



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA



TESIS DOCTORAL INDUSTRIAL

**EFFECTOS DEL COMPUESTO 4QMn EN  
RATONES zQ175neo COMO MODELO MURINO  
DE LA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA  
DE HUNTINGTON**

MARÍA CARMEN TRONCH MARTÍNEZ

Noviembre 2021

D. José Luis Mullor Sanjosé, CEO de la compañía biotecnológica Bionos Biotech SL.

**CERTIFICA:**

Que la presente memoria, titulada “EFECTOS DEL COMPUESTO 4QMn EN RATONES zQ175neo COMO MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA DE HUNTINGTON”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. María Carmen Tronch Martínez, para su presentación como Tesis Doctoral Industrial en el Programa de Doctorado en Neurociencias de la Universitat de València.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a 15.10.2021.

A handwritten signature in black ink, consisting of the initials 'J.L.M.' in a cursive, flowing style.

Fdo. José Luis Mullor

# AGRADECIMIENTOS

Mi vida ha girado en torno a mi tesis en estos últimos tres años, ahora solo puedo decir gracias.

En primer lugar, a mi director por darme la oportunidad de emprender este camino y formar parte de su equipo de trabajo. Además, a mi supervisora, que me ha guiado a nivel profesional y personal de inicio a fin de este proceso. También a todos aquellos que han puesto su grano de arena.

Mi eterno agradecimiento a mis compañeros de última generación. Empezando por Julia, quien fue la primera luz al final del túnel. Seguida por WidiFlus, con quien he compartido raros viajes al CIPF, me ha salvado de algunos accidentes por las risas y con quien he vivido grandes alegrías y desconciertos con "la vida" y los WB, ¡Pero siempre tuvimos el control de la actitud! Gracias al sabio investigador Joan por todos los consejos, charlas, risas y momentazos que hemos pasado. Y gracias a todos los demás, ¡Qué gran equipo! Todos hemos aprendido a convivir durante tantas horas al día y, lo más importante, a reírnos juntos de ello. Me quedo con vuestras grandes escenas.

A mis amigos, gracias por empujarme al siguiente nivel con los pies en la tierra, sin importar el cómo. Quiero presentar mi mención especial para quienes siempre están ahí: mi viejo amigo Iván y mi mana Paula. Gracias por acompañarme en cada impulso y retroceso y, en particular, por el desarrollo personal juntos.

Gracias a mi familia por decirme lo que no debo hacer, y repetírmelo, en los momentos de crisis y euforia. Por la libertad y las facilidades que siempre me han proporcionado y, sobre todo, por apreciar todo lo que hago.

Endelig, og veldig viktig, tusen takk til kjæresten min. Du har vært motivasjonen min de siste to årene. Jeg beholder alltid din lære og våre turer for å ikke tenke. Takk for at du vokser sammen, deler processen og nyter suksessen med meg. En skål for oss! Etter denne lange ventetiden, jeg kommer snart!

Una historia basada en hechos reales.

# ÍNDICE

---

# ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT .....	1
ABREVIATURAS .....	4
TABLAS .....	7
FIGURAS .....	9
INTRODUCCIÓN .....	12
1. La Enfermedad de Huntington .....	15
1.1 Neuropatología de la enfermedad .....	15
1.2 La proteína Huntingtina.....	16
1.3 Mecanismos patogénicos .....	17
1.4 Aspectos clínicos de la EH y tratamientos actuales .....	18
1.5 Modelos murinos de EH.....	22
1.5.1 Modelos transgénicos N-terminales .....	23
1.5.2 Modelos transgénicos de longitud completa .....	23
1.5.3 Modelos de ratones <i>knock-in</i> .....	24
2. El 4QMn como medicamento huérfano .....	28
2.1 El compuesto Pytren-4QMn.....	28
2.1.1 Composición molecular y estructura .....	28
2.1.2 Estudios <i>in vitro</i> .....	30
2.1.3 Estudios <i>in vivo</i> .....	31
2.1.4 Propiedad intelectual .....	32
2.1.5 Designación de medicamento huérfano.....	32
3. Oportunidad de negocio.....	33
4. Objetivos .....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Preparación del compuesto 4QMn para su posterior administración .....	36
2. Ensayos de toxicidad aguda y crónica en ratones <i>wild type</i> .....	36
2.1 Ensayos para la determinación de dosis límite .....	36
2.2 Ensayos de toxicidad aguda.....	37
2.2.1 Cuantificación de actividad Alanina Transaminasa en plasma .....	38
2.3 Ensayos de toxicidad crónica .....	39
2.3.1 Tinción Hematoxilina-Eosina.....	40
3. Determinación de la presencia de 4Q en tejidos de ratones <i>wild type</i> .....	40
3.1 Primer ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	41

3.1.1	Análisis de la acumulación del 4Q en tejido sólido .....	41
3.2	Ensayo de detección de 4Q en sangre.....	42
3.2.1	Análisis de la acumulación del 4Q en sangre .....	42
3.3	Segundo ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	43
3.4	Tercer ensayo de detección de 4Q en cerebro e hígado.....	43
4.	Crecimiento y mantenimiento de la colonia de ratones transgénicos zQ175neo heterocigotos .....	44
4.1	Cruces para la generación de ratones transgénicos zQ175neo .....	44
4.2	Genotipado por PCR.....	44
4.2.1	Extracción de ADN .....	44
4.2.2	PCR .....	45
4.2.3	Electroforesis.....	45
4.3	Mantenimiento de la colonia .....	45
5.	Caracterización de biomarcadores en ratones zQ175neo heterocigotos.....	46
5.1	Fenotipo .....	46
5.1.1	Pruebas locomotoras .....	46
5.1.2	Peso .....	47
5.2	Expresión génica .....	48
5.2.1	Extracción de ARN a partir de muestras de sangre.....	48
5.2.2	Extracción de ARN a partir de muestras de cuerpo estriado .....	49
5.2.3	Estimación de la calidad y cantidad de ARN .....	49
5.2.4	Retrotranscripción .....	50
5.2.5	RT-qPCR .....	50
5.2.6	Diseño y eficacia de cebadores .....	51
5.2.7	Componentes y programa de RT-qPCR .....	51
5.2.8	Análisis de expresión génica .....	52
5.3	Evaluación de agregados de Huntingtina en el cuerpo estriado .....	53
5.3.1	Inclusión muestras en OCT .....	53
5.3.2	Corte de los bloques de OCT.....	53
5.3.3	Inmunohistoquímica .....	53
5.3.4	Adquisición y análisis de las imágenes .....	54
5.4	Cuantificación de proteínas en tejido murino .....	55
5.4.1	Extracción y cuantificación de proteína total.....	55
5.4.1	Electroforesis en gel SDS-PAGE .....	55
5.4.2	Electrotransferencia.....	56
5.4.3	Inmunodetección .....	56

6. Validación del compuesto 4QMn en ratones zQ175neo heterocigotos.....	58
6.1 Primer experimento piloto.....	58
6.2 Segundo experimento piloto.....	58
6.3 Primer ensayo de eficacia.....	59
6.4 Segundo ensayo de eficacia.....	59
7. Análisis estadístico.....	60
8. Estudio del mecanismo de acción del 4QMn en <i>C. elegans</i> .....	60
8.1 Mecanismo de acción relacionado con AMPK.....	61
8.2 Mecanismo de acción relacionado con <i>Lgg-1</i> y <i>Bec-1</i> .....	62
RESULTADOS.....	64
1. Ensayos de toxicidad aguda y crónica en ratones <i>wild type</i> .....	65
1.1 Ensayos de dosis límite.....	65
1.2 Ensayo de toxicidad aguda.....	66
1.3 Ensayos de toxicidad crónica.....	67
2. Determinación de la presencia de 4Q en tejidos de ratones <i>wild type</i> .....	71
2.1 Detección del compuesto 4Q por UPLC-MS/MS.....	71
2.2 Primera prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.....	72
2.3 Prueba de detección de 4Q en sangre.....	73
2.4 Segunda prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.....	73
2.5 Tercera prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.....	74
3. Crecimiento y mantenimiento de la colonia de ratones transgénicos zQ175neo.....	74
3.1 Cruces para la generación de ratones transgénicos zQ175neo.....	74
3.2 Genotipado.....	75
4. Caracterización de biomarcadores en ratones zQ175neo heterocigotos.....	75
4.1 Fenotipo.....	76
4.1.1 Pruebas locomotoras.....	76
4.1.2 Peso.....	76
4.2 Expresión génica.....	77
4.2.1 Expresión de genes sanguíneos.....	77
4.2.2 Expresión de genes en el cuerpo estriado.....	77
4.3 Evaluación de agregados de Huntingtina en el cuerpo estriado.....	78
4.4 Cuantificación de Darpp32 en el cuerpo estriado.....	79

