



Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS SUPRESORES DE LA NEURODEGENERACIÓN EN LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 (DM1)

Patricia Robledo Montoya

IMIM Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques

Manuel Pérez Alonso

Institut de Recerca Sanitària INCLIVA /

Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario de Valencia

1. Resumen del proyecto

Aunque la mayoría de la investigación de la distrofia miotónica (DM1) hasta la fecha se ha centrado en los aspectos musculares de la enfermedad, los pacientes con DM1 y las familias informan de que los problemas relacionados con el sistema nervioso central (SNC) asociados a esta enfermedad suelen ser los más preocupantes y difíciles de tratar. En este proyecto se han caracterizado mejor los sustratos neurobiológicos de la DM1 utilizando nuevos modelos animales para identificar dianas terapéuticas desarrolladas con metodologías innovadoras de descubrimiento de fármacos. Con este propósito, hemos evaluado compuestos candidatos, identificados tras la detección en *Drosophila*, en un modelo de ratón para DM1 recientemente descrito: un *knock-out* del gen Mbnl2. Estos animales mostraron trastornos cerebrales centrales de DM1 que sugieren que las principales características del cerebro DM1 son atribuibles a la expresión de RNA tóxico y al secuestro de Mbnl2. Se emplearon estudios conductuales, neuroquímicos y farmacológicos para evaluar el potencial terapéutico de compuestos conocidos en ratones *knock-out* Mbnl2 de mediana y avanzada edad. Paralelamente a la evaluación de compuestos, avanzamos en el establecimiento de correlaciones entre los diferentes modelos animales de DM1 (ratones y moscas) para determinar objetivos terapéuticos útiles para los diferentes trastornos del cerebro con DM1. Finalmente, dada la utilidad demostrada del modelo DM1 de mosca basada en el SNC para realizar cribado de moléculas químicas con éxito, se utilizó para aumentar el panel de candidatos a probar en el modelo del ratón, centrándose en una evaluación específica de compuestos con la capacidad ya prevista para cruzar la barrera hematoencefálica. Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron identificar dos compuestos, el metilfenidato y la mirtazapina, para aliviar los déficits neuropsicológicos progresivos y la neurodegeneración observada en modelos animales de DM1.

2. Resultados

1. El modelo de ratón deficiente en el gen Mbnl2 (Mbnl2 KO) es relevante para las alteraciones del SNC asociadas a DM1. Específicamente, los ratones jóvenes, machos y hembras, que carecen de este gen muestran desregulación de la actividad circadiana, síntomas depresivos y déficits cognitivos. Sin embargo, en los ratones machos, estas alteraciones parecen ser más específicas, ya que no están relacionadas con los cambios

en actividad locomotora. Además, encontramos que la falta de función del gen *Mbnl2* indujo alteraciones cognitivas y afectivas progresivas en ratones que se asociaron con hiperactivación del sistema dopaminérgico en la corteza prefrontal medial, incluido un aumento en los niveles extracelulares de dopamina, aumento de la expresión de los genes de *Dat*, *Drd1* y *Drd2*, y perturbaciones profundas en la actividad neural y microgliosis en la corteza prefrontal medial y el hipocampo.

2. Se generaron con éxito distintas líneas de *Drosophila* en las que se buscó imitar un aspecto central de la DM1: la expresión de repeticiones tóxicas (expansión CTG) y recrear la falta de función de *muscleblind* endógeno (silenciamiento de *Mbl*). Estos aspectos se indujeron selectivamente en distintos tipos de neuronas para observar su efecto tanto a nivel celular como funcional. Las distintas líneas generadas de *Drosophila* son relevantes para las alteraciones en SNC en pacientes con DM1. En concreto, distintos fenotipos funcionales (vuelo, supervivencia, escalada) mostraron en la mayoría de casos un empeoramiento, lo que confirma una fuerte implicación de la toxicidad de la expresión de una expansión CTG o la interferencia de *Mbl* en aspectos funcionales controlados por el cerebro. De manera muy interesante, estudios a nivel celular, histoquímico y metabolómico de la expresión de expansiones CTG en neuronas dopaminérgicas de *Drosophila* reprodujeron en gran medida el proceso de neurodegeneración y atrofia cerebral que presentan los pacientes.

3. Se determinaron con éxito distintos biomarcadores relacionados con neurotoxicidad y neurodegeneración en *Drosophila*. Específicamente, la expresión de expansiones CTG o silenciamiento de *Mbl* en neuronas dopaminérgicas provoca una importante desregulación del metabolismo energético: los niveles de ATP y de glucosa están significativamente disminuidos, al igual que se ha detectado por tomografía de emisión de positrones en los lóbulos temporal y frontal de pacientes con DM1. Se han identificado marcadores adicionales interesantes implicados en procesos de inflamación y de estrés oxidativo, así como de procesos degenerativos específicos y alteraciones en la neurotransmisión (bajos niveles) que no solamente afectan al sistema dopaminérgico.

