has it and, therefore, everyone has, in theory, the risk of developing Alzheimer's. However, the level of amyloid peptides is increased in Alzheimer's disease. An increase in the production of amyloid has also been observed in people with Down syndrome presenting Trisomy in chromosome 21, which leads to the development of Alzheimer's disease as early as 50 years of age.

"The increase in the production of amyloid- β is the triggering mechanism of Alzheimer's disease"



Dr. Christian Haass

Mutations in Alzheimer's disease

Between 1% and 2% of Alzheimer's cases have a genetic origin and an early onset (at approximately 20 years of age), in which the transmission is autosomal dominant among relatives and where three genes are mutated, the gene that encodes the amyloid- β precursor protein (mutation in the binding site of the secretase enzyme), the gene that encodes presenilin 1 (mutation in the active site of γ -sec) and presenilin 2 (mutation in the active site of γ -sec). The first mutation translates into an increased synthesis of the amyloid- β resulting in an activation



of secretases, while the other mutations generate increased segregation. More than 200 mutations in the presenilins (γ -secretases) have been identified, which ultimately contribute by displacing the cut-off point in two amino acids on the right, generating longer peptides, facilitating aggregation and producing amyloid plaques more quickly. This is the mechanism described in those cases in which Alzheimer's disease occurs at an early age. We also found evidence that the increase in the production of amyloid- β is the triggering mechanism of Alzheimer's disease in Iceland, where there are protective factors against Alzheimer's and dementia that have been found in a mutation that protects from the development of Alzheimer's disease by reducing the production of amyloid- β by 30-40%.

Why do treatments targeted to the amyloid cascade fail?

Numerous clinical trials focused on the regulation of this mechanism have failed because when inhibiting β -secretases, numerous mechanisms regulated by these enzymes are affected. Experiments conducted in zebra fish and mice in which the functioning of β -secretases had been genetically modified, caused altered myelination. Recently, patients with Alzheimer's disease have shown another alteration that affects the binding point of γ -secretases to the amyloid peptide protein, generating both a longer and a shorter fragment. The longer fragment has proven to greatly reduce neuronal functioning.

Our group is conducting a study in which mice are treated with β -secretase inhibitors and we have seen a dramatic increase in neurotoxic amyloid peptides and another 34 additional brain substrates of β -secretase, of which we do not really know the function. When trying to regulate γ -secretase, the consequences are even greater since this enzyme is responsible for regulating the genetic transcription and affects mechanisms of cell differentiation.

Treatment options

A third option would be the development of a vaccine against Alzheimer's, which has proven very effective in mouse models. In studies *in vitro*, conducted on brain fragments in which antibodies and brain macrophages were administered, it was found that microglial cells cleared amyloid plaques.

When amyloid plaques develop, there is a mechanism whereby the microglial cells act degrading these plaques. In those patients with alterations in the TREM2 gene, microglia have altered this mechanism producing accumulation and a late development of the disease. Vaccination could prevent this accumulation, but recent data indicate that the clearance of these plaques does not correlate with an improvement in patients' memory function. This is because the pathology begins decades before clinical symptoms appear.

A small study conducted in patients in the early phase of the disease found some stabilization in their memory after amyloid plaque clearance, and a large study is currently ongoing to confirm these preliminary data.

Considering this situation, we are recruiting relatives of patients affected by genetic Alzheimer's disease in our laboratory. Once verified that they have the mutation, the aim is to treat them with β -secretase inhibitors and determine if we can prevent the development of the disease.

Finally, we need functional biomarkers of Alzheimer's disease in its early stages that allow its prevention and monitoring, and for this reason, we are trying to detect the TREM2 molecule in patients' CSF. We have conducted studies showing that the TREM2 molecule increases during the aging process, both in people with Alzheimer's disease and in healthy controls and an increase in the concentration of TREM2 correlates with the memory loss observed in patients, along with cell death and the increase of T-tau concentration in the CSF. The increase of amyloid in CSF is



followed by an increase of T-tau and, finally, TREM2 levels increase, which promotes amyloid degradation by microglia cells. This is an important target for the treatment of the disease, always keeping in mind that microglia cells would be activated after cell death.