5. Validación del compuesto 4QMn en ratones zQ175neo heterocigotos.....	80
5.1 Primer experimento piloto.....	80
5.2 Segundo experimento piloto.....	82
5.3 Primer ensayo de eficacia.....	83
5.4 Segundo ensayo de eficacia.....	87
6. Estudio del mecanismo de acción del 4QMn en <i>C. elegans</i> .....	89
6.1 Mecanismo de acción relacionado directamente con AMPK.....	89
6.2 Mecanismo de acción relacionado con <i>Lgg-1</i> y <i>Bec-1</i> .....	89
CONCLUSIONES.....	91
DISCUSIÓN.....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	101
ANEXOS.....	112
1. Valoraciones del fenotipo motor del segundo experimento piloto.....	113
2. Valoraciones del fenotipo motor del primer ensayo de eficacia.....	114
3. Valoraciones del fenotipo motor del segundo ensayo de eficacia.....	115



# RESUMEN / ABSTRACT

## RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es un grave trastorno neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por una combinación de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos. Su causa es la expansión de una secuencia de repeticiones CAG en el gen HTT, que codifica una versión mutada de la proteína Huntingtina (Yapjakis, 2017). Esta secuencia expandida origina cambios conformacionales que propician la formación de agregados tanto citosólicos como nucleares y, con ello, alteraciones intracelulares, toxicidad y pérdida neuronal (Nance, 2017).

La progresión inevitable de la patología resulta en la muerte de las personas con EH entre 5 y 20 años después de la manifestación de sus síntomas (Kay et al., 2017). Actualmente no hay cura para la EH y los tratamientos disponibles sólo pueden aliviar algunos síntomas. Esta situación requiere el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para mejorar significativamente la calidad de vida de las personas afectadas. Bionos Biotech SL. es el único licenciataria de una patente para el desarrollo y explotación exclusiva del compuesto poliamínico 4QMn que podría proteger las neuronas en el contexto de la EH de una manera bidireccional, mediante la eliminación de los radicales de superóxido como catalizador SOD y mediante la eliminación de depósitos de proteínas activando la autofagia.

En la presente tesis se han realizado los primeros estudios preclínicos del compuesto 4QMn en ratones. En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda y crónica en ratones *wild type* para determinar la vía de administración y la dosis máxima no tóxica del compuesto 4QMn. Además, se evaluó su presencia por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectroscopia de masas en diferentes tejidos murinos. El 4QMn mostró un perfil bajo de toxicidad, siendo capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Finalmente, se emplearon ratones transgénicos heterocigotos zQ175neo (cepa #029928 de Jackson Laboratory) para probar los efectos funcionales del compuesto en un modelo murino de la EH que reproduce fielmente la enfermedad humana. Los resultados mostraron que el tratamiento con 4QMn retrasó la pérdida de fuerza y equilibrio característica del modelo en machos y hembras respectivamente. Además, rescató la expresión de *Darpp32* a niveles *wild type* y redujo el número de núcleos con gránulos en el cuerpo estriado de los ratones macho tratados.

## ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a severe autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by a combination of motor, cognitive, and psychiatric symptoms. It is caused by the expansion of a sequence of CAG repeats in the HTT gene, which encodes a mutated version of the huntingtin protein (Yapjakis, 2017). That expanded sequence causes conformational changes that promote the formation of both cytosolic and nuclear aggregates. As a result, intracellular alterations, toxicity, and neuronal loss occur (Nance, 2017).

The inevitable progression of the HD results in the death of people with HD between 5 and 20 years after the manifestation of their symptoms (Kay et al., 2017). There is currently no treatment for HD and available drugs can only alleviate some symptoms. This situation requires the development of new therapeutic approaches to significantly improve the quality of life of affected people. Bionos Biotech SL is the only licensee of a patent for the development and exclusive exploitation of the polyamine compound 4QMn. It could protect neurons in the context of Huntington's disease in a bidirectional way, by eliminating superoxide radicals as a SOD catalyst and by the removal of protein deposits by activating autophagy.

In this thesis, the first preclinical studies of 4QMn in mice have been developed. First, acute and chronic toxicity tests were carried out in wild type mice to determine the route of administration and the maximum non-toxic dose of compound 4QMn. In addition, its presence was evaluated by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 4QMn showed a low toxicity profile, being able to cross the blood-brain barrier. Finally, heterozygous zQ175neo transgenic mice (Jackson Laboratory strain # 029928) were then used to test functional effects in a mouse model of HD that faithfully reproduces human disease. Results showed that the treatment with 4QMn delayed the loss of strength and balance characteristic of this model in males and females respectively. Furthermore, it rescued the expression of *Darpp32* at wild type levels and reduced the number of nuclei with granules in the striatum of treated male mice.

## ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

4QMn: 6-[(4-(4-quinolil)-3-azabutil)]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano acompañado con manganeso.

AEM: Agencia Europea del Medicamento

ALT: Alanina Transaminasa.

BDNF: *Brain derived neurotrophic factor*

BHE: Barrera hematoencefálica.

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe

d: Días

Darpp32: Dopamine- and cAMP- regulated phosphoprotein

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EH: Enfermedad de Huntington

EH: Enfermedades Raras

Fan1: *Fanconi associated nuclease 1*

QGS-UV: Grupo de Investigación de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia

h: Horas

HEAT: Huntingtina, Factor de elongación 3, Proteína fosfatasa 2A

Htt: Proteína Huntingtina

mHtt: Proteína Huntingtina mutada

IG: Intragástrica.

IIS La Fe: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

IN: Intranasal.

IP: Intraperitoneal.

kDa: Kilodalton

KI: *Knock-in*

LDH: Lactato Deshidrogenasa

Mlh1: *MutL homolog 1*

Nefl: *Neurofilament light chain*

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

Pytren-4QMn: 6-[(4-(4-quinolil)-3-azabutil)]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano

RNAi: Interferencia mediada por ARN

SEM: Error estándar de la media

SOD: Superóxido Dismutasa.

UE: Unión Europea

UPLC-MS/MS: Cromatografía Líquida de alto rendimiento y Espectrometría de Masas

WT: *Wild type*.

TABLAS

## TABLAS

Tabla 1. Principales terapias en fases avanzadas de su desarrollo .....	21
Tabla 2. Primer ensayo de dosis límite administrando vía IG .....	37
Tabla 3. Segundo ensayo de dosis límite administrando vía IG .....	37
Tabla 4. Tercer ensayo de dosis límite administrando vía IP .....	37
Tabla 5. Ensayo de toxicidad aguda administrando vía IP .....	38
Tabla 6. Primer ensayo de toxicidad crónica. Administración IP .....	39
Tabla 7 Segundo ensayo de toxicidad crónica. Administración IG .....	39
Tabla 8. Primer ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	41
Tabla 9. Ensayo de detección de 4Q en sangre .....	42
Tabla 10. Segundo ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	43
Tabla 11. Tercer ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	43
Tabla 12. Valoración del fenotipo de los ratones .....	48
Tabla 13. Cebadores directos (D) y reversos (R) para la amplificación de los genes de la sangre y el estriado relacionados con la EH .....	52
Tabla 14. Componentes de los tampones para la realización de los Western Blot .....	57
Tabla 15. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunodetección .....	57
Tabla 16. Primer experimento piloto .....	58
Tabla 17. Segundo experimento piloto .....	59
Tabla 18. Primer ensayo de eficacia del compuesto 4QMn .....	59
Tabla 19. Segundo ensayo de eficacia del compuesto 4QMn .....	60
Tabla 20. Resultados del primer ensayo de dosis límite .....	66
Tabla 21. Resultados del segundo ensayo de dosis límite .....	66
Tabla 22. Resultados del tercer ensayo de dosis límite .....	66
Tabla 23. Resultados del ensayo de toxicidad aguda .....	67
Tabla 24. Resultados del primer ensayo de toxicidad crónica .....	68
Tabla 25. Resultados del segundo ensayo de toxicidad crónica .....	69
Tabla 26. Resultados de la primera prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	72
Tabla 27. Resultados de la prueba de detección de 4Q en sangre .....	73
Tabla 28. Resultados de la segunda prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado .....	74
Tabla 29. Resultados de la tercera prueba de detección de 4Q en cerebro e hígado .....	74
Tabla 30. Valoración de las pruebas locomotoras .....	76
Tabla 31. Expresión de los genes <i>Bdnf</i> , <i>Cnr1</i> , <i>Darpp32</i> , <i>Fan1</i> , <i>Mlh1</i> , <i>Nefl</i> y <i>Pde10a</i> en el cuerpo estriado murino de ratones WT y zQ175neo de ambos sexos .....	82
Tabla 32. Expresión de marcadores en el cuerpo estriado murino del segundo experimento piloto .....	83



