



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Efecto del síndrome metabólico provocado por una dieta rica en grasa en ratones APP^{swe}/PS1^{dE9}, modelo experimental de la enfermedad de Alzheimer, y posibles terapias farmacológicas

Miren Ettcheto Arriola

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En las últimas décadas, se ha detectado un aumento exponencial en la prevalencia de la EA. Esta situación, junto al importante problema socio-económico que conlleva, ha fomentado la necesidad de buscar nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad neurodegenerativa. Para ello, teniendo en cuenta la hipótesis amiloidogénica, unos de los objetivos principales es determinar las vías moleculares afectadas por la neurotoxina β A, ya que actualmente el mecanismo por el cual este oligómero provoca la disfunción cognitiva permanece sin esclarecerse completamente.

El cerebro presenta un alto contenido en colesterol (Björkhem & Meaney, 2004) y en los últimos años, se ha evidenciado que el colesterol y su metabolismo juegan un papel importante en la fisiopatología de la EA (Refolo et al., 2000). Estudios tanto clínicos como epidemiológicos han indicado que los pacientes con elevadas concentraciones de colesterol en plasma presentan un incremento de la susceptibilidad para desarrollar esta enfermedad neurodegenerativa (Roher et al., 1999; Solomon et al., 2007), lo cual sugiere que la hipercolesterolemia podría ser un factor de riesgo en la alteración cognitiva leve y demencia (Gamba et al., 2012; Moreira et al., 2012).

Múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo* indican que los niveles de colesterol en el cerebro afectan a la síntesis, aclaramiento y toxicidad del β A (Basak et al., 2012; Moreira et al., 2012; Reed et al., 2014). Los LDLR están involucrados en la unión, internalización y degradación intracelular de las low density lipoproteins (LDL) (Goldstein & Brown, 1974; Goldstein et al., 1976). Ha sido descrito que las mutaciones en genes que codifican el LDLR afectan a la absorción de LDL, produciendo hipercolesterolemia y, por consiguiente, riesgo de parecer enfermedades cardiovasculares, tales como la aterosclerosis

(Brown & Goldstein, 1984), a su vez considerado factor de riesgo para la EA (Xiang, 2017). Por otro lado, diferentes estudios muestran que el alelo $\epsilon 4$ de la lipoproteína APOE, estaría asociado de forma clara tanto a la EAF como a la EAs (Strittmatter et al., 1993; Poirier, 2000), siendo considerado uno de los principales factores de riesgo como se ha comentado en la introducción.

Por todo ello, en el grupo de investigación donde he desarrollado los trabajos correspondientes a la presente tesis doctoral, se llevó a cabo un estudio encaminado a valorar el impacto sobre las capacidades cognitivas de la pérdida de función del gen que codifica el LDLR. Para ello, se utilizaron tanto ratones knockout para LDLR (LDL^{-/-}) como ratones doble transgénicos APP/PS1 como modelo de EAF previamente explicado. Se compararon las alteraciones morfológicas, así como moleculares, en hipocampos de ratones de 6 meses de edad, comparándolos con animales WT. Asimismo, los experimentos se diseñaron con el objetivo de identificar posibles mecanismos involucrados en el declive cognitivo a nivel molecular. Los resultados obtenidos no permitieron observar cambios significativos en la capacidad cognitiva derivados de la pérdida de función de LDLR (Ettchet et al., 2015). Como consecuencia, el grupo se planteó en ese momento centrarse en el estudio del papel de la dieta grasa, y de las complicaciones derivadas de la misma en forma de dislipemias y de resistencia a la insulina, en las capacidades cognitivas tanto del modelo APP/PS1 como de la cepa control.

Actualmente, no se conocen fármacos eficaces para poder curar la EA y/o evitar su desarrollo. Uno de los principales problemas atribuidos a su falta de eficacia es que se administran demasiado tarde, cuando la enfermedad ha deteriorado, significativa e irreversiblemente, las estructuras cerebrales. Es por ello, que surge la necesidad de detectar biomarcadores, fisiológicos o moleculares, en estados presintomáticos de la enfermedad. Ese ha sido

precisamente uno de los objetivos principales del presente trabajo. Para ello, se estudió detalladamente el efecto de una dieta grasa, enriquecida con ácido palmítico, sobre las capacidades cognitivas de los animales APP/PS1 en las fases tempranas del proceso amiloidogénico. Los resultados de ese trabajo experimental se discuten a continuación.