"The detection of TREM2 levels, which promote the degradation of amyloid by microglia cells, could be a biomarker for Alzheimer's disease in its early stage"

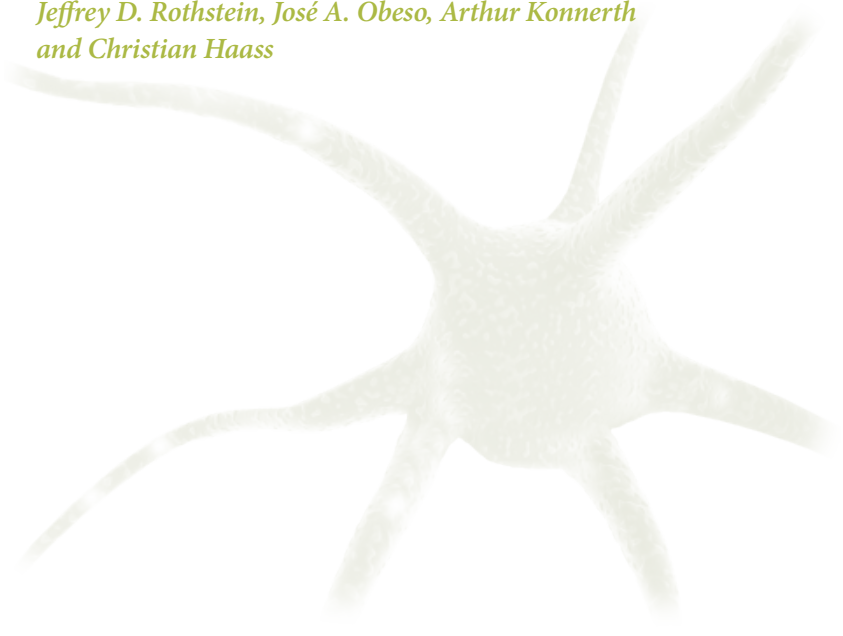
discussion

Moderator:

Erika Pastrana

Round table:

*Jeffrey D. Rothstein, José A. Obeso, Arthur Konnerth
and Christian Haass*





Discussion

We have heard much about the particular effects of all these diseases in neurons and neural activity, and that microglia is affected. Astrocytes have been analyzed in experiments in vivo and I'd like to know if astrocyte-sand glial cells may partly be involved in these effects.

Dr. Konnerth: We have not studied astrocytes specifically, but there is evidence from other researchers of an increase in their calcium concentration. However, this analysis does not consider that glial activation depends greatly on anaesthesia and, therefore, should be performed in non-anaesthetized animals. Astrocytes also have another problem, they have very small bodies and long filaments that cannot be seen with standard microscopy and that are very much involved in those processes.

Dr. Rothstein: I would like to add that in our investigations we must consider that there are different subgroups of astrocytes with very different functions.



From left to right: Soledad Santos (seated), José A. Obeso, Christian Haass, Federico Mayor Zaragoza, Arthur Konnerth, Jeffrey D. Rothstein and Erika Pastrana (seated).

Dr. Haass: Microglial cells are very important, not only because they “eat” the amyloid plaques, but because when they have TREM2 mutation and do not eat these plaques, the whole brain energy metabolism is affected even though TREM2 is only present in microglial cells. Regarding subtypes, the oligodendrocytes also play an important role.

Dr. Rothstein has emphasized the nuclear changes that occur in the aging process. Are these anomalies also found in other metabolically active tissues?

Dr. Rothstein: Mutations that cause ALS are in all cells but the composition of nuclear pores varies from one cell to another. For example, mutations in NUX cause Huntington's disease while



mutation in GLI1 is involved in ALS.

In Spain, studies on Down syndrome and the catechins of green tea have been conducted and it has been seen that they decrease the progression of Alzheimer's. Do you know anything about this?

Dr. Haass: I am not convinced that the consumption of green tea stops the disease. It was also analysed in Parkinson's.

Dr. Rothstein: All my patients ask me about nutrients, but today there is no particular food with the same power of a drug that has proven to stop the disease.

With regard to biomarkers, the presence of Tau in the CSF is not useful for patients' follow-up. Is there any marker for Parkinson's disease as it is the case with dopamine markers? Since neuroimaging is often compromised, preventing an adequate follow-up.

Dr. Obeso: In Parkinson's and Alzheimer's, we address markers in the neuroimaging that show cell death such as Tau, ubiquitin, etc. I dream of the day when we can make a mapping of these processes *in vivo*.

Dr. Rothstein: Most neurologists do not have a marker of cell death. The neurofilament in the CSF could give a gross marker but, unlike other diseases such as cancer in

which you can see the tumour and assess its possible reduction, we do not have such markers and only have some images of inflammation.

You have talked about amyloid deposits and we find them in beta cells of diabetic people, Do you know if there is any association? Initially, we have not seen any association between Alzheimer's and this metabolic disease.