4. Con el fin de encontrar nuevas dianas terapéuticas, se realizó un cribado de alto rendimiento *in vivo* de los 3.805 fármacos contenidos en las quimiotecas Pfizer, Prestwick, GreenPharma, Otava y SPO Life Chemicals utilizando un fenotipo de muerte

pupal en *Drosophila* provocado por la expresión de expansiones CTG. Se obtuvieron 61 *hits* (1,6% de compuestos), que ofrecieron un incremento significativo del nacimiento de moscas adultas. Un análisis global de los resultados obtenidos tras el cribado en moscas mostró que una fracción importante de los *hits* (18%) tiene que ver con la modulación de la actividad de los principales grupos de neurotransmisores: glutamato, GABA, dopamina y serotonina. Esto permitió la identificación y validación de dos compuestos, el metilfenidato y la mirtazapina, como potencialmente útiles para aliviar los déficits neuropsicológicos progresivos y la neurodegeneración observada en modelos animales de DM1.

5. Estudios conductuales, bioquímicos y moleculares en ratones Mbnl2 KO mostraron que el tratamiento crónico con metilfenidato revierte los déficits de comportamiento, los cambios en la expresión de los genes *Dat* y *Drd2* específicamente, y el aumento en la expresión de la microglía proinflamatoria en la corteza prefrontal presentes en este modelo de alteraciones del SNC en DM1.

6. Con el fin de crear un modelo animal de neurodegeneración específica en las áreas relacionadas con las alteraciones conductuales (corteza frontal e hipocampo), se desarrolló una nueva línea de ratón condicional *knock-out* que carece del gen *Mbnl2* selectivamente en las neuronas glutamatérgicas del cerebro anterior (NEX-cKO). Este nuevo modelo de ratón recapitula las alteraciones cognitivas y afectivas observadas en la patología de la DM1. Además, estos ratones muestran neurodegeneración y proliferación de la microglía en la zona subgranular del giro dentado, y una desregulación del mRNA de los receptores histaminérgicos de tipo H1 y serotoninérgicos de tipo 1A en el hipocampo.

7. Las dosis bajas de un antipsicótico atípico, la mirtazapina, pudieron revertir las alteraciones cognitivas y afectivas observadas en ratones NEX-cKO al prevenir la neurodegeneración y la proliferación de la microglía en la zona subgranular del giro dentado, donde tiene lugar la neurogénesis. La mirtazapina también revirtió la desregulación del mRNA de los receptores histaminérgicos de tipo H1 y serotoninérgicos de tipo 1A en el hipocampo.

3. Relevancia e implicaciones futuras

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para los trastornos neuropsicológicos asociados con la DM1. El proceso de búsqueda de nuevos candidatos terapéuticos tiene una herramienta muy poderosa en el uso de modelos para la DM1 en *Drosophila melanogaster* y en ratones deficientes del gen *Mbnl2* que recapitulan específicamente las alteraciones del SNC asociadas con DM1. En concreto, hemos identificado que una diana importante son las neuronas dopaminérgicas y se han propuesto fármacos conocidos para el reposicionamiento en DM1, lo cual se explorará en colaboración con la industria de este sector, por ejemplo la empresa SOM Biotech. Además, el proyecto ha proporcionado dos nuevos objetivos farmacológicos, el metilfenidato y la mirtazapina, como posibles tratamientos para las alteraciones cognitivas y afectivas experimentadas por los pacientes con DM1. Estos resultados proporcionan un nuevo objetivo farmacológico para el tratamiento de la DM1 y revelan nuevos mecanismos de acción para estos efectos, abriendo nuevas vías para una orientación terapéutica más completa de la patología de la DM1.

Ha sido significativa también la detección de una reducción significativa de la producción de ATP en neuronas que expresan los RNA tóxicos o que tienen silenciada la expresión de *muscleblind*. Es muy probable que la generación insuficiente de energía contribuya a la reducción en el número de neuronas dopaminérgicas en el cerebro de estos modelos, de modo que investigar el origen de esta reducción y suplir el déficit energético pueden constituir dianas terapéuticas importantes en el tratamiento de la neurodegeneración. En este sentido continuaremos con la investigación sobre suplementos nutricionales que pudieran rescatar estos déficits, por ejemplo suplementos de ATP, de una manera semejante a nuestra colaboración con la empresa MyoGem Health en el desarrollo del suplemento Myo-DM para pacientes con DM1.

4. Bibliografía

1. Ramon-Duaso C, Gener T, Consegal M, Fernández-Avilés C, Gallego JJ, Castarlenas L, Swanson MS, De la Torre R, Maldonado R, Puig MV, Robledo P. *Methylphenidate Attenuates the Cognitive and Mood Alterations Observed in Mbnl2 knockout Mice and Reduces Microglia Overexpression.*

Cerebral Cortex, 2018; 1–20. doi: 10.1093/cercor/bhy164.

2. Ramon-Duaso C, Fernández-Avilés C, Soriano ES, Llamusí B, Artero R, Pérez-Alonso M, De la Torre R, Robledo P.

Conditional mutagenesis of the Mbnl2 gene in the neocortex and hippocampus recapitulates DM1 neuropsychopathology and the atypical antidepressant mirtazapine reverses these alterations.

Brain, Behaviour, and Immunity (enviado).

3. Soriano ES, Llamusí B, Bargiela A, Artero R, Pérez-Alonso M.

Dopamine system dysfunction contributes to myotonic dystrophy neurological phenotypes.

(En preparación).

4. Soriano ES, Llamusí B, Bargiela A, Artero R, Pérez-Alonso M.

Identificación de compuestos con actividad terapéutica en modelos neuronales de distrofia miotónica en Drosophila.

(En preparación.)