

¿QUE NOS ENSEÑAN LOS MODELOS ANIMALES Y CELULARES SOBRE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON?

ILTMO. SR. D. JOSÉ LÓPEZ BARNEO*

**Discurso de ingreso como Académico Correspondiente de la
Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental**

PREÁMBULO

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Excmas. e Ilmas. autoridades, Ilmos Srs. Académicos, Sras y Sres, amigos y compañeros,

Mis primeras palabras en este acto de recepción como Académico Correspondiente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental han de ser de agradecimiento por la amable invitación que he recibido de su Presidente, D. Antonio Marín Garrido, para incorporarme a esta prestigiosa Corporación. Me siento muy honrado por ello. A la alegría por la distinción que se me otorga se suma la satisfacción porque este acto se celebre en Jaén y me brinde una oportunidad para pasar unas horas con personas y amigos a los que me siento tan unido. Siempre que puedo presumo de toxiriano y giennense, y por ello los reconocimientos a mi labor académica que provienen de esta tierra tienen un significado muy especial. Agradezco al Sr. D. Manuel Vaquero Urbano, Académico de Número de esta Casa, su generosa aceptación para hacer el Discurso de Contestación.

Mi Discurso, que he titulado “¿Qué nos enseñan los modelos animales y celulares sobre la enfermedad de Parkinson?”, trata sobre las patologías neurodegenerativas y

*Instituto de Biomedicina de Sevilla. Hospital Universitario Virgen del Rocío-CSIC.
Universidad de Sevilla. Email: *lbarneo@us.es*

en particular sobre el cuadro clínico que como “Parálisis agitante” fue descrito para la literatura científica por James Parkinson en el año 1817. La investigación sobre esta enfermedad es uno de los campos de vanguardia en la biomedicina mundial, y representa un ejemplo paradigmático de investigación multidisciplinar donde el trabajo básico en modelos animales y celulares complementa de forma óptima la investigación clínica y la labor asistencial. Este tipo de investigación médica, centrada en el estudio de los procesos fundamentales con relevancia en la patogenia, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, es la que considero más prioritaria y a ella se ha dedicado mi grupo de investigación durante los últimos 30 años.

Siempre he defendido el valor insustituible de la investigación básica, usando modelos reduccionistas y enfocada hacia la comprensión de los mecanismos biológicos fundamentales. No obstante me parece necesario que ligados a esta investigación, y no independientes, se desarrollen programas de “investigación biomédica traslacional”, tan de moda en los últimos años. Estos programas deben favorecer que la ingente cantidad de conocimiento disponible relativo a la biología de las enfermedades, se transfiera lo más rápidamente posible a la clínica humana. Esta forma de pensar es consecuencia de dos rasgos fundamentales de mi formación intelectual. La vocación médica que he tenido desde que era niño y la atracción cuando fui un joven estudiante de medicina por la investigación basada en los principios físico-químicos y biológicos fundamentales. Hamilton Smith, científico galardonado con el premio Nobel de Medicina, defendía recientemente en Sevilla el necesario esfuerzo que España y todos los países occidentales tienen que hacer para mantener el liderazgo científico en el mundo y enfatizaba textualmente: “la ciencia, la ciencia, y la ciencia es lo que ha hecho posible el incremento de la duración y calidad de la vida que disfrutamos actualmente en los países desarrollados”.

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS; RETO BIOMÉDICO DEL SIGLO XXI

Las enfermedades neurodegenerativas, que afectan a casi un millón de españoles, se producen por la muerte progresiva de neuronas en diferentes áreas del sistema nervioso sin razón inmediata aparente de tipo traumático, isquémico o tóxico. La mayoría de estas enfermedades tienen un curso crónico y progresivo. Son, por tanto, muy invalidantes y constituyen la mayor causa de dependencia en los países desarrollados. Las patologías neurodegenerativas tienen un alto coste personal (para enfermos y familiares) social y sanitario; por lo que el avance en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las mismas es uno de los retos más importantes que tiene la investigación y práctica médica del siglo XXI. Las enfermedades de Alzheimer y

Parkinson representan conjuntamente más del 90% de las afecciones neurodegenerativas. No obstante, existen otras, como la esclerosis lateral amiotrófica, las ataxias o la enfermedad de Huntington que por sus efectos devastadores sobre la salud tienen un impacto médico muy alto.

