

DISCUSIÓN GENERAL

9. Discusión general

En este capítulo se reflexiona sobre la relación entre diversos aspectos que han sido tratados individualmente en los artículos de la sección anterior. También se presentan algunas ideas y consideraciones sobre la EA de carácter más general que no encajaban específicamente la discusión presentada en cada uno de los artículos presentados en la sección anterior.

Actualmente la EA afecta a cerca del 2% de la población en países industrializados. El riesgo de sufrir la enfermedad aumenta dramáticamente en individuos de edad superior a los 70 años y se calcula que su incidencia aumentará tres veces más durante los próximos 50 años (<http://www.alz.org>). El aumento progresivo de la esperanza de vida y la falta de un tratamiento curativo para esta enfermedad contribuyen a que el número de casos se amplíe cada año. En España hay alrededor de 600.000 personas afectadas, aunque posiblemente haya muchas más sin diagnosticar.

El cerebro de un paciente con EA sufre la mayor pérdida neuronal en el córtex entorrinal, hipocampo, córtex parietal, temporal y frontal (West *et al.* 1994). Las neuronas de la segunda capa del córtex entorrinal y del hipocampo son especialmente vulnerables. Las razones para esta selectividad aún no se conocen, pero pueden estar relacionadas con la expresión de genes asociados a la muerte neuronal, incluyendo a los receptores de glutamato, proteínas de unión a calcio y factores neurotróficos. El patrón de pérdida neuronal en la EA es similar, pero no idéntico, al del proceso normal de envejecimiento, lo que parece indicar que la patogenésis de la EA no es una simple aceleración del envejecimiento normal del cerebro. En la EA el número de neuronas que presentan ovillos neurofibrilares es muy grande, pero la pérdida neuronal supera al número de ovillos. Esto indica que las neuronas con ovillos son eliminadas y/o que algunas neuronas mueren sin formar ovillos (Gomez-Isla *et al.* 1997). La muerte de poblaciones neuronales en las regiones cerebrales afectadas en la EA ocurre aparentemente a lo largo de varios años. Esto significa que en cualquier momento se está produciendo la muerte de un número relativamente pequeño de neuronas. Este patrón espacio-temporal de muerte celular tiene características similares a las de la forma de muerte celular programada que se denomina apoptosis y no se parece al proceso de necrosis en el cual las células mueren en masa. Cada vez hay más datos que señalan que muchas neuronas deben morir por apoptosis en la EA, aunque esta no es la única forma de muerte celular que se da en la enfermedad (Lustbader *et al.* 2004).

▪

La mitocondria es un orgánulo celular estudiado extensamente en la EA esporádica. Su participación en diversos mecanismos vitales para la célula la ha convertido en una buena candidata para explicar muchos de los defectos metabólicos observados en los pacientes con EA. Los principales defectos mitocondriales observados son la disminución de la actividad de la CRM y el aumento del estrés oxidativo debido a la producción de ROS en la CRM. Estos defectos a su vez

discusión general

están relacionados con otros mecanismos que son los que pueden conducir a la neurodegeneración. La falta de energía en forma de ATP y el incremento de ROS pueden conducir a la obertura del mtPTP e iniciar la apoptosis. El aumento del estrés oxidativo en la EA está ampliamente documentado pero muchos de los cambios originados por la acción de radicales libres descritos en el cerebro de un paciente con EA también se han observado asociados al proceso del envejecimiento. Probablemente en la EA la acumulación de radicales libres es más rápida que en el envejecimiento y, por tanto, el riesgo de que las defensas antioxidantes de las neuronas no puedan contener el daño causado por las moléculas ROS es mayor (Benzi *et al.* 1995). Una de las cuestiones de debate habituales es si el estrés oxidativo es un hecho primario o secundario en la enfermedad. La postura tradicional es que las lesiones oxidativas en el cerebro de un individuo con EA intervienen en la neurodegeneración pero sin determinar con precisión si son la causa o una consecuencia (Beal 1995; Benzi *et al.* 1995; Sims 1996). Posteriormente, diversos estudios han descrito que el estrés oxidativo es crucial en la patogénesis de la EA. También se ha propuesto que el desequilibrio oxidativo y el consiguiente estrés son fenómenos tempranos en el desarrollo de la enfermedad y son secundarios a otros mecanismos específicos presentes en la EA pero no en otras enfermedades neurodegenerativas (Pratico *et al.* 2004). En cualquier caso, ya sea de forma primaria o secundaria a otras causas iniciadoras, la producción de radicales libres tiene efectos negativos y es parte de una cascada de sucesos que pueden conducir a la muerte neuronal (Markesbery 1997). En esta dirección se ha propuesto al estrés oxidativo como una de las dianas para la intervención terapéutica en las etapas iniciales de la enfermedad (Maurizi 2001; Allain *et al.* 2003).

Se ha descrito que el péptido amiloide puede dañar directa o indirectamente a la mitocondria (Hirai *et al.* 2001; Anandatheerthavarada *et al.* 2003). El péptido amiloide bloquea el complejo I de la CRM alterando la producción de ATP (Casley *et al.* 2002b). En mitocondrias aisladas, el péptido amiloide inhibe la respiración y la actividad enzimática de la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa (Casley *et al.* 2002a). El mecanismo por el cual el péptido amiloide entra en la mitocondria no se ha descubierto aún. Se ha descrito que el péptido amiloide se une en la mitocondria a la enzima alcohol deshidrogenasa y que esto hace aumentar la producción de ROS y la toxicidad. El bloqueo de la interacción A β -alcohol deshidrogenasa previene la producción de ROS y la muerte celular. (Lustbader *et al.* 2004). Como el estrés oxidativo y el desequilibrio del metabolismo energético pueden estar relacionados con el procesamiento de la PPA y producir la acumulación de formas potencialmente neurotóxicas de A β , se ha indicado que éste puede promover la amiloidogénesis (Gabuzda *et al.* 1994). Este último mecanismo puede contribuir al aumento de la producción del péptido amiloide en la forma de inicio tardío de la EA, ya que el estrés oxidativo y el desequilibrio metabólico aumentan con la edad. Este punto de vista es coherente con los estudios en cultivos celulares que indican que la función de la CRM es un requisito necesario para que se produzca la toxicidad del péptido amiloide. El hecho de que A β no dañe células deplecionadas de mtDNA, y en consecuencia sin CRM funcional, es una prueba potencial de que la interacción entre A β y la mitocondria es importante en la EA (Cardoso *et al.* 2001). La disfunción mitocondrial que provoca un déficit en la producción de energía puede contribuir al