FIGURAS

## FIGURAS

Figura 1. Enfermedades Raras analizadas en cada país europeo .....	13
Figura 2. Primeras políticas sobre las Enfermedades Raras .....	14
Figura 3. Neuropatología de la Enfermedad de Huntington .....	15
Figura 4. Esquema de la proteína Huntingtina .....	16
Figura 5. Mecanismo patogénico de la enfermedad de Huntington .....	18
Figura 6. Etapas de la Enfermedad de Huntington .....	19
Figura 7. Ratón heterocigoto de la cepa zQ175neo .....	27
Figura 8. Dibujo de bolas y palos de la estructura cristalina del complejo Mn (II) del compuesto pytren-4Q [Mn(pytren-4Q)] <sup>2+</sup> .....	29
Figura 9. Crecimiento de <i>E. coli</i> deficiente en <i>SodA</i> <i>sodB</i> y de <i>S. cerevisiae</i> deficiente en <i>Sod2</i> con el tratamiento con 4QMn .....	30
Figura 10. Mortalidad (%) de embriones de Medaka obtenida después del tratamiento con Vitamina C (como control positivo) y 4QMn, nombrado Mn-L2 .....	31
Figura 11. Esquema de las reacciones de cuantificación de actividad ALT .....	38
Figura 12. Imágenes representativas de las pruebas locomotoras .....	47
Figura 13. Ejemplo de segmentación de DAPI (A) y FITC (B) .....	54
Figura 14. Niveles de actividad ALT en plasma en el ensayo de toxicidad aguda .....	67
Figura 15. Peso corporal de los ratones del ensayo de toxicidad aguda .....	67
Figura 16. Registro de la supervivencia del primer ensayo de toxicidad crónica .....	68
Figura 17. Peso y relación del peso hepático con el peso corporal .....	68
Figura 18. Supervivencia y peso corporal de los ratones durante el transcurso del segundo experimento de toxicidad crónica .....	69
Figura 19. Valores de actividad ALT en plasma durante el experimento de toxicidad crónica .....	70
Figura 20. Imágenes de la tinción con H-E del hígado representativas de cada grupo de animales del segundo experimento de toxicidad crónica .....	70
Figura 21. Cromatograma representativo de la detección de 4Q (A) y del ruido de fondo (B) en el análisis por UPLC-MS/MS .....	71
Figura 22. Niveles de actividad ALT en plasma tras tiempos cortos de tratamiento .....	72
Figura 23. Gel representativo de la identificación del genotipo .....	75
Figura 24. Peso ratones WT y zQ175neo heterocigotos a lo largo del tiempo .....	77
Figura 25. Expresión relativa de genes relacionados con la progresión de la EH .....	78
Figura 26. Imágenes representativas de la detección de agregados de mHtt .....	79
Figura 27. Niveles de Darpp32 en el cuerpo estriado de ratones WT y zQ175neo heterocigotos de dos años .....	79
Figura 28. Supervivencia (%) de los ratones del experimento piloto .....	80
Figura 29. Peso corporal de los ratones del experimento piloto .....	81
Figura 30. Peso de los ratones del segundo ensayo de eficacia .....	83

Figura 31. Supervivencia (%) de los ratones del primer ensayo de eficacia .....	84
Figura 32. Peso corporal de los ratones del primer ensayo de eficacia .....	84
Figura 33. Valoración de la fuerza de los machos y el equilibrio de las hembras del primer ensayo de eficacia.....	85
Figura 34. Expresión relativa de los genes <i>Darpp32</i> , <i>Nefl</i> , <i>Mlh1</i> y <i>Fan1</i> en el cuerpo estriado de ratones macho .....	85
Figura 35. Análisis de los gránulos en el cuerpo estriado de machos .....	86
Figura 36. Análisis de los gránulos en el cuerpo estriado de hembras .....	86
Figura 37. Niveles de Huntingtina y Darpp32 en el cuerpo estriado de los ratones del primer ensayo de eficacia.....	87
Figura 38. Supervivencia y peso de los ratones del segundo ensayo de eficacia.....	87
Figura 39. Expresión relativa de <i>Darpp32</i> , <i>Nefl</i> , <i>Mlh1</i> y <i>Fan1</i> en el cerebro .....	87
Figura 40. Evaluación de la Huntingtina en el cerebro, hígado y corazón de ratones macho zQ175neo heterocigotos .....	88
Figura 41. Agregados en <i>C. elegans</i> tras el tratamiento con 4QMn.....	89
Figura 42. Agregados en <i>C. elegans</i> tras el tratamiento con metformina y 4QMn .....	90

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

El sector de la salud tiene un papel clave que desempeñar en la economía de la Unión Europea, ya que mantener a las personas sanas y activas durante más tiempo tiene un impacto positivo en la productividad y la competitividad. Además, el sector de la salud contribuye activamente en la mejora de las competencias y en crear puestos de trabajo, ya que emplea a 1 de cada 10 de los trabajadores más cualificados de la Unión Europea (UE) (Gutiérrez-Hernández & Abásolo-Alessón, 2021). En este sentido, las Enfermedades Raras (ER) son una amenaza para la salud de los ciudadanos de la UE dado que son enfermedades potencialmente mortales o crónicamente debilitantes con una baja prevalencia y un alto nivel de complejidad (Post et al., 2021). Las ER son aquellas con una prevalencia particularmente baja; en Europa, las enfermedades se consideran raras cuando no afectan a más de 5 de cada 10 000 personas en la UE (Rodwell & Aymé, 2015). A pesar de su rareza, hay tantos tipos diferentes de ER que millones de personas se ven afectadas en todo el continente (figura 1).

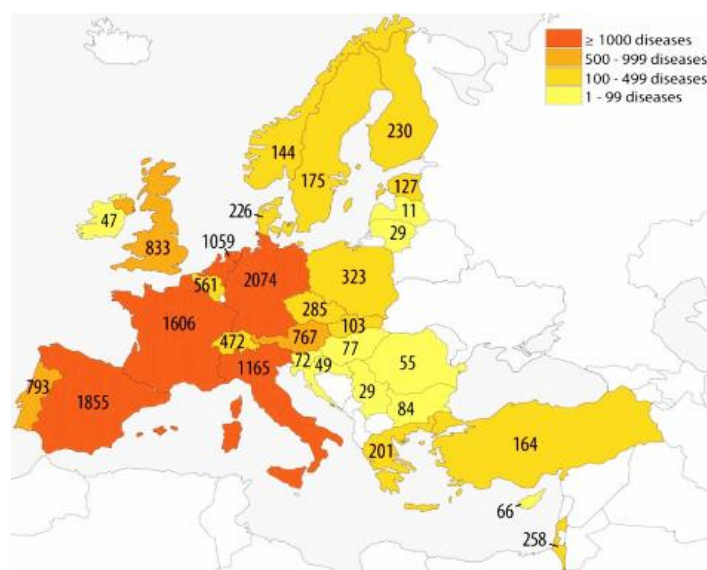


Figura 1. Enfermedades Raras analizadas en cada país europeo. Fuente: Orphanet.

En este contexto, como muestra la figura 2, a finales del siglo XX surgieron progresivamente conceptos políticos e iniciativas en Europa para gestionar este tipo de enfermedades. El Reglamento sobre Medicamentos Huérfanos de 1999 fue el primer texto legislativo europeo sobre las ER, seguido de muchas iniciativas tanto en la UE como en los Estados Miembros. Como consecuencia, se ha mejorado la cooperación europea y dinamizado las políticas nacionales sobre el terreno, aumentando el interés en el desarrollo de medicamentos para aliviar o curar las ER (Rodwell & Aymé, 2015; Williams, 2011)

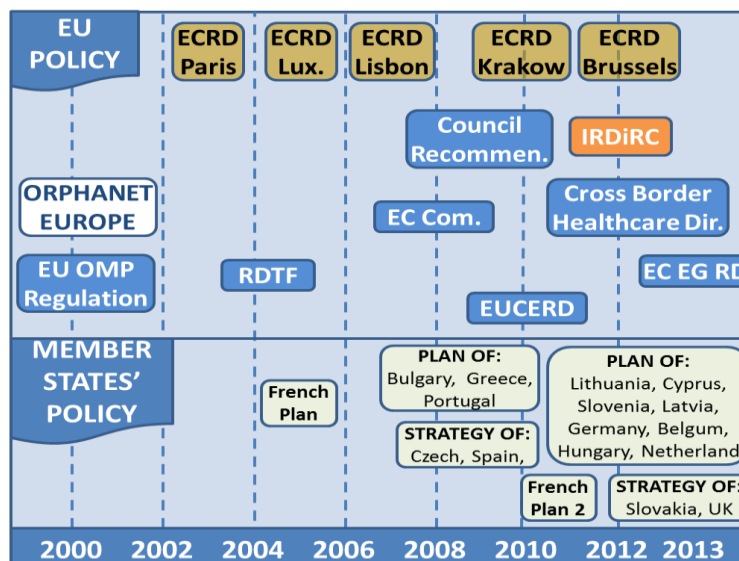


Figura 2. Primeras políticas sobre las Enfermedades Raras. Fuente: Orphanet.