La etiopatogenia de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se desconoce y las terapias disponibles son muy poco eficaces. Casi todos los casos aparecen de forma esporádica y sólo en menos del 10% de los pacientes la enfermedad es de tipo familiar. Las patologías neurodegenerativas esporádicas parecen tener un origen multifactorial, aunque el envejecimiento es posiblemente el factor de riesgo más importante. El efecto del envejecimiento es observable incluso en enfermedades, como la corea de Huntington, que tienen un origen genético mendeliano dominante pero que solo se manifiestan a partir de la edad media de la vida. El impacto del envejecimiento sobre la neurodegeneración tiene implicaciones sanitarias importantes debido al incremento en la esperanza de vida de la población en los países desarrollados. Durante las próximas décadas se prevé que la duración media de vida en Europa se acerque a los 90 e incluso a los 100 años lo que, si no se pone remedio, traerá consigo un aumento importante en la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas.

ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson, que afecta a unas 200.000 personas en España, se produce por la muerte progresiva de neuronas en diferentes partes del sistema nervioso central y periférico-particularmente en el mesencéfalo ventral, locus coeruleus, núcleo dorsal del vago, y ganglios periféricos cardíacos y mesentéricos, entre otras localizaciones-. Los síntomas más característicos de la enfermedad son de tipo motor (temblor, rigidez, lentitud de movimientos y alteración de la marcha) y se deben fundamentalmente a la desaparición de neuronas dopaminérgicas localizadas en la *pars compacta* de la sustancia negra. Estas neuronas emiten axones que terminan en el estriado (núcleos putamen y caudado en el hombre) dando lugar a la vía nigroestriatal. La destrucción de la vía nigroestriatal resulta en disminución de los niveles de dopamina en el estriado, lo que altera los circuitos de los ganglios basales, el tálamo y la corteza cerebral implicados en el control motor.

Las causas de la muerte celular en la enfermedad de Parkinson se desconocen y el tratamiento actual se basa en la administración de fármacos "pro-dopaminérgicos", como la L-DOPA, precursor de la dopamina que incrementa la síntesis de este transmi-

sor en las neuronas dopaminérgicas todavía no afectadas por el proceso degenerativo. Otros fármacos usados normalmente son los inhibidores de las enzimas que oxidan la dopamina (monoamino oxidasa y catecol-oximetil-transferasa) o los agonistas de los receptores dopaminérgicos. La medicación pro-dopaminérgica, muy útil en los primeros estadios de la enfermedad, pierde eficacia con el tiempo y puede dar lugar a movimientos anormales muy invalidantes que se denominan disquinesias. Por ello, desde hace años se exploran estrategias terapéuticas alternativas que ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La investigación actual en la enfermedad de Parkinson está orientada en dos direcciones fundamentales. Por una parte se estudian los mecanismos etiopatogénicos responsables de la muerte neuronal, con especial énfasis en las propiedades de las neuronas de la sustancia negra en el hombre y otros mamíferos que las hace especialmente vulnerable a la degeneración. El objetivo final de estos trabajos es identificar nuevas dianas terapéuticas que puedan ser moduladas por fármacos utilizables en la clínica humana. En paralelo con estos estudios, se investigan nuevas terapias, denominadas avanzadas (como los trasplantes celulares y la terapia génica) que persiguen frenar, o incluso revertir, la progresión de la enfermedad.

