



Fundació
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM
Malalties neurodegeneratives



TEST PRECLÍNIC DE COMPOSTOS QUÍMICS CONTRA ELS EFECTES TÒXICS DE LA HUNTINGTINA MUTANT EN MODELS DE RATOLÍ DE LA MALALTIA DE HUNTINGTON

Rafael Vázquez Manrique

Hospital Universitari i Politècnic La Fe València

1. Resum del projecte

Moltes malalties neurodegeneratives, com ara l'esclerosi lateral amiotròfica, la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson i la malaltia de Huntington (MH), mostren trets fenotípics que fan que siguin fàcils de diferenciar clínicament. No obstant això, mostren una característica comuna notable: la presència d'agregats de proteïnes en les neurones. Encara no és clar si aquests agregats són causa o conseqüència de la malaltia. Però independentment de la seva naturalesa (és a dir, si són causa o conseqüència) l'acumulació d'aquests agregats desvia recursos que d'una altra manera s'utilitzarien per esmorteir el mal funcionament de proteïnes, el qual ocasiona deteriorament cel·lular. Tots els organismes vius mostren, de forma natural, una acumulació d'agregats de proteïnes dependent del temps. No obstant això, en les malalties esmentades anteriorment la taxa d'agregació de proteïna augmenta dramàticament a causa principalment de la presència de molècules mutants propenses a l'agregació, que sovint són hereditàries. La dinàmica dels processos d'agregació té un impacte en diverses funcions cel·lulars clau (transport intracel·lular, funció sinàptica, etc.) per a la modulació de la taxa d'acumulació d'espècies tòxiques. Encara que aquestes molècules mutants són majoritàriament responsables del fenotip d'agregació, alguns gens modificadors poden modular la progressió de l'agregació. Com que l'activitat de molts d'aquests gens modificadors és susceptible de ser regulada per compostos químics, això fa que sigui possible influir des de l'exterior en la taxa d'agregació i la progressió de la malaltia. La nostra hipòtesi és que hi ha molts gens protectors desconeguts i que també hi ha compostos químics que es poden activar per protegir la cèl·lula de molècules tòxiques. En aquest sentit, hem recollit dades que suggereixen que els activadors d'AMPK són capaços d'alleujar els fenotips presents en models de dues malalties neurodegeneratives, de Huntington i de Lafora (una epilèpsia mioclònica progressiva que acumula poliglucosans insolubles i proteïnes en el cervell i altres teixits, i que resulta fatal). Per exemple, activadors d'AMPK són capaços de reduir el deteriorament cel·lular en models murins i de *C. elegans* de l'MH. A més, els activadors d'AMPK són capaços d'alleujar el fenotip de les cèl·lules dels pacients i dels models murins de la malaltia de Lafora. D'altra banda, creiem que l'ús d'estratègies per pal·liar el mal funcionament de les proteïnes i l'estrès de reticle endoplasmàtic (ER) podria ser beneficiós per a l'MH i la malaltia de Lafora (observació personal). Aquestes dades suggereixen que existeixen mecanismes comuns pels quals les cèl·lules sobreviuen a les dues patologies, i que això pot aplicar-se a altres malalties

neurodegeneratives. L'objectiu general d'aquesta proposta és consolidar el nostre coneixement sobre els beneficis de l'activació de l'AMPK i també investigar quins són els mecanismes subjacents a aquests efectes. L'AMPK es un regulador mestre de l'homeòstasi energètica cel·lular, i també una estratègia terapèutica en la malaltia de Huntington. L'AMPK pot mantenir els nivells energètics, però també és capaç de reaccionar a estressos cel·lulars de diversa naturalesa, com el que indueix la huntingtina mutant (mHtt). Aleshores, la nostra hipòtesi es que si activem l'AMPK en mamífers es reduirà la toxicitat cel·lular causada per mHtt i, per tant, atacarem l'arrel de la causa de la malaltia. Aquesta reducció de la toxicitat seria causada per l'activació de l'autofàgia i per mecanismes col·laterals, com la reducció de la inflamació. Aquesta anàlisi l'hem feta sobre ratolins zQ175, que són un model de la malaltia que expressa al voltant de 190 triplets CAG al primer exó de la huntingtina. Aquests rosegadors resumeixen magníficament la neurodegeneració que s'observa en els humans. Aquest objectiu es pot subdividir en tres objectius principals:

1. Testar fàrmacs que poden alleujar fenotips relacionats amb l'MH en models de la malaltia en *C. elegans*. Utilitzem una soca de *C. elegans* que expressa 40 poliglutamines (poliQs, 40Q) en cèl·lules musculars, que mostra un fenotip d'agregació de poliQs dependent de l'edat. Cerquem activadors AMPK i molècules que alleugen l'estrès de l'ER, que redueixen o retarden la formació d'agregats. Com a activadors d'AMPK vam provar metformina, trehalosa, resveratrol, MVR1316, propranolol i epigallocatequina 3-O-gal·lat.
2. Assaig preclínic de metformina (activador d'AMPK) i reductors de l'estrès en l'ER en un model murí de l'MH . Assajarem aquests compostos, tant sols com en combinació, per aturar o retardar el progrés de la malaltia en aquests ratolins. Com a prova de concepte iniciarem el tractament amb metformina, un activador d'AMPK àmpliament utilitzat en el tractament de la diabetis tipus 2. A continuació, utilitzarem els compostos més eficaços provats en la part 1. Se subministraran aquests compostos a ratolins de tres mesos i el tractament s'allargarà durant tres mesos. La progressió de la malaltia es mesurarà després de tres mesos de tractament utilitzant proves de comportament estàndard. Finalment investigarem la presència d'agregats i signes de degeneració i mort cel·lular en les mostres *post mortem* de cervells de rosegadors.

2. Resultats

Objectiu 1. Treball amb models invertebrats

Per fer un primer assaig de les substàncies hem utilitzat el model de toxicitat de poliglutamines (poliQs) en cucs nematodes *C. elegans* del laboratori del Dr. Morimoto (40Q::YFP a cèl·lules musculars). Però, a més a més, vam decidir crear el nostre propi model de toxicitat de poliQs en cèl·lules neuronals de *C. elegans*. Això va ser perquè el debat sobre si els agregats són causa o conseqüència de la malaltia es va decantar cada vegada més cap a la conclusió que són una resposta cel·lular per sobreviure, i no una causa de toxicitat. Per tant, creiem que un model neuronal proporcionaria un nivell de funcionalitat extra que el model del Dr. Morimoto no pot aportar. El nostre model consisteix en una construcció que expressa 112 triplets CAG en pauta amb una proteïna fluorescent, TdTomato, en neurones mecanosensorials. En aquest model vam fer proves amb els diversos activadors d'AMPK amb resultats molt positius. Vam investigar les substàncies següents: metformina, fenilbutirat, trehalosa, MVR1316 (un compost sintètic activador d'AMPK proporcionat per la Dra. Ana Castro, de l'Institut de Química Mèdica, CSIC, Madrid), salicilat i bedaquilina (fàrmac que s'empra en el tractament de la tuberculosi).

A més del treball de rastreig de fàrmacs en *C. elegans*, vam fer estudis per comprovar potencials mecanismes d'acció d'aquestes substàncies. Per exemple, ja hem comprovat en un treball anterior que l'efecte neuroprotector de la metformina en cucs estressats per poliQs és a causa, en gran mesura, de l'enzim AMPK, ja que mutants que no tenen l'activitat d'aquesta molècula no són capaços de ser rescatats per aquesta substància (Vázquez-Manrique *et al.*, 2016, Hum Mol Genet). Seguint aquesta lògica també hem comprovat que el salicilat necessita l'activitat d'AMPK per exercir la seva funció protectora.