Sin embargo, todavía hay varios desafíos que obstaculizan el progreso de las ER:

1. Dispersión y escasez de experiencia, que desencadena diagnósticos retrasados, erróneos o no diagnósticos. Lo que resulta en deficiencias físicas, psicológicas e intelectuales adicionales, tratamientos inadecuados o incluso dañinos y pérdida de confianza en el sistema de salud (Hossainy, 2009).
2. Dificil acceso a la atención debido a la falta de medicamentos preventivos, preparación para ensayos o alto costo de los tratamientos (Mikami & Sturdy, 2017).
3. *Valley of death* desde la investigación sobre ER hasta soluciones comerciales. El reglamento sobre medicamentos huérfanos, mediante la creación de incentivos económicos para los patrocinadores, fue capaz de fomentar la traducción de la ciencia en terapias para ER. Sin embargo, a pesar de este progreso, los avances publicitarios en la investigación médica todavía no se traducen con suficiente velocidad en terapias aprobadas que llegan efectivamente a los pacientes. Se necesitan asociaciones público-privadas que involucren laboratorios de investigación y la industria farmacéutica (Buckup, 2008).
4. Reconocimiento y visibilidad de las ER. Se ha elaborado una estrategia global coherente para mejorar las políticas de apoyo en los Estados Miembros y desarrollar la cooperación, la coordinación y la regulación a nivel de la UE. Sin embargo, esta área todavía requiere más esfuerzo (Mikami, 2019).

## 1. La Enfermedad de Huntington.

La Enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado clínicamente por movimientos involuntarios y un deterioro progresivo a nivel cognitivo y conductual (Yapijakis, 2017). Se considera una enfermedad rara, ya que su prevalencia se estima en 5 a 10 afectados por cada 100000 individuos en población caucásica, pero durante esta última década ha experimentado un considerable aumento (Kay et al., 2017).

### 1.1 Neuropatología de la enfermedad.

La EH está causada por una expansión de repeticiones del triplete CAG en el gen que codifica la proteína Huntingtina (*HTT*) situado en el brazo corto del cromosoma 4 (Nance, 2017). Esta repetición de trinucleótidos expandida e inestable en dicho gen se traduce como una repetición de poliglutamina en la proteína que codifica. La proteína Huntingtina (*HTT*) contiene un dominio de poliglutaminas (poliQ) que generalmente presenta de 5 a 26 residuos de glutamina en la población sana, mientras que la EH se asocia con 40 o más repeticiones de CAG (figura 3) (Podvin et al., 2019). Las longitudes de 36-39 muestran una penetrancia incompleta, por lo que aquellos que presentan sintomatología clínica lo hacen habitualmente a edad más avanzada. Existen casos denominados “*de novo*” que presentan de 27 a 35 repeticiones, los cuales representan el 10% del total y pueden tener hijos con longitudes de repetición en rango sintomático (Gatto et al., 2020).

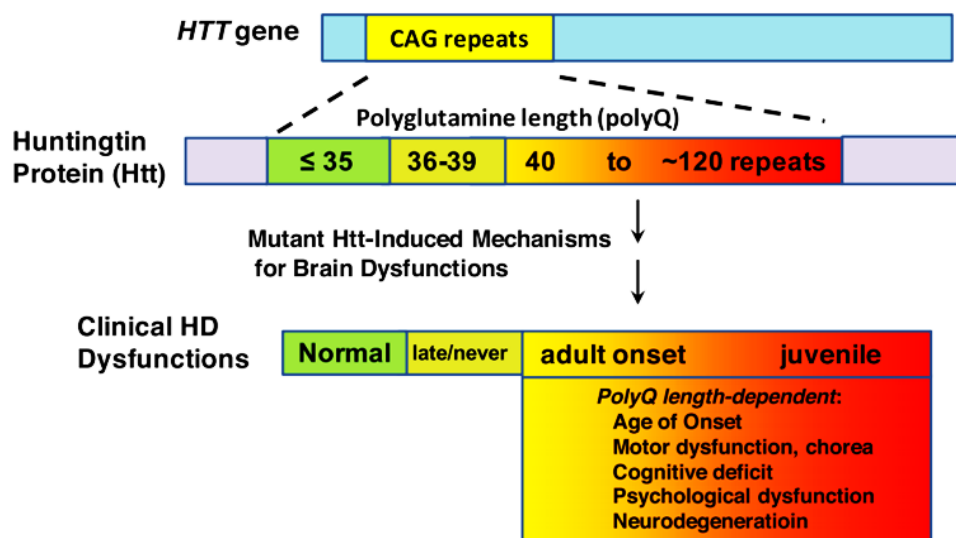


Figura 3. Neuropatología de la Enfermedad de Huntington. Fuente: Podvin et al. 2019.

Esta secuencia expandida codifica una versión mutada de la proteína Huntingtina (mHTT), que origina cambios conformacionales en ella, lo que propicia agregados tanto citosólicos como nucleares y, con ello, alteraciones intracelulares, toxicidad y pérdida neuronal (Nance, 2017). La

EH se caracteriza por una contracción general del cerebro y la degeneración del cuerpo estriado, con la pérdida específica de neuronas espinosas medias. Aunque el estriado parezca ser la región más afectada del cerebro, se han encontrado pacientes con EH que también presentan degeneración cortical regionalmente selectiva, lo que explicaría la heterogeneidad de la expresión clínica (Gatto et al., 2020).

## 1.2 La proteína Huntingtina.

El locus de la Huntingtina abarca 180 kb y consta de 67 exones (Fagerberg et al., 2014). La HTT es una proteína de 380 kDa que presenta una estructura en alfa-hélice compuesta por varias repeticiones de una secuencia consenso llamadas HEAT (Huntingtina, Factor de elongación 3, Proteína fosfatasa 2A, Quinasa TOR1). Las secuencias HEAT son resistentes a la escisión proteolítica proporcionando una función de andamio a la proteína. Los cambios proteolíticos y postraduccionales ocurren en regiones consenso no-HEAT, dando lugar a modificaciones en la conformación de la proteína (Cisbani & Cicchetti, 2012). Un número de caspasas, calpaínas y endopeptidasas contribuyen a la escisión, proporcionando una variedad de fragmentos N-terminales, incluyendo una secuencia corta que codifica el exón 1 de la proteína (figura 4).

La Huntingtina se expresa como dos formas poliadeniladas alternativamente que muestran una abundancia relativa diferente en varios tejidos fetales y adultos. La transcripción más grande es de aproximadamente 13,7 kb y se expresa predominantemente en el cerebro adulto y fetal, mientras que la transcripción más pequeña de aproximadamente 10,3 kb se expresa más ampliamente (Nguyen & Weydt, 2018).