Efectos neuropatológicos de la dieta rica en grasa en el estado presintomático de la EA en el modelo animal APP/PS1

Diversos estudios preclínicos, tal y como se ha comentado anteriormente, indican que tanto la obesidad como la DMT2 son factores de riesgo para el desarrollo de la EA (Kalmijn. et al., 1997; Leboucher et al., 2013; Knight et al., 2014). La ingesta de dieta rica en grasa, considerada modelo experimental de obesidad inducida por la dieta, ha demostrado tener un papel esencial en el desarrollo de la DMT2, sugiriendo que podría estar involucrada en la regulación bioquímica del SNC (Arvanitakis et al., 2014). Además, es sugerente que una de las moléculas que se han asociado más directamente con los procesos de pérdida cognitiva como con la EA, APOE4, parece que también estaría implicada en la regulación de la función del receptor de insulina cerebral (Zhao et al., 2017).

Asimismo, cabe destacar el alto contenido lipídico presente en las membranas de mielina, tanto de colesterol como de ácidos grasos, por lo que la dieta también se ha relacionado con la función cerebral y procesos relacionados con la plasticidad neuronal debido a las alteraciones en la integridad (Molteni et al., 2002). Además, ha sido ampliamente descrito que alteraciones en las vías de señalización de la insulina/IGF-1-AKT y PGC1 α están involucradas en el proceso de mielinogénesis (Camacho et al., 2013; Rafalski et al., 2013).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo por Willette y colaboradores, entre otros, han demostrado la estrecha relación existente entre los depósitos de β A presentes en pacientes de EA y la resistencia a la insulina y condiciones patológicas relacionadas como el síndrome metabólico y la DMT2 (Willett et al., 2015a; Willett et al., 2015b). En referencia a estudios preclínicos realizados, diversas publicaciones han confirmado la relación entre la ingesta de dieta rica en grasa y la resistencia a la insulina, así como perturbaciones en el metabolismo del β A, incremento de la fosforilación de TAU y declive cognitivo (Takeda et al., 2011; Takalo et al., 2014). Sin embargo, hay estudios que han puesto en duda esta teoría demostrando que el declive cognitivo observado en diversos modelos animales de la EA tras la ingesta de dieta rica en grasa es un proceso independiente tanto a la formación de las PS como a la patología de TAU (Leboucher et al., 2013; Knight et al., 2014). Cabe destacar que la controversia generada podría ser debida a la edad de los ratones a la que se han llevado a cabo los estudios, ya que la formación de PS y el declive cognitivo ya comienzan a manifestarse a los 3 meses de edad aproximadamente, tal y como se demuestra en el presente trabajo de tesis doctoral.

Por lo tanto, si los procesos de pérdida cognitiva, en sus formas esporádicas, se pueden asociar a alteraciones de tipo metabólico, parece adecuado utilizar un modelo experimental que combine ambas características. Ha sido justamente ésta la razón por la que se ha optado por producir un estado de sobrepeso y resistencia a la insulina en animales APP/PS1, que a la vez constituyen un buen modelo de pérdida cognitiva. Los ratones APP/PS1 producen cantidades elevadas de β A₁₋₄₂ uno de los factores desencadenantes del comienzo de la enfermedad (Jankowsky et al., 2004), siguiendo la hipótesis amiloidogénica. A su vez, todo ello nos permite poder estudiar potenciales biomarcadores moleculares en fases presintomáticas de la enfermedad.

Los resultados de este estudio muestran que el efecto de la dieta en los ratones APP/PS1 a 3 meses de edad provoca una alteración significativa de los parámetros metabólicos analizados. En primer lugar, los pesos de los ratones no mostraron cambios significativos respecto al genotipo, pero sí respecto a la dieta. Además, nuestros resultados han demostrado que la ingesta de la dieta rica en grasa provoca una disminución de los niveles proteicos tanto de PGC1 α como de EDI, acompañado de un incremento de la formación de PS, así como alteraciones en la vía no amiloidogénica en el hipocampo de ratones de 3 meses de edad. Por el contrario, no se detectaron alteraciones en parámetros relacionados con el estrés oxidativo, en moléculas relacionadas con la vía de la insulina ni en la neuroinflamación.

La enzima EDI, como se ha comentado anteriormente, es una proteasa involucrada en la degradación tanto del β A como de la insulina. Ambos compiten por la disponibilidad de la enzima, sin embargo, EDI presenta una mayor afinidad por la insulina (Qiu & Folstein, 2006). Recientes estudios proponen a esta enzima como posible marcador biológico para el diagnóstico de la EA (Jha et al, 2015; Lewczuk et al, 2015). La disminución del contenido de EDI observada en nuestros resultados, en el hipocampo de los ratones APP/PS alimentados con dieta rica en grasa, podría estar asociado a la reducción del proceso de aclaramiento de β A, lo cual sugiere que podría ser uno de los responsables del incremento en el número de PS observado en este grupo (Qiu & Folstein, 2006). Ello puede estar relacionado con que los niveles de ADAM10 mostraron una disminución significativa en el grupo APP/PS1 alimentado con dieta rica en grasa, indicando una reducción de la actividad de la vía no amiloidogénica. Se recordará que ADAM10 es una α -secretasa funcionalmente activa en las células neuronales (Kuhn et al., 2010). Esta observación permite apuntar a cambios en el contenido de ADAM10 como