Com dèiem abans, a més del nostre model de poliQs (112Q::TdTomato), hem emprat el model de toxicitat de poliQs en cucs nematodes *C. elegans* del laboratori del Dr. Morimoto (40Q::YFP) en cèl·lules musculars per investigar si la metformina és capaç de modificar el patró d'agregació, i hem comprovat que la metformina és capaç de reduir els agregats en aquests cucs i que, a més, aquesta agregació és dependent d'AMPK i de l'autofàgia. Per testar que la metformina necessita l'activitat d'AMPK introduïm un al·lel mutant d'AMPKα (*aak-2*) en cucs que expressen 40Q (40Q; *aak-2*). Quan vam

testar la metformina en aquests cucs l'efecte reductor de cossos d'inclusió no es produïa. A més, quan incloïem en l'assaig cloroquina, un inhibidor del flux de lisosomes necessari per a l'autofàgia, vèiem que el rescat per la metformina tampoc no es produïa, motiu pel qual es confirma que la metformina activa l'autofàgia.

D'altra banda, una vegada que sospitem que MVR1316 activa AMPK, continuem indagant en el potencial mecanisme de neuroprotecció exercit per aquest compost. Una de les possibles vies, com hem comentat anteriorment amb l'activació d'aquest enzim per la metformina, és l'activació d'autofàgia. Per detectar l'activació de l'autofàgia recorrem a una soca de cucs que expressen un transgèn, consistent en el gen homòleg d'LC3, LGG-1, implicat en els primers passos d'autofàgia, fusionat en pauta amb dues proteïnes fluorescents homòlogues a GFP, anomenat DFP-LGG-1 (de l'anglès *dimeric fluorescent protein-LGG-1*). Quan l'autofàgia s'activa, LGG-1/LC3 pateix un procés de tall per proteases, necessari per al començament de la formació d'autofagosomes. Els productes d'aquest tall es poden seguir per transferència Western i ens donen una mesura directa del grau d'activació de l'autofàgia. Emprant aquests animals, vam observar que MVR1315 és capaç d'activar l'autofàgia, ja que indueix l'aparició dels productes de DFP-LGG-1 detectats per transferència Western. A més, també observem que la metformina és capaç d'induir aquest processament de DFP-LGG-1, cosa que dona suport a la nostra hipòtesi explicada més amunt que aquesta substància activa l'autofàgia, mitjançant l'activació d'AMPK.

Objectiu 2. Treball amb model de ratolins de l'MH, zQ175

L'objectiu principal del projecte sempre va ser l'assaig preclínic en ratolins model de l'MH. El primer que vam fer, durant la primera anualitat del projecte, va ser posar a punt el model de ratolí zQ175. Per a això vam fer una sèrie d'experiments de comportament, que ens aportaven dades funcionals dels ratolins control i del model de l'MH. A més, hem posat a punt una sèrie de marcadors moleculars, després de sacrificar els animals: marcadors d'inflamació (GFAP i IBA1), la mateixa huntingtina mutant (mHtt), una diana d'AMPK (pACC), el factor neurotròfic BDNF i un marcador d'autofàgia (p62). Tots aquest biomarcadors van mostrar que el fet d'activar AMPK redueix els fenotips de l'MH (reducció de la inflamació, reducció d'mHtt agregada, augment de BDNF, etc.).

Respecte als tests de comportament, inclouen el test del cilindre giratori (*rotarod*), en el qual els ratolins són sotmesos a un desafiament d'equilibri en un cilindre que gira i en el qual s'han de mantenir. Aquest experiment ens aporta dades sobre la capacitat motora dels animals. Una altra prova motora és l'assaig de Beam Balance, en què els animals han de passar per una sèrie de passarel·les de diferent amplada en què la dificultat augmenta progressivament. Finalment els animals són sotmesos a una prova d'estrès, que els mesura l'estat anímic. És la prova anomenada Tail Suspension, que consisteix a subjectar els animals per la cua, amb el cap cap avall, i es mesura el temps en què els animals lluiten per alçar-se. Quan un ratolí està decaigut, passa més temps sense intentar incorporar-se que un animal sa.