deterioro de los sistemas de eliminación de los agregados proteicos y a la disfunción neuronal. Estos procesos afectan a los canales iónicos y la actividad de las bombas de membrana, a la neurotransmisión y al transporte dendrítico y axonal. Estas interacciones entre el péptido amiloide y la mitocondria se han observado principalmente en estudios *in vitro* y parece que se ajusta más a lo que ocurre en la EA familiar, en la que la disfunción mitocondrial tendría un papel secundario a otras causas (Swerdlow *et al.* 2004). Por el contrario, en la EA esporádica esta disfunción podría tener un papel más importante, incluso participando en el origen de la enfermedad. A partir de los datos existentes, y tomando parcialmente en cuenta la teoría del envejecimiento debida a los radicales libres, algunos grupos han formulado la llamada “hipótesis de la cascada mitocondrial” (figura 20) para explicar la aparición de la EA esporádica (Swerdlow *et al.* 2004). Esta hipótesis se basa en:

- 1) Las variaciones polimórficas heredadas de los genes nucleares y mitocondriales que codifican subunidades de la CRM determinan la eficiencia y la producción basal de ROS.

- 2) Existe una correlación entre la producción basal de ROS y la acumulación de daño oxidativo: a mayor producción de ROS, mayor y más rápida es la acumulación de daño en el mtDNA. A partir de este momento se desencadenarían tres respuestas que se asemejarían a características observadas en la cascada amiloide de la EA familiar (ver figura 6 de la introducción). Estas tres respuestas se muestran en los pasos 5, 6 y 7 de la figura 20 y representan la aparición de placas, ovillos, apoptosis y neurodegeneración.

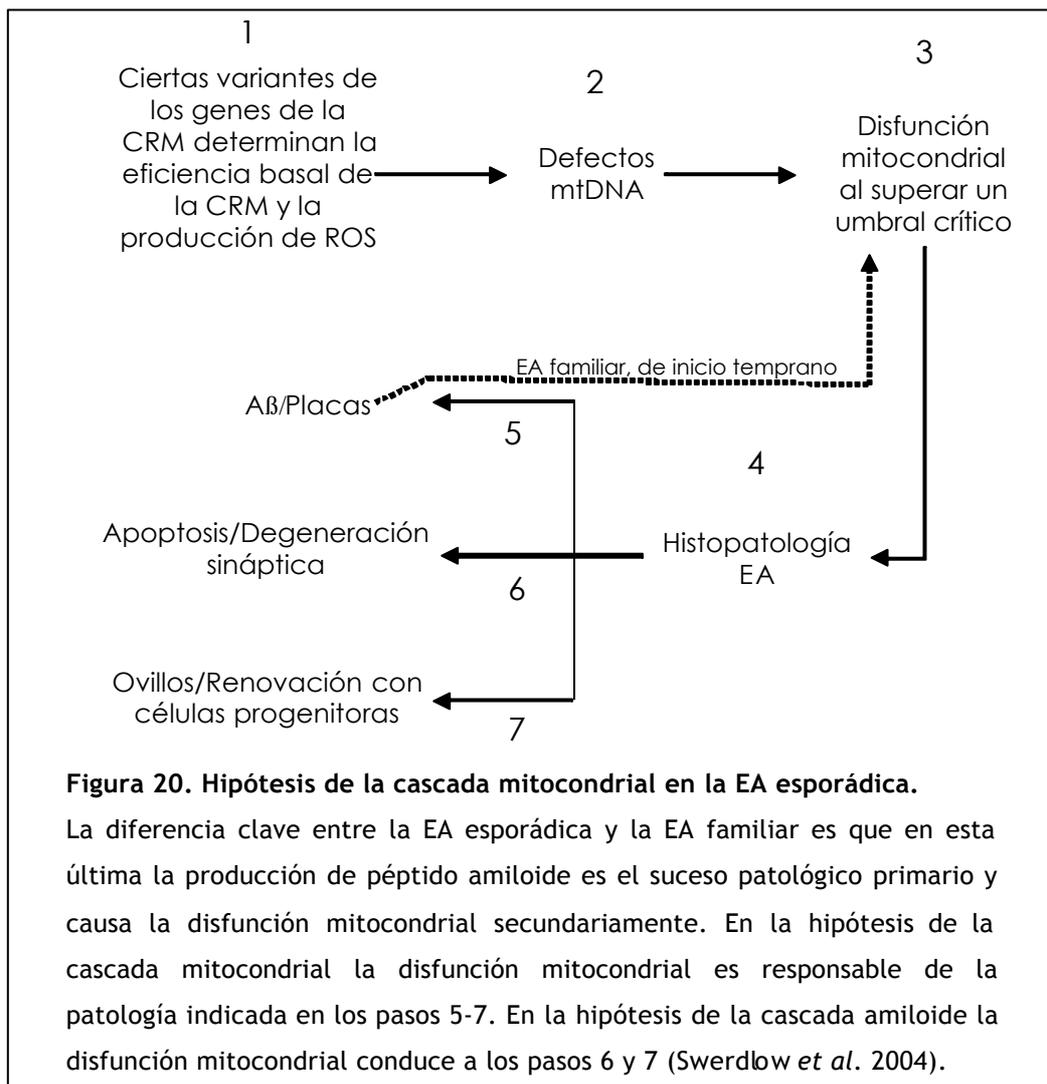
- 3) Mutaciones somáticas en el mtDNA reducen la eficiencia de la CRM, lo que produce disminución de la fosforilación oxidativa y/o mayor producción de ROS en la mitocondria.

