



Fundació
La Marató de TV3

20^e SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



TEST PRECLÍNICO DE COMPUESTOS QUÍMICOS CONTRA LOS EFECTOS TÓXICOS DE LA HUNTINGTINA MUTANTE EN MODELOS MURINOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Rafael Vázquez Manrique

Hospital Universitari i Politècnic La Fe València

1. Resumen del proyecto

Muchas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (EH), muestran rasgos fenotípicos que facilitan su diferenciación clínica. Sin embargo, muestran una característica común notable: la presencia de agregados de proteínas en las neuronas. Todavía no está claro si estos agregados son una causa o una consecuencia de la enfermedad. Independientemente de su naturaleza (es decir, si son causa o consecuencia), la acumulación de dichos agregados secuestra recursos que de otra forma se utilizarían para amortiguar el mal funcionamiento de las proteínas. Todos los organismos vivos muestran, naturalmente, una acumulación de agregados de proteínas que dependen de la edad. Sin embargo, en las enfermedades mencionadas anteriormente, la tasa de agregación de proteínas aumenta dramáticamente debido a la presencia de moléculas mutantes propensas a la agregación, que a menudo son hereditarias. La dinámica de los procesos de agregación tiene un impacto en varias funciones celulares clave (transporte intracelular, función sináptica, etc.) encargadas de contrarrestar la presencia de especies tóxicas. Aunque estas moléculas mutantes son en gran parte responsables de la aparición del fenotipo, algunos modificadores genéticos pueden alterar la progresión de la agregación. Dado que la actividad de muchos de estos genes modificadores es susceptible de ser regulada por fármacos, esto permite influir ectópicamente en la velocidad de agregación y progresión de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que hay muchos genes desconocidos, susceptibles de ser modulados por compuestos químicos para proteger la célula de las moléculas tóxicas. En este sentido, hemos demostrado que los activadores de AMPK pueden aliviar los fenotipos presentados en modelos de dos enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Huntington y de Lafora (epilepsia mioclónica progresiva producida por la acumulación de poliglucosanos y proteínas insolubles en el cerebro y otros tejidos). Por ejemplo, los activadores de AMPK pueden reducir el deterioro celular en modelos murinos de la EH y en gusanos *C. elegans*. Además, los activadores de AMPK pueden reducir el fenotipo de células de pacientes y modelos murinos de la enfermedad de Lafora. Creemos que el uso de estrategias para aliviar el mal funcionamiento de las proteínas y el estrés del retículo endoplásmico (ER) podría ser beneficioso para la EH y la enfermedad de Lafora. Nuestros datos sugieren que existen mecanismos comunes que permiten que las células sobrevivan en ambas patologías, y que esto se puede aplicar a otras enfermedades neurodegenerativas. El objetivo

general de esta propuesta es consolidar nuestro conocimiento sobre los beneficios de la activación del AMPK, así como investigar los mecanismos que subyacen a estos efectos. AMPK es un regulador maestro de la homeostasis de la energía celular y también una diana terapéutica contra la EH. AMPK puede mantener los niveles de energía y además también puede combatir el estrés celular de diversa naturaleza, como el inducido por la huntingtina mutante (mHtt). Por tanto, nuestra hipótesis es que la activación de AMPK en mamíferos reducirá la toxicidad celular causada por la mHtt y, por lo tanto, atacaremos la raíz de la causa de la enfermedad. Creemos que la reducción de la toxicidad inducida por mHtt puede mejorarse mediante la activación de la autofagia y otros mecanismos, como la reducción de la inflamación. Nuestro análisis se realizó utilizando los ratones zQ175, que es un modelo de la EH bien definido. Estos ratones expresan alrededor de 190 tripletes CAG en el primer exón de HTT. Estos roedores resumen magníficamente la neurodegeneración que se observa en los humanos. El objetivo principal se puede subdividir en tres objetivos principales:

