



**Fundació**  
La Marató de TV3

20<sup>è</sup> SIMPOSIUM  
Enfermedades neurodegenerativas



## **IMPORTANCIA DE LA TRANSEÑALIZACIÓN DE LA IL-6 EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**Juan Hidalgo Pareja**

Facultat de Biociències UAB

## 1. Resumen

1. **La enfermedad de Alzheimer (AD)** es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en humanos de edad avanzada. Las principales características de esta enfermedad son la presencia extracelular de placas amiloides y la presencia intracelular de ovillos neurofibrilares. Las placas amiloides y la angiopatía amiloide son consecuencia de agregados de péptidos beta-amiloide ( $A\beta$ ) formados a partir de la proteína precursora amiloide (APP) en el parénquima del cerebro (principalmente córtex e hipocampo) y las regiones perivasculares, respectivamente. Estos hechos derivan a una prominente neuroinflamación, la cual, eventualmente, reforzaría la enfermedad. La interleucina-6 (IL-6) es una de las citocinas afectadas en la AD, y se ha observado que ejerce muchos de sus efectos a través de la transeñalización.

Nuestra hipótesis postula que un inhibidor específico de la transeñalización, la proteína humana sgp130-Fc, tendría un impacto significativo en la progresión de la AD.

El objetivo de nuestro proyecto es caracterizar la progresión de la AD en un modelo animal ampliamente utilizado, el ratón Tg2576, cuando simultáneamente coproduce el inhibidor específico de la transeñalización, la proteína sgp130-Fc, producida específicamente en astrocitos. Este ratón bigénico (Tg2576/GFAP-sgp130) será comparado con los demás de la camada, animales Tg2576, GFAP-sgp130 y WT.

Además de los objetivos del proyecto original, y como consecuencia de la petición de los revisores del mismo, incluimos el estudio de otro ratón modelo de AD, el triple transgénico 3xTg-AD, utilizando una estrategia similar a la del monogénico (Tg2576).

## 2. Animales

Se utilizan dos cepas de ratones modelos de AD, el Tg2576 (o APPSwe, portadores de la mutación sueca K670N/M671L, procedentes de Taconic Europe A/S [Ry, Denmark]) y el 3xTgAD, del laboratorio de LaFerla (vía L. Giménez-Llort, de la UAB)); el 3xTgAD es un ratón triple transgénico portador de APPSwe, PS1M146V y tauP301L. Por otra parte, los ratones GFAP-sgp130 han sido proporcionados por el Dr. S. Rose-John (Christian-Albrechts-University of Kiel, Alemania).

Estos ratones se cruzarán de forma adecuada para lograr homogeneidad del fondo genético. Al describirse que los animales Tg2576 presentan una mortalidad muy elevada, será necesario establecer grupos con un número elevado de animales. Es relevante aclarar que se harán tandas sucesivas de cruces, ya que no pueden hacerse todas en paralelo.

Tras el destete (3 semanas de edad), los animales se separan por sexo y se identifican, cortando un pequeño trozo de cola para realizar el genotipado mediante PCR. Además, durante toda la vida del animal se controla su peso y la mortalidad, y también se mide la glucosa en el momento del destete.

### **Análisis conductuales**

Se realiza la caracterización conductual del modelo mediante una batería de tests a dos edades diferentes, antes y después de la aparición de placas amiloides. En el Tg2576 las placas aparecen en torno a los 12 meses de edad; así pues, los tests se administrarán sobre los 5-7 meses y a los 13-14 meses de edad. Antes de la realización de los tests, los ratones se habitúan a la manipulación y se aclimatan a la sala. La batería de tests incluye: *Open-field* (campo abierto: locomoción), *Hole-board* (tabla de agujeros: exploración), *Elevated-plus maze* (aparato en cruz elevado: ansiedad) y *Morris water maze* (aparato [piscina] de agua de Morris: memoria espacial). El estudio del 3xTgAD será similar al del modelo monogénico de AD.