otro factor responsable en el incremento de la formación de las PS, además de demostrar un incremento significativo del βA_{1-40} tanto soluble como insoluble, así como del βA_{1-42} insoluble. De hecho, se ha demostrado que la activación de la vía no-amiloidogénica debido al incremento de la actividad de ADAM10 tiene una función preventiva tanto en la formación de PS como en alteraciones en el hipocampo, características de la EA (Postina et al., 2004). Asimismo, tanto la actividad transcripcional del gen de la proteína APP, como sus niveles proteicos mostraron un incremento significativo debido al efecto de la dieta, sugiriendo que su detección podría ser un marcador tanto para la EA como para la obesidad. De hecho, Puig y colaboradores sugirieron que la expresión o función de APP podría estar involucrada en la fisiopatología de la obesidad (Puig et al., 2012), además de estar ampliamente descrito el hecho de que tanto el tejido adiposo (Lee et al., 2008; Lee et al., 2009) como las líneas celulares de adipocitos expresan esta proteína (Sommer et al., 2009).

Como se ha comentado previamente, múltiples estudios han sugerido que el estrés oxidativo juega un papel esencial en el desarrollo de la EA, demostrando ser uno de los factores que actúa precozmente favoreciendo la disfunción neuronal y el progreso de la EA en sus fases iniciales (Leuner et al., 2007; Moreira et al., 2007). Durante el envejecimiento la capacidad antioxidante endógena va disminuyendo gradualmente, hecho que se ha observado que se produce de forma más temprana en los pacientes de EA, los cuales presentan niveles más elevados de estrés oxidativo en las estructuras del cerebro (Kim et al., 2006). Asimismo, diversos estudios epidemiológicos han sugerido que la dieta hipercalórica podría contribuir al desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa (Morris et al., 2003; Pasinetti et al., 2007). Por otro lado, múltiples estudios han confirmado que la ingesta de dieta rica en grasa durante un largo periodo de tiempo es suficiente para incrementar los niveles de βA en el modelo de APP/PS1 (Oksman et al., 2006; Julien et al., 2010). Sin embargo,

tanto el efecto producido por la dieta rica en grasa en la fase inicial de la patogénesis β A, así como, el mecanismo a través del cual la dieta modifica los niveles de estrés oxidativo en modelos de la EA permanece sin esclarecerse. No obstante, nuestro estudio no ha mostrado un incremento significativo de los niveles de estrés oxidativo en los ratones APP/PS1 alimentados con dieta rica en grasa, por lo que los datos obtenidos no permiten validar esta hipótesis, en las condiciones particulares del modelo utilizado.

Otra de las incógnitas clave que se quiso esclarecer en este estudio fue si la dieta grasa en ratones APP/PS1 de 3 meses de edad era capaz de alterar la vía de la insulina tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico y, por consiguiente, ser un factor directamente implicado en la pérdida cognitiva, tal y como ha sido previamente demostrado (Chua et al., 2002; Wang et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios significativos en la expresión de ARNm de genes relacionados con la vía de señalización de la insulina en extractos hipocámpales de los ratones APP/PS1 tanto alimentados con dieta normal como con dieta rica en grasa. Acorde con estos resultados, el análisis de las proteínas relacionadas tanto con la vía de la insulina como con la fosforilación de TAU tampoco mostró cambios significativos entre ambos grupos, sugiriendo que las alteraciones presentes en los cerebros de los APP/PS1 debido a la dieta no están asociadas a perturbaciones en estas vías.

PGC1 α es un regulador de la biogénesis y respiración mitocondrial, termogénesis adaptativa, gluconeogénesis, así como de otros procesos metabólicos (Handschin, C., & Spiegelman, 2006). Hay estudios que evidencian que los factores de transcripción como NFR1/2 (factor respiratorio nuclear 1/2) son los responsables de mediar los efectos de PGC1 α en la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales como TFAM (factor a de transcripción mitocondrial), ambas involucradas en la

transcripción y replicación del ADN mitocondrial (Puigserver, 2003), así como a receptores mitocondriales como PPAR γ (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*) (Knutti, 2001).