Swerdlow *et al.* sostienen que la hipótesis de la cascada amiloide, en la que un exceso de producción de péptido amiloide causaría la enfermedad (Hardy 1997; Selkoe 1999), se aplicaría a la EA familiar mientras que la hipótesis de la cascada mitocondrial explicaría la aparición de la EA esporádica (Swerdlow *et al.* 2004). Según la hipótesis de la cascada mitocondrial la histopatología y patofisiología de la EA esporádica se inician a partir de la disfunción mitocondrial. La producción del péptido amiloide representa una respuesta adaptativa a la alteración mitocondrial en la EA esporádica, mientras que en la EA familiar la producción de péptido amiloide es estrictamente un fenómeno tóxico (Swerdlow *et al.* 2004). El suceso común que se produce en ambas formas de EA, esporádica y familiar, es el aumento en la producción y acumulación del péptido tóxico amiloide. Múltiples evidencias indican que, aunque en los casos de EA derivados de mutaciones en los genes *PPA*, *PSEN1* y *PSEN2* la hipótesis de la cascada amiloide es factible, ésta no puede aplicarse a la EA esporádica (Swerdlow *et al.* 2002). Los individuos con la forma más común de EA generalmente carecen de mutaciones en esos tres genes y, por tanto, estos no son los responsables de la formación de placas en los pacientes. Otra cuestión que pone en duda la hipótesis de la cascada amiloide en la EA esporádica es que las placas también se han descrito con relativa frecuencia en personas de edad avanzada que no tienen ningún tipo de demencia (Davis *et al.* 1999; 2001; Snowdon 2003). Por último, los mecanismos que asocian a las placas con la generación de ovillos y

discusión general

otras modificaciones patofisiológicas descritas en la EA no se conocen totalmente. Entre estas modificaciones se incluyen la apoptosis neuronal y la disfunción mitocondrial (Arendt 2000; Yang *et al.* 2001; Swerdlow *et al.* 2002).

Aunque la hipótesis de la cascada mitocondrial se ajusta mejor que la cascada amiloide a los sucesos que se observan en la EA esporádica, no se sustenta en evidencias consistentes. El abundante número de trabajos con resultados contradictorios que hay en la literatura hacen que esta hipótesis sea cuestionada. Un problema adicional para algunos de los defectos en el mtDNA o



en la función de la CRM observados en la EA esporádica es que también han sido descritos en el proceso del envejecimiento, lo que cuestiona su papel patogénico en la enfermedad. Existen numerosos trabajos a favor y en contra sobre la implicación de los diversos aspectos relacionados con la mitocondria en la EA esporádica. Estos trabajos contradictorios incluyen a los defectos genéticos del mtDNA (Cooper *et al.* 1992; Cortopassi *et al.* 1992; Corral-Debrinski *et al.* 1994; Lee *et al.* 1994) y a los defectos en la función de la cadena respiratoria (Parker *et al.* 1990; Parker 1991;

Kish *et al.* 1992; Van Zuylen *et al.* 1992; Reichmann *et al.* 1993; Mutisya *et al.* 1994; Parker *et al.* 1994b; Schagger *et al.* 1995; Curti *et al.* 1997; Molina *et al.* 1997; Ojaimi *et al.* 1999).

▪

Esta tesis recoge el trabajo realizado sobre un número limitado de muestras de necropsias cerebrales y de linfocitos de pacientes con EA esporádica. El número reducido de muestras obtenidas ha sido uno de los obstáculos para extraer conclusiones más precisas y también para desarrollar en profundidad algunos de los descubrimientos realizados en los pacientes analizados que apuntaban a alguna alteración mitocondrial. Es el caso de la presencia de la mutación A4336G (Rodríguez Santiago *et al.* 2001), la reducción en la cantidad de mtDNA hallado en el córtex frontal (Rodríguez-Santiago *et al.* 2001), o los cambios detectados en la expresión génica en hipocampo y cerebelo, regiones en que los genes mitocondriales estaban en algún caso 2,5 veces menos expresados que en controles (Rodríguez-Santiago *et al.* en prensa). No obstante, la importancia de las muestras de diferentes regiones de cerebro obtenidas de pacientes radica en que proceden de individuos en los que se ha confirmado la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares. Estas dos alteraciones constituyen los marcadores de la EA y, por tanto, los datos obtenidos tras el análisis de estas muestras son representativos de algunos aspectos asociados a la enfermedad. La extracción de sangre suele ser la forma más fácil para obtener mayor número de muestras de pacientes diagnosticados con EA. Aunque el tejido sanguíneo de un paciente no es el tejido diana de la enfermedad, en la EA se han descrito algunos defectos presentes en muestras procedentes de linfocitos, lo cual nos animó a analizar las muestras de sangre recogidas. El vínculo entre tejidos no diana y diana es complejo en lo que respecta a los posibles defectos que se detecten en uno de ellos; la falta de anomalías mitocondriales en linfocitos no implica que el cerebro tampoco tenga esas anomalías. De la misma manera, los defectos hallados en linfocitos deben ser evaluados con precaución a la hora de establecer conclusiones sobre su posible efecto en el cerebro. El hecho de que en las muestras de sangre analizadas por nuestro grupo no se hallaran alteraciones del mtDNA significativas es coherente con las características del tejido sanguíneo. En la sangre, a diferencia de los tejidos post-mitóticos como el cerebro, se produce una renovación celular mayor. Esto obstaculiza la acumulación de defectos genéticos que se ha propuesto que ocurre en los tejidos afectados por algunas enfermedades neurodegenerativas.

Los estudios realizados en primer lugar en nuestro laboratorio estaban dirigidos al análisis del genoma mitocondrial de pacientes con EA ya que muchos de los defectos observados en la función mitocondrial de pacientes con EA pueden explicarse mediante defectos del mtDNA. Estos defectos pueden provocar la producción de complejos de la CRM defectuosos, o en una cantidad reducida, lo cual puede afectar a la función normal de la CRM. El papel de los defectos del mtDNA como promotores del desajuste en la CRM es como mínimo controvertido en la etiología de la EA, a la vista de los resultados contradictorios existentes en la literatura y de los datos obtenidos en esta tesis. Una de las cuestiones pendientes en los estudios de mutaciones del mtDNA en pacientes con EA es si el incremento de defectos somáticos en el mtDNA de cerebro de pacientes observado por