En relación con la investigación sobre las causas y mecanismos de la enfermedad, todavía no se dispone de un esquema completo de los procesos celulares alterados en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, en los últimos años se han producido avances importantes. Uno de ellos ha sido el descubrimiento de más de una docena de genes (denominados Park1, Park2, Park3, etc) que producen parkinsonismo genético en el hombre heredado de forma mendeliana (como carácter dominante o recesivo). Aunque éstos representan aproximadamente menos del 15% de los casos, la identificación de genes cuya alteración produce parkinsonismo humano ha abierto vías de investigación de gran ayuda en la comprensión de las alteraciones que producen los casos esporádicos de la enfermedad. Entre las variantes genéticas más frecuentes y mejor estudiadas están las mutaciones de la α -sinucleína (genes Park 1 y Park 4), proteína con función no bien conocida que se asocia a las vesículas sinápticas y que aparece depositada en las inclusiones neuronales denominadas cuerpos de Lewy. Numerosos casos de parkinsonismo genético se deben a mutaciones en la Parkina (gen Park 2), una ubiquitin ligasa necesaria para la degradación de las proteínas en el proteosoma. Otros genes codifican quinasas de función todavía no del todo conocida como la PINK1 (gen Park 6) y la LRRK2 (gen Park 8). El gen Park 7 codifica una proteasa (DJ1) que protege del estrés oxidativo. Las mutaciones más frecuentes son las de LRRK2 (Park 8) causantes de aproximadamente el 10% de los casos de Parkinson genético. Esta proteína también se denomina "Dardarina" (vocablo que se asocia a

“temblor” en lengua vasca) pues en ese territorio se describieron algunas de las primeras familias afectadas por mutaciones del gen. Además de los genes con herencia mendeliana, varios estudios del genoma (los llamados “genome wide association studies” o GWAS) han dado lugar a la identificación de numerosos polimorfismos genéticos que podrían ser causa predisponente para sufrir la enfermedad.

Actualmente la mayoría de los investigadores admiten que la enfermedad de Parkinson es de causa multifactorial y que los diferentes eventos inductores de la misma se relacionan bien con alteraciones en el plegamiento o destrucción de las proteínas o con la generación de especies reactivas de oxígeno de origen mitocondrial. Como otras enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Parkinson cursa generalmente con depósitos proteicos (formados por α -sinucleína y otras proteínas) que constituyen los cuerpos de Lewy mencionados anteriormente. Aunque la mayoría de los autores aceptan que las alteraciones en el metabolismo de algunas proteínas (en el plegamiento, las modificaciones post-transcripcionales o la degradación) están muy directamente implicadas en la neurodegeneración, existe un debate abierto sobre el efecto patogénico de los depósitos proteicos. Ello se debe, entre otras causas, a que en algunos casos, como por ejemplo en los enfermos de Parkinson con mutaciones en el gen Parkina (Park 2), la enfermedad aunque con los rasgos clínicos habituales no cursa con la presencia de cuerpos de Lewy.

Desde hace varias décadas existen numerosas observaciones que atribuyen a la mitocondria y a la disregulación del equilibrio redox en las neuronas un papel importante en la patogenia de la enfermedad Parkinson. En varios estudios *post mortem* se ha descrito disminución de la actividad del complejo I mitocondrial y signos de oxidación de lípidos y proteínas en el tejido cerebral. Además del defecto bioenergético la inhibición mitocondrial resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden ser nocivas para los constituyentes celulares, lo que apoya las ideas antes indicadas. Aunque los antioxidantes no han mostrado hasta ahora ningún efecto terapéutico, si está bien demostrado que los tóxicos que producen inhibición mitocondrial, como la rotenona o el 1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina (MPTP) dan lugar a parkinsonismo en animales y el hombre. De hecho la acción nociva del MPTP (contaminante de ciertos estupefacientes de síntesis) se detectó en personas que tras su ingesta mostraron signos típicos de parkinsonismo que mejoraba con la aplicación de L-DOPA. El efecto selectivo del MPTP sobre las neuronas de la sustancia negra se debe a que una vez que llega al cerebro se metaboliza al ión MPP⁺. Esta sustancia es reconocida por el transportador de dopamina y transportada al interior de las neuronas dopaminérgicas, donde inhibe el complejo I mitocondrial.