Qin y colaboradores demostraron por primera vez que la expresión de PGC1 α está disminuida en el cerebro de personas con la EA, sugiriendo que esta reducción podría ser un factor de riesgo para el inicio y desarrollo de la enfermedad (Qin et al., 2009). Además, la preservación de sus niveles podría representar una de las posibles dianas para conferir protección contra la EA (Qin et al., 2009; Austin et al., 2012). Por otro lado, la disminución de esta proteína también ha sido descrita en pacientes con DMT2, siendo asociada a la resistencia a la insulina presente en esta patología (Lowell et al., 2005). De acuerdo con estos datos, también se ha observado que en condiciones de hiperglicemia las células cortico-hipocampales derivadas de embriones Tg2576 inhiben significativamente la expresión de PGC1 α , hecho que coincide con el incremento de β A a través de mecanismos relacionados con la vía no amiloidogénica (Qin et al., 2008; Qin et al., 2009). Por todo ello, cabe pensar que la actividad de PGC1 α podría ser el nexo entre las dos patologías (Besseiche et al., 2015; Katsouri et al., 2011). Además, Cheng y colaboradores describieron el papel esencial que juega PGC1 α en la formación y mantenimiento de la sinapsis en neuronas hipocampales tanto en desarrollo como adultas y regulación del NMDAR (Cheng et al., 2012). Por otro lado, BDNF, del cual se ha descrito ampliamente su participación en procesos de neurogénesis y plasticidad sináptica incrementa significativamente la biogénesis mitocondrial a través del incremento de PGC1 α , NRF1, TFAM y PPAR γ , siendo imprescindible la participación de CREB para llevar a cabo este proceso (Cheng et al., 2012).

Nuestros resultados han demostrado la presencia de un déficit cognitivo significativo en los ratones APP/PS1 de 3 meses de edad, alimentados con dieta grasa, cuando se les compara con los WT. Dicho déficit cognitivo se correlaciona con el incremento tanto de β A soluble e insoluble como de PS, sugiriendo la presencia de un efecto sinérgico entre la dieta y la β A el cual favorece la pérdida cognitiva.

A nivel molecular, nuestro estudio ha mostrado la disminución significativa de p-CREB, proteína involucrada en el proceso de estructuración de la memoria (Kandel, 2012). Ello es debido a la ingesta de dieta rica en grasa, dato que concuerda con la disminución de PGC1 α como se ha explicado previamente. Sin embargo, ni PKA, proteína que activa CREB, ni genes de transcripción temprana relacionados con el proceso de memoria como *Arc* (proteína asociada al citoesqueleto con actividad regulada), *c-Fos* y *Bdnf* fueron modificados por la dieta. Además, los ratones APP/PS1 con dieta rica en grasa mostraron una disminución de la activación de NMDAR2B, lo cual podría estar relacionado con un mecanismo compensatorio debido a la disminución de p-CREB y PGC1 α , ya que ha sido ampliamente descrito que la sobre activación del receptor de NMDA está relacionado con la neurodegeneración (Albin & Greenamyre, 1992), tal y como se ha explicado previamente.

Asimismo, mientras los niveles de PGC1 α mostraron una disminución significativa atribuida a la dieta, no detectamos, sin embargo, cambios en las moléculas reguladas por PGC1 α . Además, tampoco se observaron cambios en neuroinflamación en ratones de esta edad. Una posible explicación para ambas observaciones es que a los 3 meses no ha transcurrido tiempo suficiente como para detectar cambios en la biogénesis mitocondrial, dato que refuerza un estudio previo llevado a cabo por investigadores del grupo en el que he

desarrollado la presente tesis doctoral, concretamente de Pedrós y colaboradores (Pedrós et al., 2014).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que las alteraciones observadas en PGC1 α , p-CREB y β A inducidas por la dieta rica en grasa en ratones APP/PS1 durante las fases iniciales de su desarrollo, en etapas presintomática podrían representar un factor de riesgo tanto para el inicio como para el desarrollo de la enfermedad. Igualmente, los resultados sugieren su posible utilidad como marcadores diagnósticos, así como potenciales dianas farmacológicas, en las fases iniciales presintomáticas del desarrollo de la EA.

Estudio del dexibuprofeno como posible fármaco preventivo en la EA

Basado en los resultados obtenidos en el estudio anterior, donde no se observaron signos de neuroinflamación, evaluamos la efectividad antiinflamatoria del DXI en los ratones APP/PS1 a 6 meses de edad.

Como se ha comentado en la introducción, hay numerosos estudios que demuestran que la administración crónica de AINES reduce el riesgo de desarrollar la EA (Côté et al., 2012; Van Dam et al., 2008). Con relación a esta hipótesis, en el presente estudio se ha demostrado que el tratamiento crónico del DXI mejora los déficits, tanto cognitivos como de memoria, presentes en los ratones APP/PS1, sugiriendo así que este fármaco podría ser capaz de modificar el transcurso de la enfermedad debido al posible efecto que ejerce en la producción de β A, tanto potenciando su aclaramiento como inhibiendo su agregación, así como inhibiendo la fosforilación de TAU.