discusión general

algunos autores no es más que un reflejo del proceso de envejecimiento o si es un suceso patogénico distinto. No se ha conseguido hasta el momento la identificación de mutaciones específicas en genes del mtDNA que sean responsables de los defectos observados en la EA o en el envejecimiento. Se ha descrito que con la edad aumenta la cantidad de moléculas de mtDNA con deleciones (Cooper *et al.* 1992; Cortopassi *et al.* 1992; Corral-Debrinski *et al.* 1994; Lee *et al.* 1994), pero la cantidad absoluta de cualquier mutación en particular es generalmente pequeña, por debajo del umbral del 50-60% que se cree necesario para causar una disfunción (Hayashi *et al.* 1991; Porteous *et al.* 1998). Se ha descrito una gran variedad de mutaciones puntuales cuya presencia aumenta con la edad (Zhang *et al.* 1998) y en la EA (Lin *et al.* 1992b; Shoffner *et al.* 1993; Davis *et al.* 1997; Egensperger *et al.* 1997; Hutchin *et al.* 1997). Estos resultados no han podido reproducirse en nuestro laboratorio (Rodríguez Santiago *et al.* 2001) ni en otros (Lin *et al.* 1992a; Petruzzella *et al.* 1992; Kosel *et al.* 1994; Wragg *et al.* 1995; Pallotti *et al.* 1996; Tysoe *et al.* 1996; Hirano *et al.* 1997; Wallace *et al.* 1997; Davis *et al.* 1998; Tanno *et al.* 1998; Zsurka *et al.* 1998; Chinnery *et al.* 2000) o bien se han descrito en estudios únicos no confirmados (Chang *et al.* 2000; Edland *et al.* 2002). Por este motivo, el concepto general que se mantiene actualmente es que es difícil que una mutación puntual que afecte a una región del mtDNA codificadora sea la responsable del deterioro mitocondrial en la EA. Actualmente, la única mutación puntual en las regiones codificadoras del mtDNA que tiene cierta consideración en el estudio de la EA es la mutación A4336G que afecta al gen del tRNA de la glutamina. Sin embargo, la presencia de esta variante se ha interpretado por algunos autores como un marcador del deterioro del mtDNA en algunos casos de EA esporádica, pero no jugaría un papel significativo en la mayoría de pacientes (Bonilla *et al.* 1999).

En el grupo de pacientes con EA esporádica analizados en esta tesis no se detectó la presencia significativa de mutaciones en las regiones analizadas, ni de reordenamientos, ni una cantidad alterada de mtDNA respecto a individuos control. La presencia de mutaciones en zonas del mtDNA no analizadas no se puede descartar ya que en los estudios realizados en esta tesis no se ha estudiado por completo las 16,5-kb del genoma mitocondrial. No obstante, el papel patogénico de esas mutaciones no detectadas, en caso de existir, es cuestionable puesto que si la consecuencia potencial de cualquier mutación en una región codificadora del mtDNA es causar la disfunción en la CRM, ésta no se observó en los pacientes estudiados. Si se cumpliera la hipótesis de la cascada mitocondrial señalada anteriormente, según la cual con la edad los pacientes con EA acumulan mutaciones en el mtDNA y estas pueden afectar a la función de la CRM, debería observarse algún defecto en la misma, independientemente de que se detectasen mutaciones puntuales. Probablemente una enfermedad tan compleja como la EA esporádica requiere de otros factores aparte del mtDNA para explicar el amplio espectro de sucesos patológicos descritos en los pacientes. El número de factores que deben participar en la etiología de la enfermedad debe ser mucho más amplio y las alteraciones del mtDNA por si solas no consiguen explicar la aparición de esta enfermedad neurodegenerativa. Esto tampoco implica que el papel de los defectos en el mtDNA sean insignificantes en la enfermedad a tenor de la bibliografía existente, por lo menos en algunos casos de EA esporádica la importancia de los defectos mitocondriales puede ser superior a

la de otros factores que participan en la enfermedad (Sheehan *et al.* 1997; Eckert *et al.* 2003; Swerdlow *et al.* 2004). Sin embargo el estudio del mtDNA debe considerarse conjuntamente con otros aspectos mitocondriales, como son la actividad de la CRM, la capacidad oxidativa o el grado de estrés oxidativo, los cuales pueden influir en otros procesos celulares que ya han sido citados a lo largo de esta tesis (apoptosis, estado energético celular, etc).

Algunos autores han considerado la posibilidad de que mutaciones puntuales que afectan a la CR del mtDNA –zona no codificadora de ningún gen, pero que contiene elementos reguladores– así como la “carga total” de mutaciones del mtDNA influyan en la EA esporádica. En esta dirección se deben interpretar los estudios encabezados por Coskun y por Lin (Lin *et al.* 2002; Coskun *et al.* 2004). La carga total de mutaciones representa la influencia de mutaciones que tomadas individualmente son raras, pero que en su conjunto puede alterar la función mitocondrial (Arnheim *et al.* 1992). La cantidad de mutaciones en el mtDNA, en concreto mutaciones puntuales, no se ha cuantificado sistemáticamente en el envejecimiento o en enfermedades neurodegenerativas hasta hace poco tiempo. Lin y colaboradores demostraron que la cantidad de mutaciones puntuales múltiples y distintas, individualmente raras, es mayor en el mtDNA de cerebro de pacientes con EA y de controles envejecidos que en controles jóvenes (Lin *et al.* 2002). Este aumento en la “carga mutacional” en individuos de edad avanzada (pacientes y controles) se correlacionó con un descenso en la actividad de la enzima COX respecto a individuos jóvenes. El interesante trabajo de Coskun y colaboradores revelaba que la frecuencia de mutaciones heteroplásmicas en la CR del mtDNA era mayor en el cerebro de pacientes con EA que en controles de edad similar (Coskun *et al.* 2004). Estas mutaciones afectaban a elementos clave de la regulación de la transcripción de la cadena ligera y de la replicación de la cadena pesada del mtDNA. Las mutaciones observadas producían una reducción en la cantidad de mRNA de ND6 codificado en la cadena ligera y en el número de copias de mtDNA en los cerebros de pacientes con EA. Para estos autores, el hecho de que las mutaciones T414G, T414C y T477C se detectaran sólo en el cerebro de pacientes con EA sugiere que la EA es un fenómeno patogénico distinto al envejecimiento. No obstante, las mutaciones en la CR descritas presentan algunas particularidades. La mutación T414G se encontró sólo en un pequeño porcentaje de moléculas de mtDNA en el trabajo realizado por Coskun y colaboradores. Hay que mencionar que esta mutación no fue detectada en otros estudios que utilizaban estrategias diferentes de PCR y secuenciación (Chinnery *et al.* 2001; Simon *et al.* 2001). Además, mientras que las mutaciones T414C y T477C se encontraban en una proporción mayor de moléculas de mtDNA en algunos cerebros de pacientes con EA, no todos los pacientes eran portadores de porcentajes elevados de esas mutaciones. Los autores sugieren que la mutación T414G puede ser un marcador valioso de la EA pero que es la “carga” total de mutaciones en la CR del mtDNA (lo que incluye a las mutaciones T414C y T477C) la que contribuye a la patogénesis cerebral (Coskun *et al.* 2004).