1. Pruebas de fármacos con potencial de retrasar los fenotipos relacionados con la EH en modelos de la enfermedad en *C. elegans*. Utilizamos una cepa de *C. elegans* que expresa 40 poliglutinas (poliQs, 40Q) en células musculares, que muestran un fenotipo de agregación dependiente de la edad. Analizamos los activadores de AMPK y las moléculas que alivian el estrés del ER, lo que reduce o retrasa la formación de agregados. Como activadores de AMPK probaremos metformina, trehalosa, resveratrol, MVR1316, propranolol y epigallocatequina-3-O-galato.
2. Ensayo preclínico empleando metformina (activador AMPK) y reductores de estrés en ER en un modelo de ratón de la EH. Ensayaremos estos compuestos, solos o en combinación, para detener o retardar el progreso de la enfermedad en estos ratones. Como prueba de concepto, comenzaremos el tratamiento con metformina, un activador de AMPK ampliamente utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo 2. A continuación, utilizaremos los compuestos más efectivos probados en la parte 1. Estos compuestos se suministrarán a ratones de tres meses de edad y el tratamiento se extenderá durante tres meses. La progresión de la enfermedad se medirá después de tres meses de tratamiento utilizando pruebas de comportamiento estándar. Finalmente, evaluaremos la presencia de agregados y signos de degeneración y muerte celular en muestras *post mortem* de cerebro de roedor.

2. Resultados

Objetivo 1. Trabajo con modelos invertebrados

Para hacer un primer ensayo con los fármacos, utilizamos el modelo de *C. elegans* de toxicidad inducida por poliglutaminas (poliQs) del laboratorio del Dr. Morimoto (gusanos que expresan 40Q::YFP en células musculares). Pero, además, también creamos nuestro propio modelo de toxicidad de poliQs en células neuronales de *C. elegans*, para probar la recuperación funcional de los gusanos por los medicamentos. Existe un debate candente acerca de si los agregados son causa o consecuencia de la enfermedad, por lo que, independientemente de que el estudio de la dinámica de agregación sea interesante, también quisimos probar la funcionalidad del sistema nervioso. Nuestro modelo consiste en gusanos transgénicos portadores de una construcción que expresa 112 tripletes CAG en neuronas mecanosensoriales. En estos gusanos hemos probado varios activadores AMPK, con resultados muy positivos. Investigamos las siguientes sustancias: metformina, fenilbutirato, trehalosa, MVR1316 (un compuesto activador sintético de AMPK sintetizado por la Dra. Ana Castro del Instituto de Química Médica, CSIC, Madrid), salicilato y bedaquilina, un medicamento utilizado en el tratamiento de tuberculosis.

Además del análisis funcional en *C. elegans* para reducir la toxicidad inducida por poliQs, realizamos estudios para verificar los posibles mecanismos de acción de estas sustancias. Por ejemplo, en un artículo de investigación anterior hemos verificado que el efecto neuroprotector de la metformina en los gusanos estresados por poliQs se debe en gran medida a la enzima AMPK. Creemos esto porque los mutantes que no tienen función AMPK no pueden ser rescatados por esta sustancia (Vázquez-Manrique *et al.*, 2016, Hum Mol Genet). Siguiendo esta lógica, hemos verificado que el salicilato también necesita actividad AMPK para realizar su función protectora.

Como dijimos, además de nuestro modelo poliQs (112Q::TdTomato), hemos utilizado el modelo de nematodos de *C. elegans* que expresa 40Q::YFP en células musculares, para investigar si la metformina es capaz de modificar los patrones de agregación, y hemos verificado que la metformina es capaz de reducir los agregados en estos gusanos. Además, demostramos que la agregación depende de AMPK y de la autofagia. Para probar que la metformina necesita actividad de AMPK, introdujimos un alelo mutante de AMPK α (*aak-2*) en los gusanos que expresan 40Q (40Q; *aak-2*). Cuando