Emprant aquestes tècniques, hem assajat diverses substàncies amb capacitat per activar AMPK en els nostres ratolins model zQ175: metformina, trehalosa, resveratrol, MVR1316, propranolol i epigallocatequina 3-O-gal·lat. El primer compost que vam proposar en la memòria inicial, la metformina, ha resultat una substància amb una capacitat neuroprotectora sorprenent (Sanchis *et al.*, *Experimental and Molecular Medicine*, en premsa).

D'entre aquests compostos destaca MVR1316, que és un dels que presenta una major capacitat d'activar AMPK en cultius cel·lulars (100 vegades més que la metformina). A més, pot exercir una enorme capacitat de neuroprotecció en cucs nematodes *C. elegans*, estressats per poliQs, com els emprats en aquest projecte. Però MVR1316 presenta una capacitat moderada de rescatar la coordinació motora dels ratolins zQ175. Per quin motiu pot ser això, quan les expectatives eren tan altes? Nosaltres creiem que és un efecte de la baixa capacitat de solubilitat en aigua de l'indol MVR1316. Això podria fer que la biodisponibilitat d'aquest compost fos molt baixa i que el lleuger efecte protector observat en ratolins sigui perquè molt poca d'aquesta substància va arribar al cervell dels animals. Pel que fa a aquest problema, la nostra col·laboradora, la Dra. Ana Castro de l'IQM (CSIC, Madrid), ha generat una nova versió bàsica d'MVR1316 que sembla més soluble. Tot i que els experiments es troben en una fase preliminar, esperem que podrem continuar desenvolupant aquests derivats indòlics gràcies a la concessió d'un projecte de la Fundació Ramón Areces (CIVP19S8119).

Estudi observacional en pacients amb l'MH

A més d'aquests objectius traçats en la memòria original, durant la segona anualitat d'aquest projecte ens va sorgir la possibilitat de dur a terme un estudi amb dades d'una base de dades de pacients amb l'MH, l'anomenada Enroll-HD (<https://www.enroll-hd.org/>). Enroll-HD és un estudi clínic observacional d'àmbit mundial que recull dades de pacients amb l'MH i de controls sans i que inclou dades molt estandarditzades d'aspectes tan diversos com la genètica dels pacients, la seva capacitat motora, cognitiva i psiquiàtrica i la medicació (tant relacionada amb l'MH com amb altres malalties).

Com que la diabetis de tipus 2 està molt estesa a escala mundial i una immensa majoria d'aquests pacients pren metformina per tractar aquesta condició, vam pensar que una proporció de pacients amb l'MH es podria estar medicant amb aquesta substància i que, per tant, es podria fer un estudi de com es comportaven respecte dels pacients amb l'MH que no prenen el fàrmac. Emprant el programari R vam fer un estudi estadístic de la capacitat cognitiva dels pacients amb l'MH que prenen la substància respecte dels que no. Ja que la diabetis de tipus 2 és una malaltia que té un impacte molt negatiu en el sistema nerviós, vam fer servir la diferència de capacitat cognitiva dels controls sans amb i sense diabetis de tipus 2 per restar-la a la dels pacients amb l'MH. La diferència d'aquesta resta i de la presa de metformina havia de donar-nos una idea de quant millorava, si ho feia, la capacitat cognitiva dels pacients amb l'MH quan prenen aquesta substància. Per testar la capacitat cognitiva dels pacients i controls vam emprar les puntuacions dels tests de capacitat cognitiva descrits en Enroll-HD: *verbal fluency*, Stroop Interference, Symbol Digit Modalities, tests de Trail Making, Stroop Word Reading i Stroop Color Naming Test. A més, vam fer servir una variable que engloba tots aquests test, el Cognitive Score. L'anàlisi estadística va incloure com a covariables l'índex de pes corporal, l'estatus educacional, el sexe i l'edat dels participants, totes elles variables que poden interferir en el resultat. El resultat d'aquesta anàlisi de regressió ens va mostrar que en efecte les persones amb l'MH que prenen metformina per tractar la seva condició de diabètics de tipus 2 en general mostraven millors puntuacions en els diversos tests cognitius. Tots aquests resultats estan publicats a Hervás *et al.*, PLoS ONE (2017). Creiem que aquestes dades són un suport fonamental per als nostres experiments preclínic emprant metformina i que donen suport a la idea de fer un assaig clínic emprant