Dentro del campo de las terapias avanzadas aplicadas a la enfermedad de Parkinson, una estrategia muy atractiva es el trasplante intraestriatal de células que liberen dopamina con el objetivo de reemplazar funcionalmente los terminales dopaminérgicos de las neuronas destruidas. Durante las últimas tres décadas se han realizado numerosos ensayos preclínicos (en animales) y clínicos (en pacientes) utilizando diversos tipos celulares, siendo las neuronas dopaminérgicas procedentes de fetos las que han proporcionado mejores resultados. No obstante, este procedimiento (que se ha ensayado en varios centenares de pacientes) ha sido abandonado debido a que dos estudios cegados no han demostrado eficacia clínica con respecto a los controles placebo. Varios grupos de investigación, entre ellos el nuestro, trabaja en la puesta a punto de tipos celulares alternativos a las células fetales que puedan ser utilizados para el tratamiento de pacientes.

Junto a los trasplantes celulares, otra terapia avanzada aplicada a la enfermedad de Parkinson ha sido la administración de factores neurotróficos en el estriado, donde terminan las fibras dopaminérgicas. El factor neurotrófico más usado es el GDNF, proteína que en estudios *in vitro* muestra un efecto estimulante muy poderoso sobre las neuronas de la sustancia negra de diferentes mamíferos. La administración intracerebral de GDNF mediante un cánula implantada permanentemente en el estriado tuvo efectos positivos en dos grupos de pacientes. No obstante, un ensayo clínico cegado hecho posteriormente no ha confirmado la mejoría clínica a los 6 meses. Como ocurre con la terapia celular, la infusión intraestriatal de factores neurotróficos está actualmente bajo reconsideración, con la esperanza de que nuevos desarrollos tecnológicos en la preparación del GDNF o en la metodología usada en su administración intracerebral mejoren la acción terapéutica.

Permítanme hacer un paréntesis en esta revisión sobre el estado actual de la investigación sobre la enfermedad de Parkinson para recordar cómo mi grupo se incorporó a este esfuerzo colectivo hace solo unos años (a partir de 1998) debido a causas imprevistas. Lo ocurrido es un ejemplo ilustrativo de la influencia del azar en los caminos de la Ciencia y cómo en el quehacer científico el investigador se encuentra a veces, casi sin proponérselo, con un problema, al que acaba dedicándole gran parte de su esfuerzo personal. En nuestro caso el hecho inesperado fue el contacto fortuito con neurocirujanos que habían realizado extirpaciones bilaterales del cuerpo carotídeo para tratar, sin mucho éxito, el asma bronquial. El cuerpo carotídeo es un quimiorreceptor arterial, localizado bilateralmente en la bifurcación carotídea, sobre el que mi grupo de investigación ha trabajado durante varias décadas, esclareciendo los mecanismos responsables de la detección de los niveles de oxígeno y glucosa

en sangre arterial. Entre otras propiedades muy peculiares, las células del cuerpo carotídeo llaman la atención porque contienen grandes cantidades de dopamina y del factor neurotrófico GDNF. Una de los neurocirujanos interesados por nuestro trabajo sobre el cuerpo carotídeo fue el Dr. Juan Negrín, hijo del conocido político (y fisiólogo) español, quien ejerció brillantemente la profesión en Nueva York y falleció en Niza en el año 2002. Juan Negrín, con quien no había tenido contacto previo, vino a visitarme en el año 1997. Durante nuestra entrevista discutimos sobre la posibilidad de que el trasplante del cuerpo carotídeo pudiese tener aplicabilidad terapéutica en enfermos de Parkinson, quienes sufren precisamente un déficit de dopamina en el cerebro. Para responder esta cuestión, a las pocas semanas iniciamos un proyecto de investigación que perdura hasta la actualidad.

MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Uno de los retos fundamentales de la investigación biomédica es la generación de modelos animales de enfermedades. En el caso de la enfermedad de Parkinson estos modelos, aunque todavía no del todo satisfactorios, han servido de base para la consecución de importantes avances farmacológicos y la experimentación de terapias avanzadas potencialmente transferibles al hombre. Los modelos de enfermedad de Parkinson más utilizados en la actualidad puede dividirse en dos grandes grupos: En primer lugar, los generados por la administración de fármacos o sustancias tóxicas, y en segundo lugar los producidos por modificaciones genéticas.

Modelos neurotóxicos

Casi todos los modelos neurotóxicos se obtienen mediante el uso de sustancias oxidantes que producen destrucción de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Uno de los modelos más utilizados es el de rata hemiparkinsoniana tratada con 6-hidroxidopamina. Estos animales se generan tras la inyección de 6-hidroxidopamina a través de una cánula implantada en la sustancia negra. El fármaco se convierte en dopamina y agua oxigenada, un potente oxidante que daña las neuronas dopaminérgicas. La destrucción unilateral de la vía nigroestriatal produce un síndrome rotacional hacia el lado de la lesión que se puede monitorizar de forma fácil con un rotámetro. Uno de los mayores inconvenientes del modelo de rata tratada con 6-hidroxidopamina es que produce una lesión aguda y, por lo tanto, no representa fielmente el proceso lento de la neurodegeneración parkinsoniana. Además, es difícil de manipular, sobre todo

para conseguir lesiones parciales necesarias en la investigación del efecto de factores neuroprotectores sobre la progresión del síndrome parkinsoniano.

Como indiqué anteriormente, el MPTP es una molécula de síntesis cuya administración sistémica produce un síndrome parkinsoniano debido a que en el cerebro de los primates y ratones (pero no de ratas) se convierte en MPP⁺ que se transporta al interior de las neuronas dopaminérgicas e inhibe el complejo I mitocondrial. Las personas intoxicadas con MPTP y los monos tratados con este agente de forma crónica mediante inyecciones repetidas durante varias semanas, desarrollan un síndrome parkinsoniano progresivo y bilateral muy parecido a las formas típicas de la enfermedad de Parkinson. Aunque el modelo de mono MPTP es muy apropiado para la investigación en nuevas terapias farmacológicas o celulares su uso está limitado por su elevado coste. Muchos grupos utilizan como modelo más asequible el ratón MPTP, tratado con esta sustancia durante 1-7 días. Este modelo agudo/subagudo, aunque usado muy frecuentemente, tampoco refleja correctamente el proceso crónico y progresivo característico de la enfermedad humana. Para vencer estas limitaciones nuestro grupo ha puesto a punto recientemente un nuevo modelo de ratón tratado de forma crónica (durante tres meses) con MPTP. Estos animales generan un síndrome histológico, neuroquímico y comportamental muy reproducible que evoluciona de forma lenta y que mejora con algunas terapias experimentales.

Además de los ya indicados, existen en la literatura científica otros modelos animales de enfermedad de Parkinson generados por la administración de agentes tóxicos como la rotenona o los inhibidores de la función del proteosoma. Estos modelos son poco reproducibles y han caído prácticamente en desuso.

Los modelos de parkinsonismo tóxico producen una agresión directa a las células dopaminérgicas y por ello la relevancia de la información que aportan en el estudio de los mecanismos de la muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson es de valor limitado. No obstante, son muy útiles cuando el objetivo de la investigación es identificar los factores de los que depende la especial sensibilidad de las neuronas mesencefálicas al estrés oxidativo. Los modelos de mono o de ratón tratados crónicamente con MPTP son también particularmente robustos y apropiados para la investigación de nuevas terapias basada en la administración intracerebral de células, moléculas o vectores virales ya que al estar lesionados bilateralmente se puede tratar un solo lado del cerebro dejando el otro lado como control experimental.