probamos la metformina en estos gusanos, no mostraron una reducción de los cuerpos de inclusión. Además, cuando incluimos en la prueba la cloroquina, un conocido inhibidor de la autofagia, observamos que la metformina no pudo rescatar la agregación de poliQs, lo que confirma que la metformina activa la autofagia. Por otro lado, una vez que supimos que MVR1316 activa AMPK, continuamos investigando el mecanismo detrás de la neuroprotección ejercida por este compuesto. Una de las vías posibles es la activación de la autofagia como ocurre con la metformina. Para detectar la activación de la autofagia utilizamos una cepa de gusanos que expresan LC3 (molécula esencial para los primeros pasos de la autofagia; LC3 se llama LGG-1 en gusanos) fusionada en la pauta con dos proteínas fluorescentes. Cuando se activa la autofagia las proteasas digieren LGG-1/LC3, para permitir la formación de autofagosomas. Los productos de este corte pueden ser seguidos por transferencia Western y nos dan una medida directa del grado de activación de la autofagia. Usando estos animales, observamos que MVR1315 es capaz de activar la autofagia, ya que induce la aparición de productos digeridos. Además, también notamos que la metformina es capaz de inducir el procesamiento de LGG-1, por lo que esta sustancia activa la autofagia, a través de AMPK.

Objetivo 2. Trabajo con el modelo de ratones de la EH, zQ175

El objetivo principal del proyecto siempre fue realizar pruebas preclínicas en modelos de ratones modelo de la EH. En primer lugar configuramos la prueba de concepto del modelo zQ175. Para ello, realizamos una serie de experimentos de comportamiento que nos proporcionaron datos funcionales para ratones de control y EH. Además, desarrollamos la investigación de una serie de marcadores moleculares, probados después de sacrificar a nuestros animales: marcadores de inflamación (GFAP e IBA1), huntingtina mutante (mHtt), un objetivo de AMPK (pACC), el factor BDNF neurotrófico y un marcador de autofagia (p62). Todos estos biomarcadores mostraron que la activación de AMPK, mediante diferentes sustancias, reduce los fenotipos de la EH (reducción de la inflamación, reducción de los agregados mHtt, aumento de BDNF, etc.).

Con respecto a la prueba de comportamiento, utilizamos el *rotarod*. Esto consiste en que los ratones se someten a un desafío en un cilindro que gira, y en el que los animales deben mantener el equilibrio. Cuando caen se toma el tiempo que se han mantenido sobre el cilindro. Este experimento nos proporciona datos sobre la

capacidad motora de los animales. Otra prueba es Beam Balance, en la cual los animales tienen que pasar por una serie de pasarelas de diferente anchura y se mide el tiempo que tardan en hacerlo. Finalmente los animales son sometidos a una prueba de estrés, que mide su estado de ánimo. Es la llamada prueba Tail Suspension, que consiste en sostener a los animales de la cola, en una posición invertida, y se mide el momento en que los animales luchan para levantarse. Cuando un ratón está deprimido, descansa más tiempo.

Usando estas técnicas, hemos probado varios activadores de AMPK en los ratones zQ175: metformina, trehalosa, resveratrol, MVR1316, propanolol y epigallocatequina-3-O-galato. El primer compuesto que propusimos en la memoria inicial, la metformina, ha demostrado ser una sustancia con una sorprendente capacidad neuroprotectora (Sanchis *et al.*, *Experimental and Molecular Medicine*, en prensa).

MVR1316 es uno de los activadores AMPK más fuertes de que disponemos, ya que en cultivos celulares activa 100 veces más que la metformina. Además, tiene un enorme poder de neuroprotección en gusanos estresados por poliQs. Desafortunadamente, MVR1316 tiene una capacidad moderada para rescatar la coordinación motora de los ratones zQ175. ¿A qué se debe? Creemos que es un efecto de la baja solubilidad en agua de MVR1316. Esto podría hacer que la biodisponibilidad de este compuesto sea baja en el cerebro de los ratones. En cualquier caso, sigue siendo protector, quizás porque parte del producto ha alcanzado el sistema nervioso y al ser tan potente mantiene su capacidad curativa. Con respecto a este problema, nuestra colega, la Dra. Ana Castro de IQM (CSIC, Madrid) ha generado una nueva versión básica de MVR1316 que parece más soluble. Aunque los experimentos se encuentran en un estado preliminar, continuaremos desarrollando estos derivados químicos, gracias a la subvención otorgada por la Fundación Ramón Areces (CIVP19S8119).