La activación glial ha sido descrita como un importante factor responsable de la muerte celular dentro de las enfermedades neurodegenerativas y, en concreto, en la EA (Rojo et al., 2008). Estudios previos han demostrado que se produce una clara activación tanto de los astrocitos como de la microglía, la cual probablemente podría correlacionarse con el déficit cognitivo y la presencia de β A en el cerebro de los ratones APP/PS1, tal y como ha sido sugerido por Ruan y colaboradores (Ruan et al., 2009). Además, la activación de este último tipo celular, y a su vez la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF α , ha sido atribuido a estadios tempranos de la EA, demostrando que los fármacos enfocados a reducir los niveles de TNF α son capaces de mejorar la neuropatología de la enfermedad (Habbas et al., 2015; Ferreira et al., 2014). En el presente estudio, con el objetivo de corroborar el efecto del DXI administrado, se analizaron los niveles proteicos de diversas moléculas involucradas en procesos de neuroinflamación tales como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activada (NF κ B), TNF α y la oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), los cuales mostraron un incremento significativo en los ratones APP/PS1 respecto al grupo WT, incremento que resultó significativamente reducido en respuesta al tratamiento con el DXI. Estos datos concuerdan con la disminución de la astrocitosis reactiva observada en el grupo tratado.

Además, nuestros resultados han demostrado una disminución significativa tanto de β A₁₋₄₂ soluble como insoluble en los ratones tratados con el antiinflamatorio, lo cual se podría traducir en una disminución del número de placas tal y como ha sido descrito por Sánchez-López y colaboradores (Sánchez-López et al., 2017). Esta reducción podría ser atribuida tanto a la disminución de la formación de PS como al incremento del aclaramiento tal y como se ha explicado previamente. En concordancia con estos datos, nuestro estudio ha demostrado que el DXI provoca la disminución de los niveles

proteicos de APP y BACE1 en el hipocampo, además de incrementar los niveles de EDI, aumento observado en los APP/PS1, datos que apoyan la hipótesis de Laird y colaboradores que sugiere que la reducción de BACE1 disminuye la formación de las placas (Laird et al., 2005). Además, aunque inicialmente se creía que únicamente las neuronas expresaban esta enzima, estudios posteriores han demostrado que los astrocitos también son capaces de expresar BACE1, mostrando un incremento en respuesta al estrés (Rossner et al., 2005).

La presencia de ONF formados por la proteína TAU fosforilada es otra de las principales características de la EA, además de las PS (Khachaturian, 1985), tal y como se ha comentado en la introducción.

En el presente estudio se ha demostrado que el tratamiento con DXI provoca una disminución significativa de la fosforilación de TAU en el hipocampo de ratones APP/PS1 de 6 meses de edad. Esta observación es importante ya que su reducción ha sido directamente implicada en el declive cognitivo característico de la EA (Santacruz et al., 2005).

Con el propósito de determinar el mecanismo por el cual el DXI produce la reducción de la fosforilación de TAU se llevó a cabo el análisis de las vías de señalización CDK5 y AKT/GSK3 β , ambas implicadas estrechamente en este proceso (Patzke et al., 2003; Hernández et al., 2010). Los resultados del presente trabajo han permitido observar que la activación de CDK5 vía CDK5/p25 es el principal responsable de la fosforilación de TAU y, por consiguiente, de la formación de ONF en condiciones patológicas (Kimura et al., 2016). Asimismo, recientes publicaciones han indicado que la activación de c-ABL está presente en cerebros adultos que desarrollan enfermedades neurodegenerativas, en respuesta a estrés oxidativo, daño del ADN y procesos

neuroinflamatorios, contribuyendo a la fosforilación de TAU (Jing et al., 2009; Tremblay et al., 2010; Schlatterer et al., 2011). En concordancia con estos datos, nuestros resultados han mostrado que el tratamiento de DXI disminuye la activación tanto de CDK5 y c-ABL, así como la fosforilación de TAU en diversos epítomos, confirmando a su vez la relación entre la disminución de las citocinas proinflamatorias con la reducción de c-ABL.

Como se ha comentado previamente, existe una relación entre la patogénesis de la EA y la alteración de la señalización de la insulina en el cerebro, en la cual la vía de señalización AKT/GSK3 β juega un papel esencial (Liu et al., 2011). De hecho, numerosos estudios han demostrado que la administración de la insulina intranasal mejora diversos aspectos de la cognición (Reger et al., 2006; Reger et al., 2008). Además, Sui y colaboradores han publicado que los oligómeros de β A reducen drásticamente los niveles tanto de p-AKT como de p-GSK3 β (Sui et al., 2015), datos que concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, los cuales demuestran que el DXI provoca un incremento de los niveles de estas proteínas en los ratones APP/PS1. Estos resultados podrían explicar la mejora cognitiva observada en el test de memoria realizado.