Desde hace años nuestro grupo ha utilizado los modelos de parkinsonismo tóxico en la investigación sobre la terapia antiparkinsoniana basada en el trasplante intraes-trial de cuerpo carotídeo. Los resultados obtenidos con implantes de cuerpo carotídeo

en ratas, ratones y primates parkinsonianos han sido satisfactorios. En pacientes el efecto terapéutico, aunque notable, es menor debido, entre otros factores, al pequeño tamaño del cuerpo carotídeo. Actualmente estamos desarrollando un proyecto tecnológico cuyo objetivo es la expansión *in vitro* del cuerpo carotídeo con el objetivo de incrementar la cantidad de tejido disponible para el trasplante.

Modelos genéticos

Como comenté anteriormente, existen formas familiares de parkinsonismo en el hombre que se deben a mutaciones de genes específicos. El descubrimiento de estos genes hizo pensar que su mutación en ratones, la especie de mamífero donde se puede producir alteraciones genéticas de forma controlada experimentalmente, daría lugar a modelos animales de la enfermedad. Sorprendentemente, cuando los genes parkinsonianos se mutan en ratones no se reproduce los signos de muerte neuronal característicos del Parkinson humano. Por ejemplo, las mutaciones en Park1 y Park4 que producen alteraciones en la proteína α -sinucleína o en Park2 con alteraciones en la enzima parkina, no convierten a los animales en parkinsonianos. Los ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína LRRK2 mutada muestran alteraciones progresivas en el comportamiento motor similares a la de los enfermos parkinsonianos. No obstante estos animales tienen solo ligeras alteraciones anatómicas de la vía nigroestriatal, con disminución pequeña del volumen neuronal y del número de neuritas así como daños en los axones dopaminérgicos del estriado. El número de neuronas se mantiene normal. Curiosamente las mutaciones de la proteína DJ1 (gen Park 7 humano) no producen lesiones de la vía nigroestriatal en ratones, excepto cuando se usan individuos de la cepa C57. En este caso la mutación induce un parkinsonismo temprano y progresivo, con muerte de neuronas en la sustancia negra.

Lo estudios en ratones modificados genéticamente que he expuesto brevemente indican que la mutación de los genes parkinsonianos *per se* no produce obligadamente patología parkinsoniana en roedores y que otros fenómenos relacionados con el fondo genético general del individuo (la cepa de ratón por ejemplo) influyen en la aparición, progresión o gravedad anatomo-patológica de la enfermedad. Esto explica que la penetrancia del llamado parkinsonismo genético humano sea muy inferior al 100%, apoyando el origen multifactorial de la enfermedad. Al fondo genético o las mutaciones en genes concretos, deben superponerse otras causas predisponentes, posiblemente relacionadas con agresiones o situaciones de estrés neuronal, que disparen el proceso patológico.

Aunque el acercamiento de mi grupo a la enfermedad de Parkinson tuvo como objetivo inicial el desarrollo de una terapia celular neuroprotectora y neuroreparadora, posteriormente hemos llevado a cabo un esfuerzo considerable para desarrollarnuevos modelos de animales modificados genéticamente que ayuden a comprender la patogenia de la enfermedad. Nuestro primer modelo fue un ratón transgénico que sobreexpresa el enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa bajo el promotor del enzima tirosina hidroxilasa. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasaes un enzima limitante en la síntesis de NADPH por la vía de las pentosas fosfato necesario para regenerar los agentes reductores de las células. Los ratones con sobreexpresión de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa mostraron incremento en la actividad del enzima en las neuronas de la sustancia negra y resistencia al parkinsonismo experimental. Estos datos sustentan el posible efecto protector que tendría una terapia antioxidante que alcanzase a las neuronas centrales afectadas por el parkinsonismo.