Estudio observacional en pacientes con EH

Además de estos objetivos, tuvimos la oportunidad de realizar un estudio observacional con datos de una base de datos de pacientes con EH, el denominado Enroll-HD (<https://www.enroll-hd.org/>). Enroll-HD es un estudio clínico de observación global que recopila datos de pacientes con EH y controles sanos e incluye datos muy estandarizados sobre aspectos tan diversos como la genética, la motricidad, la capacidad cognitiva de los pacientes, los medicamentos, etc., relacionados con la EH y con otras enfermedades.

Dado que la diabetes tipo 2 está muy extendida y estos pacientes toman metformina para tratar la afección, planteamos la hipótesis de que una proporción de pacientes con EH podría ser medicada con este medicamento. Por lo tanto, estudiamos cómo se comportaron en relación con los pacientes con EH que no tomaron metformina. De este modo, realizamos un estudio estadístico de la capacidad cognitiva de los pacientes con EH que tomaron la sustancia con respecto a los que no lo hicieron. Dado que la diabetes tipo 2 tiene un impacto muy negativo en el sistema nervioso, utilizamos la capacidad cognitiva de los controles sanos con y sin diabetes tipo 2 para restar este impacto de los pacientes con EH. Para probar la capacidad cognitiva de los pacientes y los controles, utilizamos los puntajes de las pruebas de capacidad cognitiva descritas en Enroll-HD: *verbal fluency*, Stroop Interference, Symbol Digit Modalities, prueba de Trail Making, Stroop Word Reading y Stroop Color Naming Test. También utilizamos una variable que abarca todas estas pruebas: la puntuación cognitiva. Los análisis estadísticos incluyeron las siguientes covariables: índice de peso corporal, estado educativo, sexo y edad de los participantes. El resultado de este análisis de regresión mostró que, de hecho, las personas con EH que también tomaron metformina para tratar su diabetes de tipo 2 generalmente mostraron mejores puntuaciones en las pruebas cognitivas. Estos resultados se publicaron en Hervás *et al.* (PLoS ONE, 2017). Creemos que estos datos constituyen un apoyo fundamental para nuestros experimentos preclínicos usando metformina como sustancia terapéutica y que respaldan futuros ensayos clínicos que usan esta sustancia. En 2017 obtuvimos fondos para llevar a cabo este ensayo clínico en pacientes con EH (PI17/00011).

3. Relevancia e implicaciones futuras

Hemos demostrado que AMPK es una poderosa diana terapéutica para tratar la enfermedad de Huntington y, lo que es más importante, su actividad se puede modular con medicamentos como la metformina, por ejemplo.

Gracias a los resultados del proyecto, ha sido posible consolidar una nueva propuesta del Instituto de Salud Carlos III (ref.: PI17/00011; Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades), que permitirá continuar el trabajo del proyecto financiado por la Fundació La Marató de TV3. En este nuevo proyecto realizaremos un ensayo clínico doble ciego, controlado con placebo, utilizando metformina como agente terapéutico

contra la enfermedad de Huntington. La metformina no es cara y tiene pocos efectos secundarios. Si este estudio funciona, ampliaremos la cohorte y es posible que en el futuro los médicos puedan prescribir metformina a los pacientes de la enfermedad de Huntington para retrasar la progresión de la enfermedad.