### **Análisis neuropatológicos**

Los dos modelos de AD estaba previsto que fuesen eutanasiados a los 14-15 meses de edad (ver más adelante), y a ser posible (dependiendo del éxito de los cruces y la mortalidad), un grupo de animales sería también eutanasiado a los 5-6 meses. Los cerebros son extraídos y diseccionados, el hemisferio derecho se disecciona en córtex, hipocampo y resto, mientras que el hemisferio izquierdo se sumerge en paraformaldehído (PFA) 4% durante 24 h, después se lava en PBS 1x y se conserva en etanol 70% hasta su inclusión en parafina. Las técnicas que se aplicarán serán:

- *Western blot*, para medir APP, A $\beta$ , así como otros fragmentos proteolíticos de la proteína precursora.
- *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), para determinar la cantidad de A $\beta$ <sub>1-40</sub> y A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

- Inmunohistoquímica, para determinar la carga de placas amiloides, respuestas gliales alrededor de estas, y fosforilación de tau.

3. **Primer año:** obtención de las colonias de ratones (Tg2576, 3xTgAD y GFAP-sgp130), y establecimiento de los primeros cruces.

Segundo año: genotipado de los animales, seguimiento de las diferentes colonias (control de la mortalidad y el peso...). Primera batería de tests conductuales a los 5-7 meses y, si todo va bien, segunda batería a los 13-14 meses de alguna tanda de ratones.

Tercer año: Últimos tests conductuales en las últimas tandas de ratones. La eutanasia de los animales estaba prevista a los 14 meses de edad para los análisis neuropatológicos, pero se han modificado los tiempos de eutanasia de la cepa 3xTgAD a >20 meses de edad, ya que el desarrollo del fenotipo (producción de A $\beta$ ) fue mucho más lento de lo previsto. En el caso del modelo Tg2576, hemos decidido también alargar el tiempo de eutanasia hasta los ~18 meses para consolidar el fenotipo.

## 2. Resultados

### **Control de peso, glucemia y mortalidad**

Tanto en el modelo Tg2576 como en el 3xTg-AD (a edades más avanzadas) se observa una pérdida de peso significativa. Este efecto no se revierte con la inhibición de la transeñalización de IL-6 con sgp130.

Se ha medido la glucemia en el momento del destete (3 semanas). Los ratones Tg2576 presentan un nivel de glucosa inferior que los animales controles. Este efecto no se revierte con la inhibición de la transeñalización de IL-6. En el modelo 3xTg-AD no hay diferencias significativas en los niveles de glucosa.

La mortalidad, tal y como esperábamos, era acusada en los animales Tg2576. En este caso, sin embargo, la inhibición de la transeñalización de IL-6 sí revirtió significativamente la mortalidad en ambos sexos. Los animales 3xTg-AD presentan un incremento de mortalidad respecto a los controles solo en edades avanzadas

(aproximadamente 20 meses), y mucho menor respecto al modelo Tg2576. La inhibición de la transeñalización de IL-6 tiene un efecto dependiente de sexo, perjudicial en machos y beneficioso en hembras.

### **Análisis conductuales**

En la medida de lo posible realizamos análisis conductuales antes y después de la aparición de placas amiloides.

#### *Antes de la aparición de las placas amiloides*

Los resultados previos o preliminares sugirieron estudiar los animales a los 5-6 y 9-11 meses de edad en el modelo Tg2576 y 3xTg-AD, respectivamente. Se ha seguido el siguiente orden: *Open-field* (locomoción), *Hole-board* (exploración), *NORT* (memoria), *Elevated-plus maze* (ansiedad) y *Morris water maze* (memoria espacial).

En el modelo Tg2576 los efectos son diferentes según el sexo, siendo más acusados en hembras. Las hembras Tg2576 tienen más actividad locomotora y exploradora que las controles, y menos ansiedad. La inhibición de la transeñalización de IL-6 con sgp130 revierte el efecto en la exploración y la ansiedad. En el caso de los machos también se observa que los animales Tg2576 son menos ansiosos que sus respectivos controles, pero no se observa efecto del bloqueo de la transeñalización de IL-6. En cuanto a la memoria, se ven déficits de memoria espacial en los animales Tg2576, pero la inhibición de la transeñalización de IL-6 no tiene efecto sobre este parámetro. Los resultados con el NORT no fueron concluyentes.