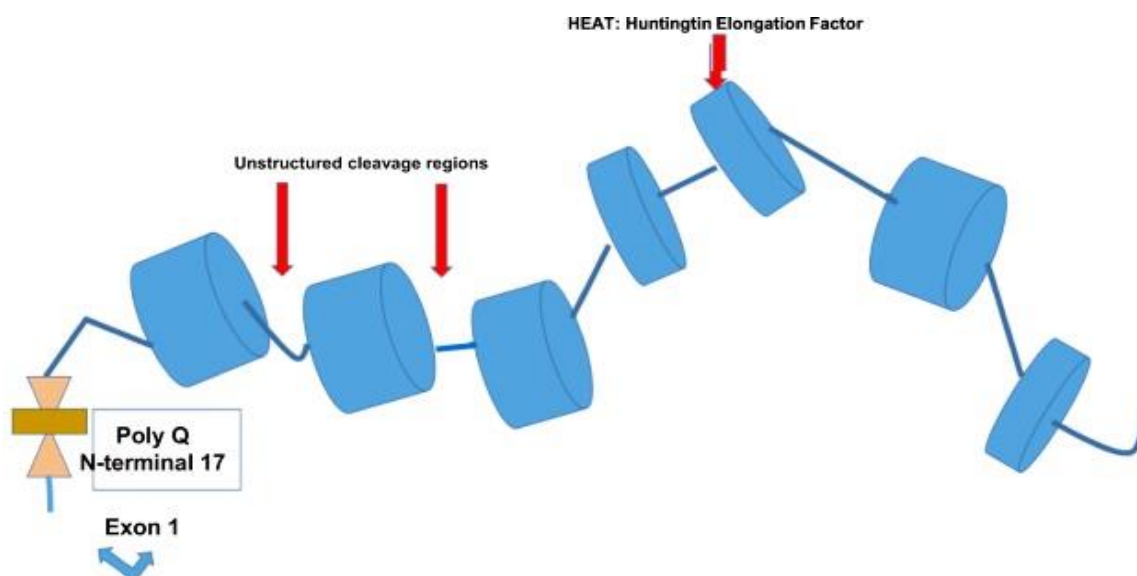


Figura 4. Esquema de la proteína Huntingtina: regiones HEAT y regiones de escisión, expansión de polyQ en N-terminal -17. Fuente: Gatto et al. 2020.



Aunque las funciones completas de la proteína todavía están bajo investigación, son muchas las que se han caracterizado. La HTT participa en el desarrollo cerebral, realizando un papel crucial en la formación de sinapsis excitatorias corticales y estriatales, Además de intervenir en la señalización, proporcionando apoyo neurotrófico y equilibrio de receptores de neurotrofina, así como en el equilibrio de la acetilación/desacetilación de histonas y la activación glial. También regula el proceso transcripcional, la vigilancia de la función mitocondrial y biogénesis, y el transporte axonal de orgánulos por microtúbulos. Finalmente, asimismo, regula las vías de señalización, multimerización de mHTT y autofagia (Cisbani & Cicchetti, 2012; Franco-Iborra et al., 2021; Munoz-Sanjuan & Bates, 2011; Saavedra et al., 2018).

### 1.3 Mecanismos patogénicos.

La mHTT podría desencadenar directamente la patogénesis, o bien la patogénesis podría depender del procesamiento y posterior agregación de la mHTT (Tobin & Signer, 2000). La mayoría de las evidencias sugieren que la EH conlleva predominantemente una ganancia de función tóxica de la conformación anormal de la proteína mHTT (Shao & Diamond, 2007; Tobin & Signer, 2000).

Las características de la patogénesis de esta enfermedad han sido consistentemente descritas. La firma patognomónica de la EH es la presencia de inclusiones nucleares y citoplasmáticas que contienen mHTT, como consecuencia de cambios conformacionales en la proteína inducidos por la longitud de la secuencia poliQ (Nguyen & Weydt, 2018). Por otro lado, la proteína se escinde en varios puntos dando lugar a fragmentos que presentan conformaciones aberrantes, que también causan toxicidad celular. Dicha toxicidad interfiere en la regulación de factores de transcripción, deteriora las vías de energía mitocondrial, altera la homeostasis de las proteínas y aumenta la presencia de agregados, que reprimen muchos factores. Además, afecta al tráfico axonal vesicular, organular y neurotransmisor, lo que induce defectos en la plasticidad sináptica y la activación glial (figura 5) (Gatto et al., 2020).

Los cuerpos de inclusión se encuentran en el núcleo y en algunas regiones citoplasmáticas. La mHTT se transloca hacia el núcleo, donde puede alterar la transcripción de genes y afecta al transporte vesicular (Cattaneo et al., 2005; Sadri-Vakili & Cha, 2006). La translocación nuclear de la proteína mutante incrementa los efectos tóxicos, produciendo finalmente un bloqueo en las rutas metabólicas (Ross & Tabrizi, 2011). Los efectos tóxicos en el citoplasma incluyen la inhibición de chaperonas, proteasomas y autofagia, que pueden causar la acumulación de proteínas mal plegadas y otros componentes celulares (Illarioshkin et al., 2018).

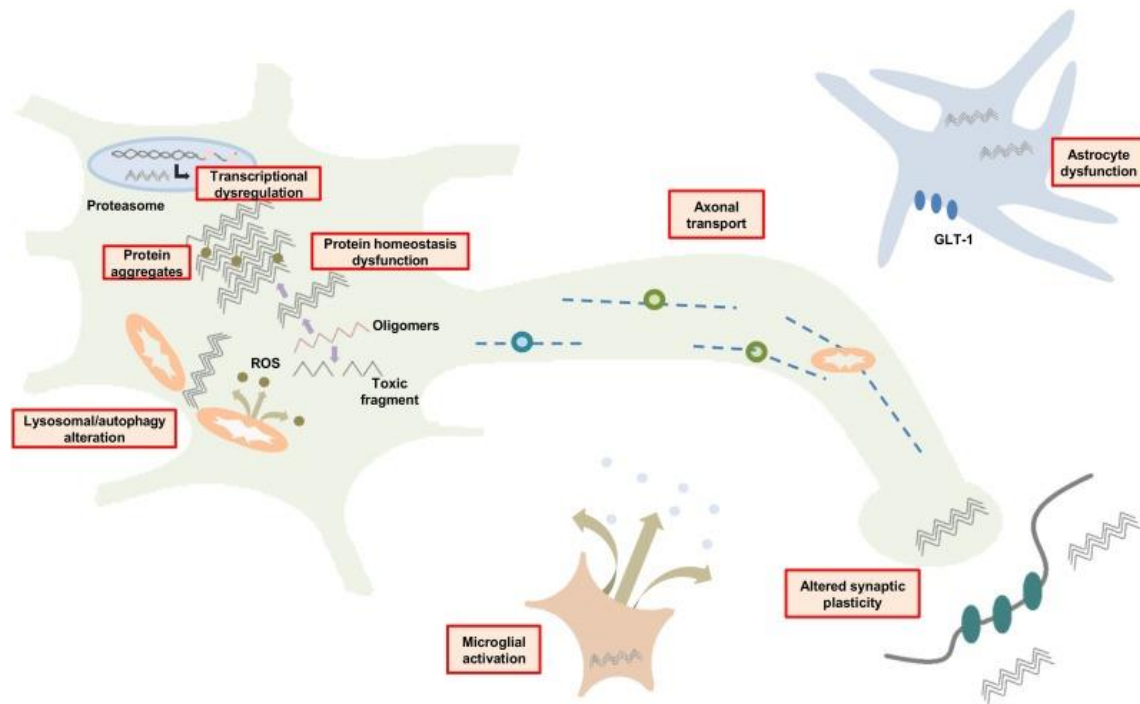


Figura 5. Mecanismo patológico de la Enfermedad de Huntington. Fuente: Gatto et al. 2020.

Como ya se ha mencionado, las neuronas más vulnerables son las de proyección estriatal (las neuronas gabaérgicas espinosas de tamaño medio) que constituyen aproximadamente el 95% de la totalidad de las neuronas del estriado (Wright et al., 2019). En cambio, se desconoce el porqué de esta relativa selectividad estriatal en el transcurso de la enfermedad. Algunas hipótesis incluyen la susceptibilidad a la pérdida de BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) producida por la susceptibilidad a la excitotoxicidad proveniente de las proyecciones glutamatérgicas o la disregulación transcripcional desde las proyecciones córtico-estriatales o (Cowan & Raymond, 2006; Wang et al., 2008).

Aunque predominan los síntomas neurológicos, no son la única manifestación clínica de la EH. Estudios previos han descrito fenotipos patológicos en tejidos periféricos de 32 pacientes, entre los que se encuentran la pérdida de peso, la alteración de la homeostasis de la glucosa o la afectación músculo-esquelética. Por ello existe una creciente evidencia que sugiere que las células de los tejidos periféricos de EH presentan anomalías relacionadas con la expresión de mHTT (Sassone et al., 2009).

#### 1.4 Aspectos clínicos de la EH y tratamientos actuales.

Los síntomas de la EH generalmente se dividen en síntomas motores, relacionados con trastornos del movimiento. Síntomas cognitivos, relacionados con habilidades mentales y demencia. Así como síntomas psicológicos, relacionados con cambios en las reacciones

emocionales y el estado de ánimo (Kay et al., 2017). Los síntomas generalmente comienzan entre los 30 y 50 años, pero pueden comenzar a cualquier edad. Alrededor del 8% de los casos comienzan antes de los 20 años, aunque se han descrito inicios entre los 4 y los 80 años (Nance, 2017).