Dado que los experimentos de terapia celular utilizando el cuerpo carotídeo y otros tejidos sugieren que el GDNF tiene un efecto protector importante sobre la vía nigroestriatal, decidimos investigar si el GDNF intrínseco (producido por el propio cerebro) tiene un papel fisiológico como neuroprotector. Para ello desarrollamos un ratón "knock out" condicional al que se puede anular el gen GDNF en la vida adulta. Estos animales desarrollan de forma lenta y progresiva un fenotipo parkinsoniano caracterizado por destrucción marcada de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y otras partes del cerebro. Además sufren muerte neuronal en los ganglios simpáticos periféricos y la médula suprarrenal. Tras la ablación del GDNF, los ratones muestran un síndrome parkinsoniano con una hipoquinesia pronunciada y lentitud de movimientos. Estos resultados han demostrado que el GDNF es absolutamente necesario para el mantenimiento de la vía nigroestriatal, lo que da sentido no solo a la terapia antiparkinsoniana basada en la administración de GDNF exógeno, sino a la posible aplicabilidad clínica de la estimulación de la producción de GDNF endógeno. En relación con este tema, hemos mostrado recientemente que las células productoras de GDNF en el estriado son las interneuronas GABAérgicas parvalbumina positivas. Estas células (que representan solo el 2-3% del total de las neuronas del estriado) están unidas entre sí por sinapsis eléctricas formando un sincitio funcional que tiene actividad eléctrica oscilatoria. Por lo tanto es posible que el GDNF se libere fisiológicamente de forma pulsátil y no continua como se había aplicado hasta ahora. En la actualidad estamos estudiando si la producción estriatal endógena de GDNF puede modularse por estimulación farmacológica, eléctrica o magnética.

Junto a los modelos indicados, nuestro grupo está desarrollando ratones con alteraciones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial para determi-

nar experimentalmente las causas que dotan de especial sensibilidad a las células dopaminérgicas de la sustancia negra. Con los modelos animales que muestran neurodegeneración progresiva pretendemos investigar las etapas tempranas de la neurodegeneración, antes del inicio de las alteraciones moleculares que irreversiblemente conllevan a la apoptosis o muerte celular. Todo ello permitirá identificar nuevos mecanismos patogénicos y, eventualmente, dianas terapéuticas sobre las que actuar con agentes farmacológicos.

MODELOS CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON HUMANA

Una de las mayores limitaciones para investigar los mecanismos patogénicos del parkinsonismo y otras patologías humanas es la falta de modelos que reproduzcan fielmente la enfermedad tal como se manifiesta en el hombre. Como ocurre con otras enfermedades, el “síndrome parkinsoniano” humano se presenta con manifestaciones distintas (más o menos rigidez, mucho o poco temblor, etc) en los diferentes enfermos debido posiblemente no solo a las variaciones genéticas individuales sino a que en cada caso los mecanismos patogénicos causantes de la enfermedad son también distintos. Hasta fecha reciente el parkinsonismo humano solo podía estudiarse en los niveles celular y molecular en muestras de tejido obtenidas *post mortem*. Sin embargo, esta situación ha cambiado radicalmente en años recientes gracias al descubrimiento de la reprogramación nuclear. Los estudios de Yamanaka y colaboradores en Japón han demostrado que los fibroblastos obtenidos de biopsias de la piel de sujetos adultos (incluso de edad avanzada) y mantenidos en cultivo se pueden convertir con relativa facilidad en células pluripotentes con propiedades muy similares a las células madre embrionarias. Estas células, denominadas células madre pluripotentes inducidas (o iPS de “induced pluripotent stem cells”), pueden diferenciarse *in vitro* a tipos celulares diversos, entre ellos a neuronas dopaminérgicas similares a las que existen en la sustancia negra del cerebro adulto. Las neuronas diferenciadas a partir de células iPS de pacientes parkinsonianos proporcionan un “modelo de enfermedad” excelente donde poder estudiar no solo los mecanismos patogénicos genéticos o adquiridos sino también la respuesta a diferentes fármacos. Estas nuevas metodologías han tenido un impacto “revolucionario” sobre la investigación biomédica y su potencial aplicabilidad a la clínica humana podría tener consecuencias todavía insospechadas. Por la relevancia científica y médica de la reprogramación nuclear Shinya Yamanaka recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2012.