No obstante, los datos resultantes de estos estudios deben tomarse con precaución desde un punto de vista de la afectación de la actividad de la CRM. La correlación negativa de la actividad COX con el aumento de la “carga” de mutaciones encontrada por Lin y colaboradores es coherente

discusión general

con la disfunción mitocondrial causada por mutaciones mitocondriales. Se ha sugerido que mutaciones en el DNA nuclear pueden tener importancia en el descenso de la actividad de la CRM asociado a la edad (Isobe *et al.* 1998). Otros factores asociados a la edad, como el estrés oxidativo, pueden afectar a la “carga” de mutaciones y a la actividad de la COX mediante mecanismos diferentes, y esos factores pueden también explicar la relación que ambos tienen con el envejecimiento y, por lo tanto, entre ellos. Por otro lado, en la medida de lo posible se debe intentar correlacionar genotipo y fenotipo (correlación complicada en las enfermedades mitocondriales). Lin y colaboradores no encontraron diferencias en cuanto al número de mutaciones entre pacientes con EA y controles de edad similar. En un trabajo previo tampoco se demostró déficit funcional en los cíbridos de pacientes con EA al compararlos con cíbridos control (Ito *et al.* 1999). Sin embargo, esto está en contradicción con otros estudios en los que sí se hallaron diferencias funcionales en los cíbridos de EA (Miller *et al.* 1996; Swerdlow *et al.* 1997). Por otro lado hay que señalar que, aunque algunos estudios con cíbridos apoyan de forma sólida el papel del genoma mitocondrial en la patogénesis de la EA, este tipo de estudios presenta algunas limitaciones y problemas metodológicos. Por ejemplo, una de las limitaciones de estos estudios es que no se tiene en cuenta la interacción entre poblaciones enteras y subpoblaciones de células que definen el funcionamiento de un tejido vascularizado *in vivo* (Schon *et al.* 1998).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo no corroboran los hallazgos de Coskun *et al.* El análisis de la CR en nuestro laboratorio no mostró la presencia de ninguna variante en esa región al comparar la secuencia de las muestras de pacientes con la de controles y con la secuencia de Cambridge (Anderson *et al.* 1981). En las muestras analizadas se observa que el mtDNA no está significativamente alterado y que la cantidad de mtDNA y RNA mitocondriales tampoco lo están. Por tanto, la ausencia de mutaciones en la CR es coherente con los niveles de expresión y con la cantidad de mtDNA similares entre pacientes con EA y controles analizados por nuestro grupo. Esta correlación no invalida la descrita por los autores mencionados. Las mutaciones en la CR halladas por estos, debido a su efecto sobre los elementos reguladores de la replicación y transcripción del mtDNA, pueden explicar los defectos del mtDNA detectados como la reducción en el número de copias del mtDNA o las alteraciones en la expresión de determinados genes mitocondriales. Puede que el método usado en nuestro laboratorio para detectar mutaciones no fuera tan sensible como el usado por el grupo de Coskun (basado en las técnicas de PCR, purificación de fragmentos y clonaje de estos en plásmidos para proceder a secuenciación del DNA purificado a partir de los plásmidos) y que no se encontrara alguna mutación existente pero indetectable con los métodos usados. Sin embargo, tampoco se observaron niveles de reducción de mtDNA o de mRNA de ND6 del 50% como los descritos por estos autores. Asimismo, aunque hubiera mutaciones no detectadas en la CR de los individuos estudiados, éstas no producen ninguna diferencia significativa sobre las cantidades de mtDNA y de RNA de ND6 entre pacientes y controles. Además, el 28% de reducción de la cantidad de mtDNA en el córtex frontal de pacientes con EA o los cambios en los niveles de RNA mitocondriales detectados por nuestro grupo, no producen manifestaciones clínicas en el fenotipo. Por lo tanto, los

resultados similares entre pacientes y controles al cuantificar el mtDNA y los RNA mitocondriales, son coherentes con las actividades normales de la CRM observadas en las muestras analizadas.

La CRM presenta una complementación muy grande y se ha observado que las moléculas que tienen mutaciones múltiples y distintas se pueden compensar entre ellas evitando una posible disfunción (Cortopassi *et al.* 1995). En general, para que la función de la CRM se vea afectada, debe haber como mínimo un 60% de moléculas de mtDNA afectadas por una mutación dada, al menos en estudios *in vitro* (Hayashi *et al.* 1991; Schon *et al.* 1997). El trabajo de Coskun y colaboradores describe grados de heteroplasmia de alguna mutación (por ejemplo la T414G) por encima del 60% en algunos pacientes con EA analizados. Diversos autores sostienen que las mutaciones en el mtDNA aumentan con la edad (Michikawa *et al.* 1999; Lin *et al.* 2002) y ciertas variantes pueden afectar específicamente a la CR sólo en el cerebro de pacientes con EA (Coskun *et al.* 2004), pero su significado en la neurodegeneración es aún incierto. El efecto de esas mutaciones que afectan a elementos reguladores del mtDNA es que la replicación y la expresión del gen ND6 están reducidos por debajo del 50% respecto a individuos control. Estas disminuciones en la cantidad de copias de mtDNA y de mRNA de ND6 en pacientes con EA esporádica permiten intuir que la CRM puede estar afectada pero por el momento no se han publicado experimentos que confirmen esta sospecha. El estudio de las mutaciones en la CR del mtDNA, la cuantificación del mtDNA y RNA deben completarse con el análisis de la función de la CRM para confirmar su efecto patogénico.