La neuropatología tiene lugar mucho tiempo antes del inicio de los síntomas. Al igual que en otros trastornos neurodegenerativos, una extensa etapa preclínica está presente en la EH. Generalmente, la EH atraviesa las siguientes cuatro etapas (figura 6) (Gatto et al., 2020):

- I. Etapa prenatal, definida por las bases moleculares de la enfermedad.
- II. Etapa presintomática, definida por un proceso biológico que incluye el neurodesarrollo y el compromiso neurodegenerativo.
- III. Etapa prodrómica, caracterizada por la falta de penetración y el deterioro de la actividad motora.
- IV. Etapa manifiesta temprana y moderada: manifestaciones motoras, cognitivas, neuroconductuales y neuropsiquiátricas clásicas.

Las etapas tempranas (mencionadas anteriormente como prenatales y presintomáticas) se caracterizan por una adaptación exitosa para reducir el daño de la acumulación de mHTT. Pero cuando se rompe este equilibrio, se producen las siguientes dos etapas, intermedia y última etapa. Esta última se caracteriza por el comienzo de la descompensación evidente y la fase neurodegenerativa (Siebzehnrübl et al., 2018).

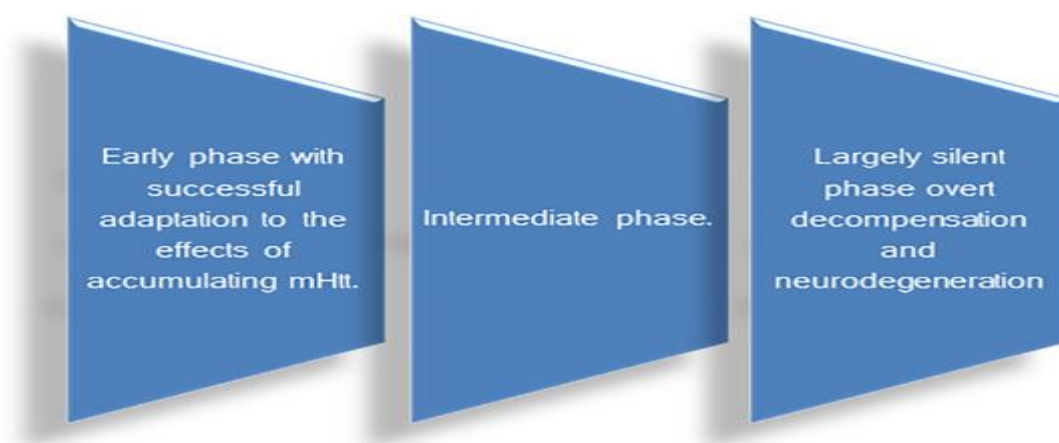


Figura 6. Etapas de la Enfermedad de Huntington. Fuente: Gatto et al. 2020.

La mayoría de las personas que padecen la EH son sujetos sanos durante su juventud y primeros años de la vida adulta antes de que aparezcan los síntomas motores que permiten el diagnóstico,

tales como corea, dificultades en la marcha, bradicinesia, rigidez, distonía o alteración de los movimientos oculares (Nguyen & Weydt, 2018). El reconocimiento, cada vez mayor, de cambios cognitivos previos a la aparición de la sintomatología motora puede convertirse en un marcador sensible de la evolución de estas personas. Esto permitiría redefinir los criterios clásicos de la enfermedad, centrados principalmente en la afectación motora, lo que ayudaría a los sujetos que experimentan el deterioro de sus funciones cognitivas antes de la aparición de los trastornos motores. Esta fase, llamada presintomática, despierta un especial interés de cara a la investigación de tratamientos modificadores de la enfermedad que, podrían detener la muerte celular antes de que esta sea tan significativa como para provocar la sintomatología neurológica. Actualmente existen múltiples colaboraciones internacionales en las que se implican científicos de todo el mundo que trabajan en la búsqueda de marcadores biológicos que sirvan para evaluar la eficacia de terapias modificadoras del curso de la enfermedad en esta fase (Paulsen et al., 2008; Tabrizi et al., 2009).

En las etapas iniciales, las manifestaciones clínicas incluyen cambios sutiles en la coordinación, movimientos involuntarios, alteraciones del planteamiento mental, depresión y alteraciones del estado anímico, sin embargo, los pacientes son capaces de desarrollar sus actividades cotidianas y obligaciones laborales (Paulsen et al., 2017). En el siguiente estadio, la corea se hace más prominente con una dificultad creciente para la actividad motora voluntaria y un marcado incremento de la disfagia y la disartria. La mayoría de los afectados deben abandonar su actividad laboral y son gradualmente más dependientes de la asistencia externa. Aunque todavía mantienen algún grado de independencia, algunas personas tienen comportamientos agresivos y desinhibición social (Orth et al., 2010). En los estadios tardíos de la enfermedad, los problemas de conducta usualmente disminuyen, el compromiso motor se incrementa y los individuos se convierten en totalmente dependientes. Se suele observar también pérdida de lenguaje e incontinencia (Nopoulos, 2016; Orth et al., 2010).

Conforme evoluciona la enfermedad, hay un incremento en esta dificultad funcional, en relación directa con la presencia de dificultades cognitivas y una mayor intensidad de los síntomas neurológicos y psiquiátricos (Orth et al., 2011). La prevalencia de los trastornos neuropsiquiátricos es muy alta, del orden del 60-95% en cualquier momento de la enfermedad. Los trastornos afectivos son los que más contribuyen a ellos, y son, en gran medida, responsables de una relativa alta tasa de suicidios, de 4 a 6 veces superior a la de la población general. Un estado de ánimo exaltado o irritable, impulsividad, hipersexualidad, inflexibilidad o perseverancia son síntomas frecuentes. También puede aparecer sintomatología psicótica de tipo ideación delirante o alucinaciones (Martinez-Horta et al., 2016; Paulsen et al., 2017). Las complicaciones como la neumonía, las enfermedades cardíacas y las lesiones físicas por caídas reducen la esperanza de vida, de forma que la muerte suele ser de quince a veinte años desde

que se detectó la enfermedad por primera vez (Kay et al., 2017; Nopoulos, 2016; Orth et al., 2010). Además, el suicidio es la causa de la muerte en aproximadamente el 9% de los casos (Orth et al., 2011).

Actualmente, no hay cura disponible para la EH. En cambio, los medicamentos recetados contra los síntomas de la enfermedad son una parte importante del tratamiento actual, ya que pueden mejorar la supervivencia y la calidad de vida, además de aliviar la gravedad de sus síntomas. En el mercado, la mejor evidencia para el tratamiento de los problemas de movimiento es con Tetrabenazina, también conocido como Xenazina o Nitoman (Jimenez-Shahed & Jankovic, 2013). Es un medicamento para el tratamiento sintomático de los trastornos del movimiento hiperkinético, que fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. en 2008 (Miguel et al., 2017). Sin embargo, otros intentos de desarrollar mejores compuestos hasta ahora no han tenido éxito (Gibson & Claassen, 2021). Esta situación requiere el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes afectados. Hay más de dos docenas de medicamentos y suplementos que están en proceso de desarrollo junto con docenas de otros nominados para su consideración. En la tabla 1 se resumen las principales terapias para el tratamiento de la EH en fases más avanzadas en la actualidad (Huntington's Disease Society of America. (s.f.)).

Tabla 1. Principales terapias en fases avanzadas de su desarrollo. Fuente: Huntington's Disease Society of America. (s.f.).