La pérdida de memoria ha sido estrechamente relacionada con la disminución de la transmisión sináptica en la cual la sinaptofisina juega un papel esencial (Masliah et al., 2001). Estudios previos por parte de Trinchese y colaboradores han demostrado que la pérdida de memoria y la disminución de la plasticidad sináptica son procesos que ocurren entre los 3-4 meses de edad en los ratones APP/PS1 y ambos se han considerado independientes a la formación de placas (Trinchese et al., 2004). Asimismo, el efecto del DXI en la mejora en el declive cognitivo se podría atribuir por un lado al incremento de la fosforilación de CREB como a la integridad sináptica tal y como ha sido comentado por Teich y colaboradores, sugiriendo que el incremento de los niveles de p-CREB

podría ser una posible estrategia terapéutica para mejorar el declive cognitivo presente en la EA (Teich et al, 2015). Sin embargo, PKA, una de las principales cinasas involucradas en la fosforilación de CREB, no mostró cambios significativos en ratones APP/PS1 de 6 meses, lo cual podría sugerir que el DXI podría incrementar p-CREB a través de BACE1.

En resumen, este estudio sugiere que el DXI podría ser un fármaco potencialmente útil para el tratamiento de EA, proporcionando múltiples beneficios como la disminución de la neuroinflamación y formación de PS, así como de ONF y mejora del declive cognitivo. Por lo que los resultados del presente trabajo de esta tesis doctoral apoyarían la hipótesis de que los AINES, y más concretamente el DXI, podría reducir el riesgo de desarrollar la EA a través de diversos mecanismos, entre ellos la mejora de memoria y cognición observada, la inhibición de TNF α /c-ABL/CDK5/TAU, la activación de la vía de señalización de la insulina y la modulación de BACE1/sinaptofisina (SYP)/CREB.

Estudio de la memantina en el modelo preclínico de mixto de obesidad y EA

Tal y como se ha comentado previamente, múltiples estudios epidemiológicos demuestran que pacientes de DMT2 presentan una mayor incidencia de desarrollar la EA y viceversa (Mejía-Arango & Zúñiga-Gil, 2011; Nazareth, 2017), aunque los mecanismos moleculares subyacentes permanecen sin esclarecerse.

Los resultados observados en el presente estudio demuestran que la MEM mejora significativamente las principales características neuropatológicas de

la EA en ratones APP/PS1 alimentados tanto con pienso convencional como con dieta rica en grasa. Los resultados más significativos son la disminución del número de placas, así como de su tamaño a través de la activación de la vía no amiloidogénica o mediante la inhibición de la vía amiloidogénica y la disminución de los niveles proteicos de APP. Además, se ha observado que el tratamiento mejora significativamente los déficits de memoria y aprendizaje presentes en los animales APP/PS1 sin tratar, proceso que se podría atribuir a la potenciación de la vía de la señalización de la insulina, bloqueo de la proteína fosfatasa tirosina 1B (PTP1B), inhibición de la activación glial, así como al incremento de moléculas relacionadas con la estructuración de la memoria.

Asimismo, cabe destacar que nuestro estudio demuestra que la MEM mejora los parámetros periféricos como la hiperglicemia, resistencia a la insulina, incremento del peso corporal inducidos a causa de la ingesta de dieta rica en grasa en ratones APP/PS1, así como la activación de moléculas relacionadas con la vía de la insulina en hígado.

Con el propósito de evaluar el efecto de la MEM en el metabolismo, inicialmente se controló el peso corporal de ratones WT y APP/PS1 alimentados tanto con dieta rica en grasa como con pienso normal. En los resultados obtenidos se pudo observar una disminución significativa del peso de los ratones tratados con MEM tras la ingesta de dieta rica en grasa, respecto a los no tratados en ambos genotipos. Acorde con estos resultados, los animales APP/PS1 sometidos a dieta grasa, cuando eran tratados con MEM, presentaban niveles de glucosa en sangre comparables a los que se habían alimentado con pienso normal.

Sorprendentemente, este efecto del tratamiento no fue observado en los ratones WT, lo cual indica que la MEM ejerce un efecto en alguna molécula a nivel cerebral, probablemente en el péptido β A, contribuyendo de manera sinérgica, junto con la dieta rica en grasa, al proceso de la resistencia a la insulina presente en los ratones APP/PS1 tras la ingesta de esta dieta. Nuestros datos refuerzan el trabajo publicado por Clarke y colaboradores que defienden que los oligómeros de β A actúan sobre estructuras del cerebro involucradas en procesos de control metabólico, particularmente en el hipotálamo, siendo responsables de la desregulación de la homeostasis de la glucosa, clave en la relación de la EA y DMT2 (Clarke et al., 2015). Curiosamente, aunque hay estudios que demuestran la presencia de NMDARs en órganos periféricos como el páncreas (Di Cairano et al., 2011), nuestros resultados indican, sin descartar la hipótesis anterior, que los efectos periféricos de la MEM observados en este estudio no son mediados por la interacción del fármaco con los NMDARs hepáticos. Ello es debido a que no se han detectado ni niveles proteicos ni expresión de ARNm en tejido hepático de NMDAR. Por consiguiente, en este estudio podemos confirmar la importancia de los antagonistas de los NMDAR en la modulación y mejora de los niveles de glucosa periférica en el modelo preclínico de diabetes, como también ha sido sugerido por diversos autores (Lechin et al., 2009; Marquard et al., 2015; Welters et al., 2017).