aquesta substància. L'any 2017 vam obtenir finançament per fer aquest assaig clínic (PI17/00011), que actualment està en marxa.

3. Rellevància i implicacions futures

El més rellevant del nostres resultats és que hem demostrat que AMPK és una diana potent per tractar la malaltia de Huntington i que, a més a més, la seva activitat es pot modular amb fàrmacs. Un d'aquest fàrmacs es la metformina.

Gràcies als resultats d'aquest projecte ha sigut possible consolidar una nova proposta de treball, de l'Institut Carlos III (ref.: PI17/00011; Ministeri de Ciència, Innovació i Universitats), que continuarà el treball del projecte de La Marató. En aquest nou projecte farem un assaig clínic, amb cegament doble, controlat per placebo utilitzant la metformina com a agent terapèutic contra la malaltia de Huntington. La metformina es un fàrmac que s'utilitza a tot el món per tractar la diabetis de tipus 2. És barat i té pocs efectes secundaris. Si aquest estudi funciona, podríem ampliar la cohort i potser en un futur no gaire llunyà podem somiar que els metges podran receptar metformina als malalts de Huntington per retardar les aparicions dels efectes devastadors de la neurodegeneració.

En aquest mateix projecte de l'ISCIII, vam tractar d'assajar l'activació dual d'AMPK amb metformina i salicilat en models de ratolins amb l'MH. D'altra banda, també hem aconseguit un projecte de la Fundació Ramón Areces (ref.: CIVP19S8119), amb el qual investigarem l'activitat d'un dels activadors d'AMPK (MVR1316) que va sintetitzar una col·laboradora nostra, la Dra. Ana Castro (IQM-CSIC, Madrid), també en el model de ratolins de l'MH (zQ175). Atès que aquesta molècula és propietat de la Dra. Castro, podríem sol·licitar la patent d'aquest producte com a medicament contra l'MH.

Pensem que amb aquests dos projectes la continuïtat del treball desenvolupat amb el projecte de La Marató està garantit i esperem posar a l'abast dels neuròlegs noves estratègies terapèutiques que es puguin assajar mitjançant estudis clínics.

A més a més, hem començant les gestions per designar la metformina com a medicament orfe per tractar la malaltia de Huntington. Això obriria la possibilitat

d'atreure l'atenció de la indústria farmacèutica i poder desenvolupar noves teràpies contra aquesta malaltia neurodegenerativa devastadora.

D'altra banda, gràcies als resultats del nostre projecte hem estat capaços d'atreure l'atenció de la Fundació Kaertor (kaertorfoundation.org), que promou la interacció entre grups bàsics, com el nostre, i la indústria farmacèutica, per establir aliances que portin els resultats del banc de treball a l'assaig clínic. Estem pendents d'acabar experiments i assajos per consolidar aquesta col·laboració, per dur els indols sintetitzats per la nostra col·laboradora, la Dra. Ana Castro (IQM-CSIC, Madrid), IND_1316, a assajos clínics.

4. Bibliografia

Publicacions a revistes indexades

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 correspondència.

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 premsa).

* Autors de correspondència.

Manuscrits en preparació

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 correspondència; [#] Contribució 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.

* Autors de correspondència.

Comunicacions en congressos

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 xarxa 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, Àustria (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, València (2019).

Dissertació de treball de màster

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

Estudiant: José Bono Yagüe

Director: Rafael Vázquez Manrique

Nota obtinguda: Matrícula d'honor