Los cambios observados en los pacientes por nuestro grupo en la cantidad de mtDNA en córtex frontal o en la expresión de genes mitocondriales en hipocampo y cerebelo —y que estadísticamente no revelaban diferencias con los individuos control— no se pudieron correlacionar con un defecto en la actividad de la CRM ni con un aumento de la peroxidación lipídica en la misma región. La estimación de la peroxidación lipídica permite conseguir una idea aproximada del daño oxidativo que hay en las muestras estudiadas. Parece que la acumulación del estrés oxidativo que se ha descrito asociado con la edad no afecta específicamente a la peroxidación de los individuos con EA esporádica estudiados puesto que presentan resultados similares a los individuos control de edad. Existen otros trabajos que sostienen que el daño oxidativo no se acumula durante el envejecimiento en cantidades significativas y que tampoco juega un papel en la EA (Te Koppele *et al.* 1996). Esta ausencia de alteraciones oxidativas en los pacientes una vez más es coherente con la ausencia de lesiones en el mtDNA y con la cantidad de mtDNA y RNA mitocondriales no alterados. El incremento del estrés oxidativo que podría provocar la acumulación de mutaciones en el mtDNA no parece que sea diferente entre los pacientes y controles, hecho que concuerda con los estudios del mtDNA realizados. Estos resultados parecen indicar que las defensas antioxidantes de los pacientes estudiados consiguen equiparar el impacto del estrés en la mitocondria a niveles parecidos a los de individuos control de edad similar,

La reducción en la actividad del complejo IV es la alteración de la CRM descrita con mayor frecuencia en pacientes con EA (Parker *et al.* 1990; Kish *et al.* 1992; Mutisya *et al.* 1994; Parker *et al.* 1994b; Curti *et al.* 1997). La reducción en la actividad de la CRM también ha sido observada en los complejos I y II (Reichmann *et al.* 1993) y en el V (Schagger *et al.* 1995). La actividad normal de

la CRM descrita por nuestro grupo está en contradicción con estos trabajos previos que demuestran disminución en plaquetas, fibroblastos o en cerebro de pacientes. No obstante, para el complejo IV también hay trabajos que no han descrito alteraciones en su actividad (Van Zuylen *et al.* 1992; Reichmann *et al.* 1993; Schagger *et al.* 1995; Molina *et al.* 1997). Las discrepancias pueden ser resultado de la variabilidad en las técnicas usadas, el tipo de muestra analizada e, incluso, el período de tiempo entre la muerte y la congelación de las muestras para su posterior estudio. En el estudio realizado por nuestro grupo se demostró que los tejidos obtenidos en la autopsia eran adecuados para el estudio de la actividad de los complejos enzimáticos de la CRM ya que se habían congelado en un intervalo de tiempo entre 4 y 21 horas después de la muerte (Casademont *et al.*). Aunque los complejos mostraban una disminución en la actividad durante este período de tiempo, ésta no era estadísticamente significativa. El uso de material *postmortem* congelado para estudios enzimáticos —y también para estudios con mtDNA o RNA— es motivo de polémica y ha originado algún que otro debate. Quizá por eso hay pocos trabajos que usan esta aproximación para evaluar la función mitocondrial, aunque la alteración de ésta sea esencial para imputar un papel patogénico a defectos genéticos, estructurales o de otro tipo. Sin embargo, existen diversos trabajos que corroboran que el uso de material congelado para estudiar las actividades enzimáticas de complejos de la CRM, o para analizar el mtDNA o el RNA, es adecuado para este tipo de estudios, siempre que no se supere un período de tiempo de hasta 24 horas hasta la congelación (Johnson *et al.* 1986; Scheuerle *et al.* 1993; Inoue *et al.* 2002). La conservación del tejido cerebral para los estudios enzimáticos y genéticos también es aplicable para los estudios de la peroxidación lipídica. En estos, el intervalo de tiempo tampoco afectó significativamente al análisis realizado. Otro aspecto que debe considerarse en los estudios realizados es que los tejidos se debían homogeneizar para proseguir con las correspondientes técnicas de extracción de DNA, RNA o para realizar los análisis enzimáticos. Este procedimiento no tiene en cuenta el comportamiento diverso entre neuronas diferentes y puede impedir la detección de diferencias celulares individuales como se ha propuesto por algunos autores (Hirai *et al.* 2001). El estudio de neuronas individuales que logre determinar la relación entre las alteraciones de la CRM y los cambios genéticos, estructurales o de otro tipo, podría ser una buena aproximación para establecer si un defecto en una pequeña proporción de neuronas concretas tiene un papel de la patogénesis de la EA esporádica.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la actividad de las enzimas se mide en unas condiciones *in vitro* ideales que seguramente no reflejan perfectamente lo que sucede *in vivo*. La cuestión de la causalidad surge de nuevo en este momento: ¿Es la disminución del metabolismo cerebral una causa o una consecuencia de la disminución en la actividad cerebral de los pacientes con EA? La actividad de los complejos puede estar reducida por culpa de la disminución en la actividad global de las células neuronales debida a la vejez. En este caso, la actividad reducida probablemente no se detectaría mediante en análisis intrínseco de los complejos de la CRM. Asimismo, la capacidad oxidativa mitocondrial puede estar afectada por otros factores ajenos a la CRM, como por ejemplo las enzimas piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato o los transportadores ATP/ADP. Los estudios polarográficos de la capacidad oxidativa en mitocondrias intactas serían una herramienta ideal para

analizar cómo afectan esos otros factores. Este tipo de estudios no sólo reflejarían la actividad de los complejos, también servirían para estudiar la integridad de los diversos intermediarios que participan en los diferentes pasos a partir de la adición del sustrato correspondiente. De esta forma, se observaría cómo varía el consumo de oxígeno al añadir los diferentes sustratos, se tendría una idea de qué intermediario en concreto es el que puede estar alterado. Desgraciadamente, este tipo de estudios no se pueden realizar con material congelado, como es el caso de las muestras de cerebro obtenidas en esta tesis. El estudio polarográfico, y de las actividades enzimáticas, de la CRM sí que se pudo realizar en las muestras obtenidas de sangre. En estas muestras el resultado más llamativo fue el aumento en la actividad de la CRM en los pacientes que tomaban el fármaco rivastigmina. Este aumento, que constituye un efecto del fármaco distinto al esperado, puede interpretarse como beneficioso para el paciente al no sufrir la disfunción mitocondrial que podría perjudicar a la actividad de la célula. El estudio de este efecto inesperado requiere de análisis más amplios para identificar los mecanismos que llevan a este aumento y su relación con la posible mejora del paciente.

