



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



CARACTERITZACIÓ DE NOUS SUPRESSORS DE LA NEURODEGENERACIÓ EN LA DISTRÒFIA MIOTÒNICA TIPUS 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. Resum del projecte

Tot i que la majoria de la recerca de la distròfia miotònica (DM1) fins avui s'ha centrat en els aspectes musculars de la malaltia, els pacients amb DM1 i les famílies informen que els problemes relacionats amb el sistema nerviós central (SNC) associats a aquesta malaltia solen ser els més preocupants i difícils de tractar. En aquest projecte es van caracteritzar millor els substrats neurobiològics de la DM1 utilitzant nous models animals per identificar dianes terapèutiques desenvolupades amb metodologies innovadores de descobriment de fàrmacs. Amb aquest propòsit, hem avaluat compostos candidats, identificats després de la detecció en drosòfila, en un model de ratolí per DM1 recentment descrit: un *knock-out* del gen *Mbnl2*. Aquests animals van mostrar trastorns cerebrals centrals de DM1 que suggereixen que les característiques principals del cervell DM1 són atribuïbles a l'expressió d'RNA tòxic i al segrest d'MBNL2. Es van fer estudis conductuals, neuroquímics i farmacològics per avaluar el potencial terapèutic de compostos coneguts en ratolins *knock-out* *Mbnl2* d'edat mitjana i avançada. Paral·lelament a l'avaluació de compostos, avancem en l'establiment de correlacions entre els diferents models animals de DM1 (ratolins i mosques) per determinar objectius terapèutics útils per als diferents trastorns del cervell DM1. Finalment, com que s'ha demostrat la utilitat del model DM1 de mosca basada en l'SNC per fer el cribratge de molècules químiques amb èxit, es va utilitzar per augmentar el panel de candidats a provar en el model del ratolí, i ens vam centrar en una avaluació específica de compostos amb la capacitat ja prevista per creuar la barrera hematoencefàlica. Els resultats obtinguts en aquest projecte van permetre la identificació de dos compostos, el metilfenidat i la mirtazapina, per alleujar els dèficits neuropsicològics progressius i la neurodegeneració observada en models animals de DM1.

2. Resultats

1. El model de ratolí deficient en el gen *Mbnl2* (*Mbnl2* KO) és rellevant per a les alteracions de l'SNC associades a DM1. Específicament, els ratolins joves, mascles i femelles, que no tenen aquest gen mostren desregulació de l'activitat circadiària, símptomes depressius i dèficits cognitius. No obstant això, en els ratolins mascles aquestes alteracions semblen més específiques, ja que no estan relacionades amb els

canvis en activitat locomotora. A més, trobem que la manca de funció del gen *Mbnl2* va induir alteracions cognitives i afectives progressives en ratolins que es van associar amb hiperactivació del sistema dopaminèrgic en l'escorça prefrontal medial, inclòs un augment en els nivells extracel·lulars de dopamina, augment de l'expressió dels gens de *Dat*, *Drd1* i *Drd2*, i pertorbacions profundes en l'activitat neural i microgliosi en l'escorça prefrontal medial i l'hipocamp.

2. Es van generar amb èxit diferents línies de *Drosophila* en què es va buscar imitar un aspecte central de la DM1: l'expressió de repeticions tòxiques (expansió CTG) i recrear la manca de funció de *muscleblind* endogen (silenciament d'MBL). Aquests aspectes es van induir selectivament en diferents tipus de neurones per observar-ne l'efecte tant a escala cel·lular com funcional. Les diferents línies generades de *Drosophila* són rellevants per a les alteracions en SNC en pacients amb DM1. En concret, diferents fenotips funcionals (vol, supervivència, escalada) van mostrar en la majoria de casos un empitjorament, fet que confirma una forta implicació de la toxicitat de l'expressió d'una expansió CTG o la interferència d'MBL en aspectes funcionals controlats pel cervell. De manera molt interessant, estudis a escala cel·lular, histoquímica i metabòlica de l'expressió d'expansions CTG en neurones dopaminèrgiques de *Drosophila* van reproduir en gran manera el procés de neurodegeneració i atròfia cerebral que presenten els pacients.

3. Es van determinar amb èxit diferents biomarcadors relacionats amb neurotoxicitat i neurodegeneració en *Drosophila*. Específicament, l'expressió d'expansions CTG o silenciament d'MBL en neurones dopaminèrgiques provoca una desregulació important del metabolisme energètic: els nivells d'ATP i de glucosa estan significativament disminuïts, igual que s'ha detectat per tomografia d'emissió de positrons en els lòbuls temporal i frontal de pacients amb DM1. S'han identificat marcadors addicionals interessants implicats en processos d'inflamació i d'estrès oxidatiu, així com de processos degeneratius específics i alteracions en la neurotransmissió (nivells baixos) que no només afecten el sistema dopaminèrgic.