Aunque varios laboratorios han sido capaces de generar neuronas dopaminérgicas a partir de células iPS obtenidas de sujetos sanos y parkinsonianos, la recapitula-

ción de la enfermedad *in vitro* no se ha conseguido hasta hace pocos meses gracias a un trabajo llevado a cabo por un consorcio español en el que participa nuestro grupo como miembro del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas. En este trabajo se ha comparado la evolución de neuronas dopaminérgicas mantenidas en cultivo obtenidas de sujetos sanos y de pacientes con Parkinson esporádico o genético con la mutación en el gen Park8. Durante las primeras semanas en cultivo las neuronas de diferente origen se comportan de forma similar pero antes de los dos meses muestran signos de degeneración celular, caracterizados por vacuolas autofágicas, disminución del número y longitud de las neuritas. Los signos de neurodegeneración son mucho más precoces en neuronas procedentes de pacientes parkinsonianos que en las procedentes de sujetos sanos de la misma edad. La conclusión más radical de este trabajo es que incluso en los casos de enfermedad de Parkinson esporádico, no determinado genéticamente, existe una predisposición constitutiva de las células a sufrir degeneración que se pone de manifiesto al someterlas al estrés que supone para ellas, una vez diferenciadas a neuronas, las condiciones del cultivo celular.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La cura o prevención de la enfermedad de Parkinson, como de otras enfermedades neurodegenerativas, es uno de los retos científicos más importantes de la biomedicina actual. Durante los últimos años se han producido avances significativos en la comprensión de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad, así como en el desarrollo de terapias celulares o genéticas que frenen o retarden el curso de la misma. No obstante todavía se desconoce con detalle la cascada de eventos que determinan la aparición y progresión de la patología parkinsoniana. Por lo tanto, la traslación a la clínica de la ingente cantidad de conocimiento molecular acumulado está todavía en gran parte pendiente de su materialización. Los modelos animales juegan un papel fundamental en la investigación básica y traslacional sobre la enfermedad de Parkinson, ya que permiten comprobar en el laboratorio la validez de las diferentes hipótesis patogénicas y la eficacia de nuevas terapias o de fármacos en fases tempranas de su desarrollo.

El descubrimiento de las células iPS y su diferenciación a neuronas dopaminérgicas ha permitido generar modelos celulares de la enfermedad de Parkinson humana. Esta es una consecución científica inimaginable hace solo 10 años. Durante los últimos 30 años el descubrimiento de la L-DOPA y la medicación prodopaminérgica

han proporcionado mejoras muy acusadas en la longevidad y calidad de vida de los enfermos parkinsonianos. En los albores del siglo XXI existen razones fundadas para esperar que la combinación de los estudios preclínicos en modelos animales y en neuronas diferenciadas a partir de células iPS humanas nos conduzca en poco tiempo a tratamientos mucho más eficaces que los actualmente disponibles y, eventualmente, a la curación de la enfermedad.

Es importante que España tenga un papel protagonista en el esfuerzo internacional por aminorar el efecto de la neurodegeneración sobre la duración y calidad de vida de las personas. Entendemos que en la situación de particular crisis económica que atravesamos son aconsejables la austeridad y mesura en el gasto. Sin embargo creo, con la mayoría de los investigadores, que un sistema de investigación y desarrollo fuerte y propio es absolutamente necesario para que nuestro país gane un futuro mejor, basado en un progreso social y económico en cooperación con nuestros vecinos, pero sostenible, independiente y competitivo internacionalmente. Sin ciencia no hay futuro

Deseo finalizar este Discurso como comencé, reiterando mi agradecimiento a las autoridades, a todos los presentes en este acto, y especialmente a mis nuevos compañeros de Corporación por su apoyo y confianza. Estoy desde hoy a su disposición para trabajar juntos al servicio de esta Real Academia.

Muchas gracias.