Las muestras de pacientes con EA esporádica analizadas, tanto las de tejido cerebral como las de linfocitos, no presentaban grandes alteraciones mitocondriales al compararlas con los individuos control. No había diferencias significativas ni en la secuencia de las regiones del mtDNA analizadas, ni en la presencia de reordenamientos, ni en la cantidad de mtDNA, ni en la cantidad de los diversos RNA estudiados, ni en las actividades de los complejos de la CRM ni en la peroxidación lipídica. Los datos obtenidos por nuestro grupo ponen en duda la cadena de sucesos negativos asociados a la disfunción mitocondrial observada por otros autores en la EA. Es plausible que en los pacientes estudiados la alteración mitocondrial no alcance niveles suficientes como para producir manifestaciones genotípicas o fenotípicas visibles. Los estudios realizados refuerzan la importancia de investigar no sólo la secuencia del mtDNA en busca de mutaciones (y cuantificarlas en caso de hallarlas), sino también la de medir la cantidad de mtDNA y de RNA mitocondriales y realizar las correlaciones correspondientes con el estudio de la CRM.

Los resultados obtenidos en esta tesis y la numerosa literatura contradictoria existente indican que muchas de las observaciones descritas sobre factores genéticos o sobre la actividad de la CRM en la EA esporádica coinciden con las observadas en el proceso normal del envejecimiento. Además de estos factores mitocondriales coincidentes en la EA y en la vejez, existen otras características similares descritas en ambas situaciones y que podrían explicar alguna de las coincidencias halladas. El declive cognitivo, la atrofia cerebral y el depósito de placas y ovillos pueden ocurrir en el envejecimiento en ausencia absoluta de demencia (Anderton 2002). La disminución global de la actividad celular asociada a la vejez puede explicar algunos de los cambios mitocondriales observados, muchos de los cuales son una respuesta compensatoria para mantener la función (Ojaimi *et al.* 1999; Ojaimi *et al.* 2001). Por ejemplo, se ha descrito que en el envejecimiento las células presentan una actividad metabólica menor, lo que puede explicar el declive general en las actividades de la CRM para producir sólo la energía necesaria (Barrientos *et al.* 1997). Por tanto, en la EA esporádica es razonable colocar algunos de los sucesos moleculares observados dentro de un

espectro global de envejecimiento, antes que considerarlos como fenómenos distintos. Estas consideraciones explicarían porqué algunos individuos inician el desarrollo de la EA a una edad relativamente joven, otros a una edad intermedia, y otros sólo a una edad muy avanzada. Los sucesos observados en la mitocondria que afecten exclusivamente a pacientes con EA pueden contribuir a definir el papel del proceso de envejecimiento en la enfermedad.

Si la EA esporádica comparte muchos aspectos similares al proceso normal de envejecimiento, ¿puede suponerse simplemente que en ambas situaciones se cumple la teoría del envejecimiento mitocondrial o de los radicales libres? Esta teoría surgió a raíz de resultados que indicaban: 1) un descenso de la actividad de la CRM con el avance de la edad (Cooper *et al.* 1992; Ojaimi *et al.* 1999); 2) un aumento del estrés oxidativo mitocondrial con la edad (Harman 1972; Miquel *et al.* 1980; Beckman *et al.* 1998; Melov 2000; Lenaz *et al.* 2002). Esta teoría presenta algunos aspectos polémicos por diversos motivos, uno de los principales es el origen del declive mitocondrial dependiente de la edad. Algunos investigadores lo atribuyen a la acumulación de defectos en el mtDNA en forma de mutaciones puntuales o deleciones debido al aumento del estrés oxidativo con la edad y la aparición de un círculo vicioso al originarse polipéptidos de la CRM defectuosos que a su vez originan más moléculas ROS que dañarían de nuevo al mtDNA, resultando en una acumulación exponencial de mutaciones que prolongarían el círculo vicioso (Wallace 1992; Michikawa *et al.* 1999; Lin *et al.* 2002). La teoría del círculo vicioso ha sido objeto de debate en la literatura (Jacobs 2003a, b; Pak *et al.* 2003). Los detractores de esta idea han señalado que la cantidad de mutaciones en el mtDNA es pequeña y cuestionan su efecto fenotípico (Brierley *et al.* 1997). Se ha descrito que la acumulación de mutaciones en el mtDNA durante el envejecimiento es lineal y no exponencial (Jacobs 2004, comunicación personal). Por lo tanto, el daño oxidativo sobre el mtDNA sería mucho menor de lo propuesto en la literatura, y se podrían producir polipéptidos de la CRM de forma normal, por lo que el círculo vicioso quedaría interrumpido (Jacobs 2003a). Estos trabajos concuerdan con un trabajo previo de nuestro grupo en el que no se observó un descenso en la actividad de la CRM asociado a la edad en tejido extraído de músculo esquelético (Barrientos *et al.* 1996). Para algunos autores el envejecimiento mitocondrial, en lugar de ser causado por el círculo vicioso –acumulación de defectos en el mtDNA como consecuencia de la acumulación del estrés oxidativo–, se debe más bien al llamado “daño mitocondrial intrínseco”. Este proceso parece que se da en un modelo de ratón de envejecimiento prematuro (Trifunovic *et al.* 2004). Este daño intrínseco se basa en el déficit energético causado por una CRM anormal y por el daño oxidativo de las moléculas ROS sobre otros componentes celulares. Este déficit energético y el daño oxidativo pueden conducir a la disfunción del tejido, la apoptosis, la senescencia replicativa y el bloqueo de la diferenciación celular. Además, el efecto del daño intrínseco y que implica a otros mecanismos (disfunción tejido, apoptosis...) puede estar modulado por otros factores que intervienen en el envejecimiento. Entre estos factores se encuentran la acetilación de proteínas, el daño al DNA nuclear, la desorganización nuclear, el estrés metabólico, el acortamiento de telómeros y defectos en las vías de señalización mediante insulina. La interrelación tan compleja entre estos factores puede dar lugar a cambios en el envejecimiento que pueden conducir a la aparición de una

enfermedad neurodegenerativa como la EA esporádica, en la que no hay que olvidar que el mayor factor de riesgo es la edad.