En este proyecto del ISCIII también investigaremos la activación dual de AMPK con metformina y salicilato en un modelo de ratón con EH. Por otro lado, también hemos logrado un proyecto de la Fundación Ramón Areces (ref.: CIVP19S8119) en el cual investigaremos la actividad de uno de los activadores de AMPK (MVR1316) que sintetizó una de nuestras colaboradoras, la Dra. Ana. Castro (IQM-CSIC, Madrid), también en los ratones modelo de la EH (zQ175). Esta molécula es propiedad de la Dra. Castro, por lo que podemos patentar el uso de este producto para tratar la EH. Con todo esto, creemos que la continuidad del trabajo desarrollado en el proyecto de La Marató está garantizada y esperamos traer a los neurólogos nuevas estrategias terapéuticas para probarlas a través de ensayos clínicos.

Además, hemos comenzado a escribir un proyecto para designar la metformina como un medicamento huérfano para tratar la EH. Esto abriría la posibilidad de atraer la atención de la industria farmacéutica para desarrollar terapias contra esta devastadora enfermedad neurodegenerativa. En este sentido, gracias a los resultados de nuestro proyecto, hemos podido atraer la atención de la Fundación Kaertor (kaertorfoundation.org), que promueve la interacción entre grupos básicos y la industria farmacéutica, para establecer alianzas que lleven los resultados del banco de trabajo a ensayos clínicos. Estamos consolidando esta colaboración, para llevar los indoles (MVR1316) sintetizados por nuestra colaboradora, la Dra. Ana Castro (IQM-CSIC, Madrid), a ensayos clínicos.

4. Bibliografía

Publicaciones en revistas indexadas

Hervás D, Fornés-Ferrer V, Gómez-Escribano AP, Sequedo MD, Peiró C, Millán JM, Vázquez-Manrique RP*.

Metformin intake associates with better cognitive function in patients with Huntington's disease.

PLoS ONE, 2017, 12(6): e0179283.

* Autor de correspondencia.

Sanchis A, García-Gimeno MA, Cañada-Martínez AJ, Sequedo MD, Millán JM, Sanz P*, Vázquez-Manrique RP*.

Metformin treatment reduces motor and neuropsychiatric phenotypes in the zQ175 mouse model of Huntington disease.

Experimental and Molecular Medicine (en prensa).

* Autores de correspondencia.

Manuscritos en preparación

Bono-Yagüe J[#], Gómez-Escribano AP[#], Sequedo MD, Hervás D, Fornés-Ferrer V, Burguera J, Peiró C, Millán JM, Vázquez-Manrique RP*.

Synergistic combinations of metformin and salicylate reduce polyglutamine toxicity in C. elegans.

* Autor de correspondencia; [#] Contribución igual.

Sanchis A, García-Gimeno MA, Sequedo MD, Torres, S, Millán JM, Sanz P*, Vázquez-Manrique RP*.

Activation of AMPK through substances of different nature reduces HD phenotypes in mice.

* Autores de correspondencia.

Comunicaciones en congresos

Sanchis A, García-Gimeno MA, Vázquez-Manrique R, Sanz P.

Nuevas aproximaciones terapéuticas a la Enfermedad de Huntington mediante el uso de modelos animales.

Reunión anual de la red CIBERER (2017).

Bono-Yagüe J*, Gómez-Escribano AP*, Sequedo MD, Hervás D, Fornés-Ferrer V, Burguera J, Peiró C, Millán JM, Vázquez-Manrique RP.

Synergistic combinations of metformin and salicylate reduce polyglutamine toxicity in C. elegans.

EHDN Plenary Meeting, Viena, Austria (2018).

https://jnnp.bmj.com/content/89/Suppl_1/A95.3

Bono-Yagüe J*, Gómez-Escribano AP*, Sequedo MD, Hervás D, Fornés-Ferrer V, Millán JM and Vázquez-Manrique RP.

Metformin and salicylate alleviate polyglutamine aggregation by activating synergistically AMPK in C. elegans.

Conbiopreval, Valencia (2019).

Tesis de máster

Título: *Efectos de la combinación de metformina y salicilato en la toxicidad inducida por poliglutaminas en Caenorhabditis elegans*

Estudiante: José Bono Yagüe

Director: Rafael Vázquez Manrique

Nota obtenida: Matrícula de honor