Como se ha comentado en la introducción, se ha descrito que la administración temprana de MEM en pacientes con EA es capaz de mejorar el declive cognitivo (Reisberg et al., 2003). Los test de comportamiento realizados han confirmado que el tratamiento con memantina disminuye el ritmo de pérdida de memoria que se observa en los ratones APP/PS1 a los 6 meses de edad tanto en ratones alimentados con pienso convencional como con dieta rica en grasa. Asimismo, el incremento de los niveles proteicos de PKA y p-CREB, la

expresión de *c-Fos* y la presencia de sinaptofisina en la CA3 del hipocampo tras el tratamiento con MEM, apoyan la potenciación de la transmisión sináptica, tal y como se ha relacionado previamente. En el caso de las subunidades de los NMDAR, los datos obtenidos no mostraron cambios a nivel proteico, sin embargo, la subunidad *Nmdar2b* se encontraba significativamente disminuida en respuesta al tratamiento, lo cual concuerda con la hipótesis glutamatérgica, ya descrita previamente en la introducción, y en la que se observa una pérdida de función del receptor NMDA como elemento central implicado en la pérdida cognitiva.

En referencia a la deposición de placas, nuestros resultados han demostrado una disminución tanto del número de placas como su área en respuesta al tratamiento con MEM, datos que se atribuyen a la disminución de APP y BACE1, así como al incremento de ADAM10, tal y como se ha observado en los ratones tratados con DXI previamente explicados. Además, este estudio ha indicado una disminución de la neuroinflamación hipocampal, mostrando una disminución de la reactividad glial, tanto astrocitaria como microglial, además de la reducción de expresión de citocinas proinflamatorias tales como *Il6* o *Tnf α* , proceso que juega un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad, de acuerdo con la hipótesis inflamatoria, ya descrito en la introducción.

En línea con ello, hay que tener en cuenta que cada vez más estudios describen la EA como una enfermedad sistémica donde las lesiones no sólo están localizadas en el cerebro (Morris et al., 2014). Además, se ha descrito la detección de depósitos de β A en diversos tejidos no neuronales como en el corazón, hígado y páncreas (Joachim et al., 1989; Troncone et al., 2016). En base a los resultados obtenidos en este trabajo, sugerimos que el β A sintetizado en el cerebro podría ser el responsable de generar resistencia a la insulina periférica mediante diversas vías tales como la unión a receptores de insulina

hepáticos, inhibiendo de esta manera la vía de la insulina, mediante la unión a receptores periféricos como NMDAR pancreáticos o través de la interacción con el hipotálamo y posterior regulación del hígado. Esta última idea va ligada a los trabajos de Arrieta-Cruz y colaboradores que demuestran que el βA_{25-35} en el hipotálamo interfiere en la regulación del metabolismo de la glucosa, demostrando que juega un papel esencial en su homeostasis (Arrieta-Cruz et al., 2015; Arrieta-Cruz et al., 2016).

Acorde con esta hipótesis, estudios realizados por Zhang y colaboradores demostraron que la inyección intraperitoneal de βA_{42} en ratones WT inducía el incremento de los niveles de glucosa en ayunas y alteraciones de la tolerancia a la insulina, así como de la vía de la señalización de la insulina hepática. Sin embargo, la administración de anticuerpos enfocados a la neutralización del βA en ratones APP/PS1 resultó en la mejora de estos parámetros (Zhang et al., 2013). Por ello, estos resultados sugieren que el βA es necesario para el desarrollo de la hiperglucemia y resistencia a la insulina en ratones APP/PS1, señalando el importante papel neuroprotector de la disminución de este oligómero. Asimismo, estudios recientes por parte de Macklin y colaboradores han confirmado trabajos previos publicados por, entre otros, el grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente tesis, en los cuales se demuestra que las alteraciones observadas en este modelo de EA familiar es previo tanto a la aparición de placas como al declive cognitivo, siendo detectadas, aproximadamente, a los dos meses de edad de los ratones (Macklin et al., 2017).

Los resultados correspondientes a la presente tesis doctoral han indicado que la administración de MEM provoca la activación de moléculas involucradas en la vía de señalización de la insulina en el hígado tales como IRS2. Estudios previos demuestran que la alteración de esta vía juega un papel esencial en el

desarrollo de la DMT2 (Withers et al., 1998; Fröjdö et al., 2009). Valverde y colaboradores demostraron que interferencias tanto en IRS2 como en moléculas reguladas por esta proteína tales como AKT y GSK3 β son uno de los acontecimientos que se lleva a cabo en las primeras etapas de la resistencia a la insulina en hepatocitos (Valverde et al., 2011). Teniendo en cuenta su importante función en el hígado, podemos sugerir que interferencias tanto en IRS2 como en moléculas reguladas por esta proteína tales como AKT y GSK3 β podrían ser uno de los principales eventos que ocurren en ratones APP/PS1 alimentados con dieta grasa. Asimismo, proponemos que el incremento significativo de estas proteínas observado tras el tratamiento con MEM, podría ser el responsable de la mejoría detectada en los niveles de glucosa tras los test de tolerancia.