Dr. Haass: Diabetes is considered a risk factor for Alzheimer's disease but we do not know if it is through the amyloid peptide. The molecular reason is not clear, but there are many laboratories working on it.

I wanted to ask a question about biomarkers that I think is critical. Everyone has said that when plaques are already present it is late to stop the disease. How could we address this situation scientifically? What should we do to discover biomarkers that help us in earlier stages? Do we need functional, behavioral markers?

Dr. Haass: I think that imaging markers are spectacular tools. PET images allow you to see the amyloid and know what is going on. However, it is very expensive since it involves more than 3,000 euros per patient, and moreover, since there is no treatment, it is a cost without clinical benefits for the patient.

Dr. Obeso: I think the problem is not only how expensive it is but the images do not allow us to diagnose the disease, I am referring to the disease, not the process. For example, I just saw a patient this morning without clear symptoms of Parkinson's or any motor symptom but the scanner image showed dopamine depletion. I cannot be sure that this patient has Parkinson's.

Dr. Rothstein: For dopamine it is more developed, but there is no equivalent to GABAergic neurons of synaptic density and we need to be able to develop those tools. They may not be useful for patients' follow-up but they would be useful for conducting studies and someone, such as the industry, should provide funding.

I'm an endocrinologist, my name is Carlos Rodríguez and I am interested in the neuro-psychoneuroendocrinology and, more specifically, in the relationship between microbiota and neurodegenerative disorders. To what extent do you consider that a misdirected diet can trigger these diseases? The case of Iceland catches my attention, a fish-based country and the relationship of omega-3 fatty acids which acts on myelin and neuron physiology.

Dr. Haass: Many researches on microbiota and Alzheimer's are

ongoing. Specifically, studies in mice with Alzheimer's with or without microbiota changes, and in those in which microbiota is altered, deep changes are seen in terms of plaque formation. However, these results are not replicable. In another "elegant" study in fish, microbiota has proven to affect the aging process of fish, so that if you regenerate the microbiota of old fish with microbiota of young fish, old fish rejuvenate. However, the mechanisms involved are yet to be estab-

lished. In the case of Iceland, resistance to develop Alzheimer's disease occurs in families that have a mutation in the amyloid production and I do not know for sure if it is related to a fish-based diet. Studies on the relationship of diet and these diseases indicating that Alzheimer's disease may be delayed have been carried out in Japan.

I would like to know why some patients with Alzheimer's disease have major physical impairment

whereas others only have cognitive impairment.

Dr. Rothstein: Is it because there are different subtypes within these diseases and, in fact, we may be treating everyone with the same therapy and thus losing efficiency.

Dr. Obeso: All patients end up with alterations in the basic functions (blood pressure, salivation, etc.) and a physical impairment (swallowing, breathing, etc.).

In the final stages, the impact of the disease on the basic functions is very serious.

Enfermedades neurodegenerativas

EL RETO DEL SIGLO XXI

En un momento en el que nuestra sociedad cada vez goza de una mayor esperanza de vida, las enfermedades que afectan a la capacidad cognitiva, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), están cada vez más presentes. Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo muy diverso de trastornos que se caracterizan por el fallo progresivo de la función del sistema nervioso. En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de estas enfermedades, y en la búsqueda de nuevas dianas, así como de biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano; sin embargo, estas enfermedades continúan siendo un gran reto para investigadores y clínicos. Los retos que plantea el estudio de estas enfermedades a nivel preclínico y la importancia de enfocar la investigación en el marco del paciente, así como las barreras para trasladar nuevos avances al ámbito clínico, son importantes para que la sociedad apoye la investigación en este campo y se mantenga informada sobre el futuro de las terapias dirigidas a los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

NEURODEGENERATIVE DISEASES

A 21ST CENTURY CHALLENGE

Nowadays, when life expectancy has increased worldwide, diseases that affect cognitive function, such as Alzheimer's, Parkinson's, or amyotrophic lateral sclerosis (ALS), are increasingly prevalent. Neurodegenerative diseases are a very diverse group of disorders characterized by a progressive failure of the nervous system. In recent years, there has been considerable progress in understanding their molecular and cellular bases. Although the discovery of new targets and biomarkers that allow early diagnosis have opened new lines of research, these diseases continue to be a great challenge for researchers and clinicians. These challenges include the study of these diseases at the preclinical level, the importance of a patient-centred approach in research, and barriers to the transference of new advances from basic research into the clinic. Society needs to understand these key issues in order to garner its support for research that will translate into future therapies for patients with neurodegenerative diseases.