▪

Las características particulares de la genética mitocondrial suponen un grado adicional de complejidad al ya de por sí difícil estudio de las enfermedades neurodegenerativas. El hecho de descubrir alteraciones mitocondriales (histológicas, bioquímicas o genéticas) en pacientes con una determinada enfermedad, no significa que inmediatamente se halle la secuencia de sucesos implicados en la patogénesis de la misma.

Los complejos multiméricos de la CRM contienen proteínas que proceden de dos genomas, el nuclear y el mitocondrial. Los genes codificadores de subunidades de la CRM presentan una variabilidad polimórfica substancial en el nDNA y en el mtDNA (Kogelnik *et al.* 1998; Wheeler *et al.* 2002). Estos polimorfismos pueden ocasionar el cambio de algún aminoácido de la proteína codificada. Entre individuos diferentes puede haber variación estructural de la CRM ya que hay muchos genes polimórficos que codifican los péptidos integrantes de la misma. Algunos datos indican que esta variabilidad puede influir en el conjunto de sucesos ontológicos como el desarrollo, el envejecimiento, o la neurodegeneración (Tanaka *et al.* 1998; De Benedictis *et al.* 1999; Roubertoux *et al.* 2003; van der Walt *et al.* 2004). Los modelos actuales que subrayan la contribución de la mitocondria en la embriogénesis, el envejecimiento y en la apoptosis, destacan a la producción de ROS y de ATP como un paso intermedio crucial en cada caso. Aunque tradicionalmente se ha considerado que las moléculas ROS son perjudiciales, también hay cierto consenso en que estas moléculas son necesarias para la regulación de mecanismos de señalización intracelulares (Wolin 1996; Droge 2002). La eficiencia de la CRM determina el nivel de producción basal de ROS y de ATP de un individuo. La eficiencia de la CRM, a su vez, puede verse influida por la gran cantidad de combinaciones polimórficas causadas por los más de 80 genes que codifican las diferentes subunidades proteicas del nDNA y del mtDNA. La producción basal de ROS y de ATP determina el umbral energético y oxidativo a partir de cual la función de la CRM está comprometida en cada tejido de un individuo.

Además la mitocondria puede verse afectada por la acción de sustancias extrañas o no al metabolismo del individuo, como por ejemplo el alcohol, el tabaco o algún medicamento. También existen biomoléculas que pueden incidir en el funcionamiento mitocondrial. En el bucle D se han identificado zonas que responden a vitamina D, hormona tiroide, ácido retinoico y glucocorticoides (Berdanier *et al.* 2001). La hormona tiroide no regula solamente genes nucleares, también puede regular genes mitocondriales ya que se ha demostrado que produce el aumento de la transcripción de mRNA mitocondriales (Enriquez *et al.* 1999). En cualquier caso, se sabe aún muy poco sobre los efectos que ocasionan estas moléculas en la función de la mitocondria. Incluso el efecto sobre la CRM de la rivastigmina descrito por nuestro grupo es un descubrimiento relativamente enigmático, no se conoce mediante qué mecanismo se produce este efecto y de qué manera puede ser beneficioso para el paciente.

discusión general

Como ocurre en otras enfermedades relacionadas con la edad (diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, entre otras) existen factores de conducta, dietéticos y ambientales que afectan al riesgo de desarrollar la enfermedad. Sin embargo la investigación sobre estos factores no ha aportado resultados suficientemente sólidos para efectuar recomendaciones generales. Los descubrimientos epidemiológicos sugieren que un nivel educativo bajo, un historial de trauma craneal, un consumo calórico elevado, una dieta con muchos ácidos grasos y un estilo de vida sedentario pueden incrementar el riesgo de padecer la EA (Mattson 2003; Mayeux 2003). Los individuos con una dieta con ingesta disminuida de folato tienen mayor riesgo de padecer la EA como consecuencia aparente del aumento en las cantidades de homocisteína. Se ha descrito en roedores que el mantenimiento de un ambiente que estimula la cognición o una dieta restrictiva hace que las neuronas del hipocampo sean más resistentes a la muerte y que la neurogénesis (la producción de nuevas neuronas a partir de células madre) aumente (Young *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002; Mattson 2003). De una forma parecida, el ejercicio físico regular realza la plasticidad sináptica del hipocampo y la neurogénesis, ambos constituyen fenómenos neuroprotectores (Cotman *et al.* 2002). Otros factores dietéticos implicados en el riesgo para la EA son los lípidos y metales como el hierro o el cobre (Bush *et al.* 2003; Mayeux 2003). No obstante, a pesar de la cantidad de datos que sugieren que hay factores dietéticos que influyen en el riesgo de padecer la EA, no se ha podido establecer una relación causal entre la ingesta calórica, o cualquier componente específico de la dieta, y la EA.

▪

El estudio de una enfermedad tan compleja como la EA esporádica debe incluir diferentes aproximaciones complementarias que abarquen los múltiples y variados sucesos patogénicos descritos en los pacientes. Dentro de estas aproximaciones, la implicación de la mitocondria es uno más de los campos de debate. En concreto, la implicación de los defectos del genoma mitocondrial y sus consecuencias sobre la actividad de la CRM requiere más estudios para confirmar su papel en el desarrollo de la EA esporádica. La EA es una enfermedad lenta pero progresiva que probablemente no es el resultado de un único hecho, sino que más bien es el resultado de un proceso que tiene varias etapas en las que hay implicados sucesos ambientales, epigenéticos y genéticos. La variedad y cantidad de estos sucesos posibilita que la próxima generación de tratamientos se centre en terapias combinadas y selectivas para algunos de los fenómenos decisivos que caracterizan a la enfermedad. El desarrollo de los futuros tratamientos se encamina a solucionar diferentes aspectos de la enfermedad: la reducción de los agregados proteicos, del estrés oxidativo, del daño mitocondrial, de la respuesta inflamatoria y de la acumulación de metales pesados en el cerebro. Los tratamientos que permitan reestablecer la neurotransmisión y que bloqueen la excitotoxicidad pueden producir efectos beneficiosos en los pacientes con EA. En este sentido, el desarrollo de fármacos con esas características puede contribuir a remediar alguna de las devastadoras consecuencias que esta enfermedad causa en los pacientes y ayudar a su vez a paliar las graves consecuencias psicológicas y sociales que sufren los familiares que están al cuidado de los enfermos.