Tratamiento	Estado	Compañía
INGREZZA (VALBENZINE)	Aprobado para tratar movimientos faciales y de las extremidades. Se están reclutando pacientes por todo Estados Unidos para iniciar la fase 3.	Neurocrine Biosciences
PRIDOPIDINE (PROOF-HD)	Se estudia su capacidad de mantener la función diaria de los pacientes con EH. Se están reclutando pacientes por todo Estados Unidos para iniciar la fase 3.	Prilenia Therapeutics
SRX246 (STAIR TRIAL)	Tratamiento de los síntomas de ansiedad y agresión en las primeras etapas de la EH. La fase 2 ha finalizado, pero los resultados y los próximos pasos están pendientes.	Azevan Pharmaceuticals
DEEP BRAIN STIMULATION (DBS)	Se está llevando a cabo un ensayo en Europa para probar si un dispositivo llamado neuroestimulador ACTIVA® PC puede ayudar con la corea de la EH.	Medtronic
TRiheptanoIn	Se está probando como suplemento dietético en un pequeño estudio, cuyo objetivo es comprobar si puede prevenir la atrofia de las áreas del cerebro afectadas por la EH.	Ultragenyx Pharmaceuticals
CELLAVITA (ADORE-DH TRIAL)	A punto de iniciarse la fase 3. Después de un estudio de seguridad exitoso en una pequeña cantidad de personas, se reclutará a los mismos participantes para que reciban el medicamento durante un período de tiempo más largo.	Azidus (Brazil)
BRANAPLAM	Reduce la proteína Huntingtina. Se prevé que un ensayo de fase 2 en adultos comience a fines de 2021.	Novartis

## 1.5 Modelos murinos de EH.

Los modelos animales suponen un gran avance ya que nos permiten realizar distintos abordajes experimentales para describir los posibles mecanismos involucrados en la patología, así como identificar dianas terapéuticas o comprobar el efecto de potenciales tratamientos en estados patológicos, celulares y moleculares tempranos de la enfermedad, que sería imposible realizar *in vivo* en pacientes con la EH. Los roedores reúnen una serie de características de manipulación genética y crianza que los convierten en buenos candidatos a ser modelos para el estudio de enfermedades y posibles intervenciones terapéuticas (Bryda, 2013). Se ha estimado que los nuevos medicamentos tardan un promedio de 15 años desde su descubrimiento al mercado, con un coste promedio de 900 millones de €. Se estima que de 5.000 a 10.000 compuestos que ingresan el proceso de desarrollo, 250 llegarán a los ensayos preclínicos y, de ellos, solo cinco pasarán a los ensayos clínicos en humanos. De esos cinco, solo uno llegará al mercado. Por lo que las pérdidas de inversión de dinero y tiempo asociadas con los cuatro medicamentos fallidos son enormes (Colvin & Maravelias, 2008). De esta manera, la realización de ensayos preclínicos más específico y sensibles basados en los mejores modelos animales reduce los costos de desarrollo de fármacos y, lo que es más importante, reduce el riesgo para las personas en ensayos clínicos (Bryda, 2013).

Por un lado, desde el descubrimiento del gen *HTT* en 1993, se han diseñado numerosos modelos de ratones con EH (Heng et al., 2008; Pouladi et al., 2013). Estos modelos han contribuido significativamente a la comprensión de la patogénesis de la EH y ofrecen un enorme potencial para evaluar nuevas terapias (Crook & Housman, 2011; Gil & Rego, 2009; Szlachcic et al., 2017). Los modelos difieren en los métodos por los cuales fueron diseñados, sus números de repeticiones de CAG, antecedentes genéticos, y la aparición de la enfermedad y gravedad. También varían en su sensibilidad factores ambientales y el enriquecimiento (A. et al., 2012; Hockly et al., 2002; Skillings et al., 2014). Aunque no se han realizado comparaciones directas exhaustivas de todos los modelos en condiciones experimentales idénticamente controladas, la comunidad de investigación de la EH ha obtenido una enorme apreciación de las variables que pueden afectar el diseño y los resultados experimentales.

Por otro lado, en el contexto de la construcción del modelo, es necesario señalar la secuencia de ADN en el exón 1 que codifica la poliglutamina puesto que algunos de los modelos de ratón descritos a continuación no imitan específicamente la secuencia de ADN (CAG) nCAACAG y esto es especialmente importante a tener en cuenta cuando se consideran ciertos mecanismos relevantes para la fisiopatología de la EH (Zheng & Diamond, 2012). En seres humanos, la región de poliQ es codificada por un estiramiento puro de codones de CAG que colinda con los codones de CAACAG que también codifican residuos de la glutamina. Por convención, es la longitud del

tracto CAG puro la que define si el alelo se considera que está en el rango normal (6-26 repeticiones), normal de gama alta (27-35) o en el rango de la enfermedad. En este último caso, las longitudes de CAG incluyen alelos incompletos penetrantes (36-39), de aparición en adultos (40-50) o juveniles (~55 y más) para la EH (Podvin et al., 2019).

Sin embargo, ningún modelo hasta la fecha reproduce todos los elementos de la enfermedad humana, así que la búsqueda de modelos más precisos y útiles continúa (Chang et al., 2015). Los modelos genéticos actuales se pueden agrupar en las siguientes tres grandes categorías de acuerdo con la forma en la que fueron diseñados. Los modelos dentro de cada clasificación difieren en sus números de repetición de CAG, la estabilidad de la expansión, el tamaño y la especie de origen (ratón o humano) de la proteína Huntingtina, los promotores que impulsan su expresión y el fondo genético del ratón. Como consecuencia de cómo y con qué propósito se diseñó cada uno, el modelo exhibe un fenotipo característico algo diferente.

#### 1.5.1 Modelos transgénicos N-terminales.

Las líneas transgénicas N-terminales, también conocidas como líneas de fragmentos parciales, fueron los primeros modelos murinos de EH generados (Zheng & Diamond, 2012). Llevan una pequeña porción 5' del gen HTT humano, incluyendo el exón que contiene la región de la repetición de CAG. Existen seis líneas de ratones, donde 4 de ellas tienen repeticiones CAG de un tamaño mayor que la EH juvenil en humanos: R6/1 (CAG=115); R6/2 (CAG=145); R6/5 (CAG = 135-156) y R6/0 (CAG = 142). Las edades de inicio del fenotipo de la enfermedad son de 2 meses para los R6/2 y de 4-5 meses para los R6/1 (Mangiarini et al., 1996; Sathasivam, et al. 1999). Otros ratones que expresan fragmentos N-terminales de la proteína Huntingtina son los modelos transgénicos N171-82Q, que contienen el fragmento de 171 aminoácidos o el modelo N586-82Q que contiene el fragmento de caspasa 6 o 586 aminoácidos de la región N-terminal (Heng et al., 2008). Las líneas transgénicas N-terminales desarrollan anomalías neurológicas progresivas, que incluyen pérdida de coordinación, temblores, hipoquinesia, marcha anormal, neuropatología y muerte prematura (Chang et al., 2015). Pero generalmente tienen un fenotipo acelerado en relación con otras líneas genéticamente modificadas (Menalled et al., 2009).

#### 1.5.2 Modelos transgénicos de longitud completa.

Estos modelos de ratón de EH incorporan el gen HTT completo en su genoma mediante la inserción transgénica a través de cromosomas artificiales bacterianos o de levadura (Gray et al., 2008; Slow et al., 2003). A diferencia de los ratones N-terminales, estas construcciones transgénicas más grandes tienden a integrarse en el genoma en un solo locus genómico y típicamente en números bajos de copias, entre 1 y 3 copias transgénicas). Además, el gran

tamaño de estas construcciones artificiales típicamente aísla los transgenes de la influencia de secuencias cis-DNA en el genoma del ratón que pueden afectar negativa o positivamente a los niveles de la expresión. Como resultado, los niveles de expresión en los modelos transgénicos de longitud completa tienden a correlacionarse bien con el número de copias transgénicas que se insertan. Por otro lado, a diferencia de los animales transgénicos N-terminales, desarrollan el fenotipo de la enfermedad de forma gradual durante muchos meses y muestran una supervivencia relativamente normal (Gray et al., 2008; Menalled et al., 2009; Van Raamsdonk et al., 2005). Aunque el fenotipo neurodegenerativo de los modelos transgénicos de longitud completa es más lento de desarrollar que los modelos transgénicos N-terminales, tienen una mayor validez de constructo porque el gen HTT humano completo se expresa dentro del contexto de sus elementos reguladores genómicos endógenos. Estos modelos de longitud completa pueden ofrecer ciertas ventajas sobre los transgénicos N-terminales, particularmente cuando se prueban terapias experimentales dirigidas directamente al gen o a la proteína HTT humana, además, son los más utilizados para realizar estudios de patogénesis. En cambio, no aparecen apenas agregados de Huntingtina mutada en el cerebro (Heng et al., 2008).

### 1.5.3 Modelos de ratones *knock-in*.

A diferencia de los modelos transgénicos N-terminales y de longitud completa, los modelos *knock-in* (KI) son generados por técnicas de recombinación homóloga utilizando células madre embrionarias de ratón, a las que se les introduce un número específico de repeticiones de CAG directamente en el gen *Htt* del ratón (Menalled et al., 2002). Una ventaja obvia de estos modelos es la fidelidad de expresión que resulta de las repeticiones de CAG que se llevan en el contexto del gen *Htt* de ratón. Eliminandose así la variabilidad en la distribución de tejidos y los niveles de expresión observados en modelos transgénicos de EH basados en microinyección. Una diferenciación importante entre estos modelos de ratón es si la zona expandida de CAG está insertada en el exón 1 de *Htt* del ratón o en una secuencia humanizada del exón 1. En el primer caso, las líneas KI expresan una mHtt de ratón (Lin et al., 2001; Sathasivam et al., 2013), pero en el segundo caso, las líneas KI expresan una mHtt quimérico ratón-humano (Levine et al., 1999; Menalled et al., 2003; Wheeler et al., 1999). Como resultado, estos ratones pueden tener dos copias de la proteína Huntingtina modificadas (homocigotos) o sólo una de ellas (heterocigotos), ambas bajo la dirección del promotor endógeno de la Huntingtina. Los ratones homocigotos y heterocigotos son viables y fértiles con algunas características que copian la EH.