En línea con esta hipótesis, se ha evidenciado el efecto protector de IRS2 en la regulación de la muerte celular en hepatocitos (Valverde et al., 2004). Por lo que, además de reforzar los datos observados con la MEM, todo ello sugiere que IRS2 podría ser una posible diana para el desarrollo de fármacos para la DMT2 o patologías hepáticas adicionales.

Como se ha comentado previamente, las alteraciones en la vía de la señalización de IRS2 en el cerebro están estrechamente relacionadas con el desarrollo de la EA (Plum et al., 2005). En este trabajo se ha observado el incremento de la activación de esta vía en el hipocampo en respuesta al tratamiento con la MEM, de la misma manera que en hígado. Además, se ha descrito que la administración de insulina central puede mejorar la sensibilidad a la insulina hepática (Obici et al., 2002).

Los ratones deficientes en PTP1B han mostrado tener una mejoría del aprendizaje espacial y retención de la memoria. Ello pone de manifiesto que

PTP1B podría ser una diana farmacológica interesante para restablecer los niveles de actividad de IRS2 (Fuentes et al., 2012). Además, hay evidencias que relacionan a PTP1B con la regulación de la homeostasis de la glucosa y el control del peso corporal. Ello seguramente es debido a que PTP1B puede localizarse de forma particular en el hipotálamo, además de en el resto del cerebro (Banno et al., 2010). En línea con estos estudios, nuestros resultados han mostrado un incremento significativo de los niveles proteicos de PTP1B en los ratones APP/PS1 tras la ingesta de la dieta rica en grasa. La administración de MEM inhibió este efecto de la dieta grasa mejorando las alteraciones observadas con relación a la patología hepática a causa del β A, aunque cabe destacar que en la presente tesis no se han evaluado los efectos de este fármaco en el hipotálamo.

Tal y como se ha comentado previamente, diversos estudios han puesto de manifiesto los beneficios del uso de los antagonistas de NMDAR para el tratamiento de la DMT2 mediante el bloqueo de los receptores pancreáticos (Marquard et al., 2015; Welters et al., 2017). Aunque no descartamos la importancia del páncreas en este proceso, los datos obtenidos sugieren que la modulación tanto cerebral como plasmática del β A a través de la MEM podría ser un mecanismo adicional involucrado en la mejora observada en la sensibilidad de la insulina (Alley et al., 2010; Ito et al., 2017). Además, teniendo en cuenta el papel fundamental que juega el hígado en el aclaramiento del β A plasmático (Tamaki et al., 2006), los efectos beneficiosos de la MEM podrían contribuir, además de a la mejora de la EA, al tratamiento de enfermedades asociadas a hiperglicemia y/o diabetes.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la MEM mejora la resistencia a la insulina en ratones APP/PS1 alimentados con dieta rica en grasa, en parte, a través de la modulación de la vía de señalización de IRS2 hepática y mediante

la disminución de la resistencia insulina cerebral. Además, este trabajo confirma la implicación directa del β A como claro contribuyente tanto en ambas patologías, tanto en la EA como en enfermedades metabólicas, entre ellas la DMT2. Cabe destacar que tanto en la presente tesis como en otros trabajos se ha demostrado la presencia de alteraciones en la regulación de la glucosa periférica y resistencia a la insulina en modelos preclínicos de ratones APP/PS1 y otros modelos experimentales de la EA. Todo ello, lleva a plantearse la interesante cuestión de si el β A favorece y/o contribuye al desarrollo a un nuevo tipo de diabetes periférica. Además, en referencia a esta hipótesis y teniendo en cuenta que el β A juega un papel esencial en el desarrollo de la diabetes, cabe valorar que fármacos enfocados a la disminución del β A cerebral pueden tener un efecto antidiabético, paradójicamente. Por lo que todo ello abre nuevas y sugerentes perspectivas para las enfermedades metabólicas.

En el momento de finalizar la redacción del presente trabajo de tesis doctoral, las nuevas aplicaciones en el campo de la nanotecnología abren la posibilidad de mejorar tanto la administración, como la biodistribución y el efecto terapéutico de la MEM y del DXI. Ello se basa en la generación de sistemas nanoestructurados de liberación controlada con el objetivo de conseguir un mayor efecto a menor dosis y poder evitar en la medida de lo posible, los efectos secundarios de la administración crónica.

En conjunto, los trabajos de la presente tesis doctoral ponen de manifiesto el papel relevante de la insulina y del β A, tanto en el desarrollo como en la evolución de la EA.