4. Per tal de trobar noves dianes terapèutiques, es va fer un cribratge d'alt rendiment *in vivo* dels 3.805 fàrmacs continguts en les quimioteques Pfizer, Prestwick, GreenPharma, Otava i SPO Life Chemicals utilitzant un fenotip de mort pupal en *Drosophila* provocat per la expressió d'expansions CTG. Es van obtenir 61 *hits* (1,6%

de compostos), que van oferir un increment significatiu del naixement de mosques adultes. Una anàlisi global dels resultats obtinguts després del cribratge en mosques va mostrar que una fracció important dels *hits* (18%) tenen a veure amb la modulació de l'activitat dels grups de neurotransmissors principals: glutamat, GABA, dopamina i serotonina. Això va permetre la identificació i validació de dos compostos, el metilfenidat i la mirtazapina, com a potencialment útils per alleujar els dèficits neuropsicològics progressius i la neurodegeneració observada en models animals de DM1.

5. Estudis conductuals, bioquímics i moleculars en ratolins Mbnl2 KO van mostrar que el tractament crònic amb metilfenidat reverteix els dèficits de comportament, els canvis en l'expressió dels gens *Dat* i *Drd2* específicament, i l'augment en l'expressió de la micròglia proinflamatòria en l'escorça prefrontal presents en aquest model d'alteracions de l'SNC en DM1.

6. Per tal de crear un model animal de neurodegeneració específica en les àrees relacionades amb les alteracions conductuals (escorça frontal i hipocamp), es va desenvolupar una nova línia de ratolí condicional *knock-out* que no té el gen *Mbnl2* selectivament en les neurones glutamatèrgiques del cervell anterior (NEX-CKO). Aquest nou model de ratolí recapitula les alteracions cognitives i afectives observades en la patologia de la DM1. A més, aquests ratolins mostren neurodegeneració i proliferació de la micròglia a la zona subgranular del gir dentat i una desregulació de l'mRNA dels receptors histaminèrgics de tipus H1 i serotoninèrgics de tipus 1A en l'hipocamp.

7. Les dosis baixes d'un antipsicòtic atípic, la mirtazapina, van poder revertir les alteracions cognitives i afectives observades en ratolins NEX-CKO en prevenir la neurodegeneració i la proliferació de la micròglia a la zona subgranular del gir dentat, on té lloc la neurogènesi. La mirtazapina també va revertir la desregulació de l'mRNA dels receptors histaminèrgics de tipus H1 i serotoninèrgics de tipus 1A en l'hipocamp.

3. Rellevància i implicacions futures

Actualment no existeix cap tractament efectiu per als trastorns neuropsicològics associats a la DM1. En el procés de recerca de nous candidats terapèutics, una eina molt poderosa és l'ús de models per a la DM1 en *Drosophila melanogaster* i en ratolins deficients del gen *Mbnl2* que recapitulen específicament les alteracions de l'SNC associades amb DM1. En concret, hem identificat que una diana important són les neurones dopaminèrgiques i s'han proposat fàrmacs coneguts per al reposicionament en DM1, la qual cosa s'explorarà en col·laboració amb la indústria d'aquest sector, per exemple l'empresa SOM Biotech. A més, el projecte ha proporcionat dos objectius farmacològics nous, el metilfenidat i la mirtazapina, com a possibles tractaments per a les alteracions cognitives i afectives experimentades pels pacients amb DM1. Aquests resultats proporcionen un nou objectiu farmacològic per al tractament de la DM1 i revelen nous mecanismes d'acció per a aquests efectes, de manera que s'obren noves vies per a una orientació terapèutica més completa de la patologia de la DM1.

També ha estat important la detecció d'una reducció significativa de la producció d'ATP en neurones que expressen els RNA tòxics o que tenen silenciada l'expressió de *muscleblind*. És molt probable que la generació d'energia insuficient contribueixi a la reducció en el nombre de neurones dopaminèrgiques en el cervell d'aquests models, de manera que investigar l'origen d'aquesta reducció i suplir el dèficit energètic poden constituir dianes terapèutiques importants en el tractament de la neurodegeneració. En aquest sentit, continuarem amb la investigació sobre suplementos nutricionals que puguin rescatar aquests dèficits, per exemple suplementos d'ATP, d'una manera semblant a la nostra col·laboració amb l'empresa MyoGem Health en el desenvolupament del suplement Myo-DM per a pacients amb DM1.

4. Bibliografia

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 (enviat).

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

Dopamine system dysfunction contributes to myotonic dystrophy neurological phenotypes.

(En preparació).

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 preparació)