En el modelo 3xTg-AD, los efectos sobre la conducta no son tan marcados como en el modelo Tg2576, probablemente debido a la lenta progresión de la enfermedad. Sin embargo, observamos que los animales 3xTg-AD exploran más que los controles, y en el caso de las hembras, tienen menos ansiedad. No se observa efecto de la inhibición de la transeñalización de IL-6 en estos parámetros, pero sí hay un pequeño efecto en los machos, disminuyendo la ansiedad independientemente de la presencia de los transgenes de AD. En cuanto a la memoria espacial, observamos que los animales 3xTg-AD presentan una mayor velocidad de natación que los respectivos controles. Por otro lado, en hembras, la inhibición de la transeñalización de IL-6 incrementa la latencia en llegar a la plataforma, sugiriendo así un detrimento en el aprendizaje espacial. Los resultados con el NORT no fueron concluyentes.

### *Después de la aparición de las placas amiloides*

Los resultados previos sugirieron estudiar los animales a los 15-16 meses de edad en el modelo Tg2576, y descartar realizar más estudios conductuales en el modelo 3xTg-AD, dadas las elevadas edades a contemplar, el débil fenotipo en animales heterocigotos y el tiempo disponible.

Los ratones Tg2576 tienen más actividad locomotora que los controles; este efecto se ve revertido en machos con la inhibición de la transeñalización de IL-6, pero no en hembras, existiendo de hecho un pequeño incremento independientemente del genotipo Tg2576. También muestran una tendencia a mayor actividad exploratoria, aunque este efecto es significativo solo en hembras, pero en este caso no observamos efecto de la inhibición de la transeñalización de IL-6. La ansiedad está reducida en los animales Tg2576 en comparación con los controles, y no existe efecto de la inhibición de la transeñalización. Por último, los animales Tg2576 presentan déficits en memoria y aprendizaje que no están afectados por la inhibición de la transeñalización de IL-6.

### Análisis neuropatológicos

Estos se realizan a partir de muestras de córtex e hipocampo de ratones eutanasiados a diferentes edades, para monitorizar la progresión de la enfermedad. Se analiza la cascada amiloide (APP, A $\beta$  y otros fragmentos procedentes de la proteólisis de la proteína precursora) mediante *Western blot*, cantidad de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> mediante ELISA, así como también neuroinflamación y carga de placas amiloides mediante inmunohistoquímica.

### *Antes de la aparición de las placas amiloides*

En el modelo Tg2576 a los 10-11 meses de edad detectamos presencia de APP precursora por WB, también detectamos A $\beta$ <sub>40</sub> mediante ELISA. No se observó un efecto claro con la inhibición de la transeñalización de IL-6. En el modelo 3xTg-AD a 5-6 y 10-11 meses de edad los animales presentan proteína APP precursora, pero no hay detección de A $\beta$ . Observamos un incremento de APP precursora en los animales de 10-11 meses respecto a los de 5-6 meses. No observamos efectos de la inhibición de la transeñalización de IL-6.

### *Después de la aparición de las placas amiloides*

En el modelo Tg2576 a los 16-17 meses de edad, los resultados de ELISA indican que no hay efecto de la inhibición de la transeñalización en la cantidad de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>. En cuanto a la cantidad de placas medidas por inmunohistoquímica sí observamos una disminución de placas en las hembras debida a la inhibición de la transeñalización de IL-6. Las hembras Tg2576 también presentan una mayor respuesta glial medida por inmunohistoquímica, pero en este caso no observamos efecto de la inhibición de la transeñalización de IL-6. Estamos en proceso de análisis del transcriptoma (por *microarrays*) en el hipocampo.

En el modelo 3xTg-AD a los 20-28 meses de edad, observamos que la patología avanza más lentamente de lo que esperábamos. La cantidad de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> medida por ELISA es muy baja comparada con el modelo Tg2576. Además, casi no se observan placas amiloides por inmunohistoquímica, ni inflamación asociada a estas. La inhibición de la transeñalización de IL-6 no tiene efecto sobre estos parámetros. Los resultados de inmunohistoquímica de tau indican una tinción precaria que no permite resultados concluyentes.

### **Análisis del efecto de la obesidad inducida por dietas ricas en grasa en el modelo 3xTg-AD**

Puesto que los animales 3xTg-AD presentaban un fenotipo retrasado, se decidió estudiar los efectos de la obesidad inducida en este modelo. Un grupo de animales de ambos sexos fueron expuestos a una dieta rica en grasas durante 10 semanas, y se midieron algunos parámetros antes y después de la exposición para su comparativa. Los parámetros analizados fueron:

- **Peso corporal e ingesta:** los animales 3xTg-AD presentan un peso disminuido respecto a los controles. Además, presentan una ingesta incrementada, sugiriendo un fenotipo hipermetabólico. La inhibición de la transeñalización acentúa este fenotipo en hembras.
- **Respuesta al ayuno:** tras un ayuno, los animales 3xTg-AD pierden peso más rápidamente que los controles. Una vez vuelven a alimentarse, los animales 3xTg-AD presentan hiperfagia, derivando en una recuperación más rápida del peso perdido

previamente. El bloqueo de la transeñalización de IL-6 inhibe la recuperación del peso, en especial en machos.

- **Temperatura:** los animales 3xTg-AD presentan una temperatura corporal mayor que sus respectivos controles. Este efecto es más marcado en machos que en hembras, y no se ve afectado por el bloqueo de la transeñalización de IL-6.
- **Sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa (mediante una ITT y OGTT):** los animales 3xTg-AD presentan una hipersensibilidad a la insulina, que se revierte solo en machos por la inhibición de la transeñalización de IL-6 tras la exposición a una dieta rica en grasas. Antes de la dieta grasa observamos que los animales 3xTg-AD tienen más tolerancia a la glucosa, disminuida en las hembras GFAP-sgp130; una vez expuestos a la dieta grasa, observamos que las hembras 3xTg-AD disminuyen la tolerancia observada previamente.
- **Hormonas y metabolitos en suero:** los animales 3xTg-AD presentaban un descenso en insulina, leptina y colesterol. Además, en hembras la inhibición de la transeñalización de IL-6 disminuye los niveles de leptina aún más.
- **Neuropéptidos hipotalámicos:** observamos una expresión de IL-6 incrementada en los machos 3xTg-AD, efecto que se rescata por la inhibición de la transeñalización de IL-6.

### **3. Relevancia y posibles implicaciones futuras**

Colectivamente, los resultados de este proyecto proporcionan evidencia de que la transeñalización de IL-6 desempeña un papel en el cerebro de ratones modelos de la enfermedad de Alzheimer (AD). La administración de la forma soluble del correceptor gp130 (sgp130), que ya se emplea en otras patologías inflamatorias, podría ser una estrategia terapéutica en humanos con AD, siendo las mujeres el colectivo potencialmente más sensible. Los resultados también sugieren que los tratamientos deberían ser efectuados en fases iniciales de la enfermedad.



#### 4. Bibliografía científica generada

##### Publicaciones

Manso Y, Comes G, López-Ramos JC, Belfiore M, Molinero A, Giralt M, Carrasco J, Adlard PA, Bush AI, Delgado-García JM, Hidalgo J.

*Overexpression of metallothionein-1 modulates the phenotype of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.*

J. Alzheimer's Dis. **51** (2016) 81-95.

Comes G, Manso Y, Escrig A, Fernandez-Gayol O, Sanchis P, Molinero A, Giralt M, Carrasco J, Hidalgo J.

*Influence of transgenic metallothionein-1 on gliosis, CA1 neuronal loss and brain metal levels of the Tg2576 mouse model of Alzheimer disease.*

Int J Mol Sci. 18 (2017) 251.

Fernández-Gayol O, Sanchis P, Aguilar K, Navarro A, Comes G, Molinero A, Giralt M, Hidalgo J.

*Different responses to a high-fat diet in IL-6 conditional knock-out mice driven by constitutive GFAP-Cre and Synapsin 1-Cre expression.*

Neuroendocrinology (2019) doi: 10.1159/000496845

##### Publicación en revisión

Escrig A, Molinero A, Méndez B, Sanchis P, Fernández-Gayol O, Montilla A, Comes G, Giralt M, Giménez-Llort L, Becker-Paully C, Rose-John S, Hidalgo J.

*IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physio-pathological phenotype of the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease.*

Brain Behav. Immun.

##### Publicación en preparación

Escrig et al.

*IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physio-pathological phenotype of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.*