A edades muy tempranas, la Htt se transloca al núcleo dando un patrón de tinción difuso y comienzan a aparecer microagregados nucleares de mHtt en 2-6 meses dependiendo del modelo, aunque las inclusiones no se detectan hasta edades mucho más tardías, en 10-18 meses dependiendo del modelo (Li et al., 2000; Menalled et al., 2002). Estos resultados en la



progresión del desarrollo de agregados son importantes ya que nos muestra que no contribuye a los déficits en comportamiento iniciales, por lo que no son una buena diana terapéutica para estadios tempranos. Sin embargo, si pueden contribuir a los déficits funcionales que tienen lugar en los estadios más tardíos de la enfermedad. En alguno de estos modelos se han visto alteraciones moleculares pero ninguno sufre, incluso a edades muy avanzadas, muerte neuronal o gliosis (Lin et al., 2001). Estos resultados nos dicen que la disfunción neuronal es un proceso que precede a la muerte neuronal, así que ésta podría considerarse consecuencia de la disfunción y no al contrario. Además correlaciona con el hecho de que existan déficit motores sutiles bastantes años antes a la aparición de atrofia y otros síntomas en pacientes de EH (Smith et al., 2000).

En general, todos estos modelos KI presentan anomalías conductuales iniciales más leves que otras líneas transgénicas. A edades posteriores, sin embargo, suelen desarrollar anomalías conductuales más robustas y agregados de Huntingtina. Existen varios tipos de modelos KI con expansiones de poliQ que van desde 50 hasta 150 repeticiones (Lin et al., 2001). De la misma forma que en los pacientes de EH, existe el fenómeno de anticipación génica o inestabilidad (aumento de la longitud de la repetición de generación en generación). Este modelo de EH también presenta inestabilidad de la poliQ en neuronas relacionada con la edad. Esta inestabilidad no se da en todas las regiones, sino que es específica de algunas, encontrándose los mayores aumentos en la longitud de la poliQ en el estriado y la corteza (Wheeler et al., 1999).

La elección de un modelo de ratón KI, por lo tanto, requiere una cuidadosa consideración de dos variables: el tamaño de repetición de CAG parental y la cigosidad del alelo mutante. Cada uno de ellos afecta a la robustez de la medida de resultado que se busca y a la edad en que los déficits son medibles. Sin embargo, cada una de estas variables ha sido objeto de debate en el contexto de los intentos de imitar mejor la fisiopatología de la EH en el ratón. En primer lugar, mientras que, los ratones KI proporcionan aparente validez de alto nivel de constructo en que el gen *Htt* endógeno se está modificando para expresar repeticiones de CAG expandidas, el tamaño de las repeticiones más estudiadas (por ejemplo, 111, 150, 175, 200) están muy por encima del rango normal para la EH de inicio en adultos y superan los tamaños típicos incluso para la EH de inicio juvenil. En segundo lugar, la mayoría de los pacientes humanos de EH llevan típicamente solo un alelo de HTT con las expansión de CAG, por tanto, los modelos de ratón heterocigotos serían los que mejor genocopien la enfermedad, aunque los ratones homocigóticos presentan típicamente fenotipos más robustos, particularmente con respecto al comportamiento. Sin embargo, otras investigaciones también han revelado fenotipos medibles en heterocigotos (Heikkinen et al., 2012; Lin et al., 2001; Menalled et al., 2012; Rising et al., 2011). La mayoría de los investigadores de la EH se han centrado en el uso de ratones *knock-in* con un elevado número

de repeticiones CAG (92 o más) para estudios preclínicos, ya que los ratones de menor longitud PoliQ no parecen demostrar fenotipos robustos medibles (Menalled et al., 2012).

#### 1.5.3.1 El ratón zQ175neo heterocigoto como modelo murino de la EH.

Los ratones *knock in* de 140 repeticiones (CAG140) han sido bien caracterizados y conservan un tracto CAG puro, (CAG)<sub>n</sub>CAACAG, que codifica la secuencia de poliglutaminas sin codón de arginina (Menalled et al., 2003, 2012). Además, la estrategia de focalización tomada por Zeitlin, su creador, fue humanizar la secuencia de aminoácidos del exón 1, incluido el estiramiento de poliprolina. Por lo tanto, estos ratones KI codifican la secuencia humana del exón 1 en el contexto de un locus *Htt* de ratón de longitud completa. La estrategia específica de focalización de genes empleada por Zeitlin, sin embargo, dejó un casete de neomicina de selección de genes intacto en el extremo 5' del gen *Htt* del ratón objetivo. El impacto de este casete en los niveles de expresión de la proteína no ha sido bien descrito, pero los datos existentes sugieren que es mínimo. Este ratón modificado también lleva 10 pb de intrón 1 humano, mientras se han delecionado 94 pb pertenecientes al intrón 1 del ratón. Las expansiones de la línea germinal del tracto CAG en el ratón CAG140 llevaron a la identificación de un ratón que tiene un tamaño de repetición CAG de 175. Este ratón fue criado selectivamente para crear una nueva sublínea, llamada zQ175 (con la letra z utilizada para identificar que la línea se derivó de una línea creada por Scott Zeitlin) (Heikkinen et al., 2012; Menalled et al., 2012). Posteriormente, el número de la repetición de CAG en el zQ175 se amplió más lejos, y una línea fue estabilizada selectivamente con 190 repeticiones del triplete CAG. Esta línea, todavía confusamente llamada zQ175, es idéntica al ratón CAG140 KI excepto por el tamaño de la secuencia de repeticiones CAG. Por tanto, la cepa zQ175 neo-deleted KI, también conocida como zQ175DN KI y B6J.zQ175DN KI, procede de la cepa zQ175 KI. El casete de neomicina se eliminó de la línea germinal mediante la reproducción con ratones transgénicos Zp3-Cre. Los ratones resultantes, denominados KI de zQ175 neo-delecionado (o zQ175DN KI), se cruzaron luego con ratones C57BL/6J para eliminar el transgén Zp3-Cre.

Respecto al fenotipo, esta línea de ratón transgénico (homocigotos y heterocigotos) presenta una disminución del peso corporal respecto a los ratones *wild type* (WT), siendo el peso incluso menor en las hembras. Su morfología cerebral es anormal y exhiben agregados neuropatológicos de proteína mutante en varias regiones del cerebro que aparecen varios meses después del inicio de los síntomas conductuales. Las regiones en las que se encuentran agregados nucleares incluyen el cuerpo estriado, la corteza cerebral, el hipocampo, el pálido, el globo pálido y la amígdala. En cuanto al comportamiento, los ratones presentan hiperactividad, siendo mayor en hembras, así como un aumento de la actividad locomotora y actividad vertical al mes de edad. En cambio, la hiperactividad observada es seguida por hipoactividad, además, los machos no muestran el alto nivel de actividad trepadora mostrado por los machos WT. Desarrollan

anomalías en la marcha, con zancadas más pequeñas y actividad locomotora anormal. Los síntomas del comportamiento preceden a la neuropatología que se vuelve intensa y generalizada con la edad (Dorner et al., 2007; Menalled et al., 2003).

Los ratones homocigotos desarrollan déficit en el comportamiento a muy temprana edad, anteriores incluso a la neuropatología. Además, aunque no existen signos claros de degeneración estriatal, sí que existe patología estriatal. Los ratones homocigotos exhiben una fuerza de agarre debilitada (4 semanas de edad), déficit motor (8 semanas de edad), alteración de la actividad rotatoria y de escalada (30 semanas de edad), alteración del ritmo circadiano (9 meses de edad) y supervivencia significativamente reducida (90 semanas de edad). Además, los ratones homocigotos tienen agregados de mHtt (entre 2-4 meses de edad), marcadores genéticos estriatales tempranos y significativamente disminuidos (a partir de 12 semanas de edad) y recuentos de células neuronales disminuidos (Menalled et al., 2002). Los ratones heterocigotos muestran los déficits de comportamiento a mediana edad, también muestran déficits motivacionales (30 semanas de edad) y déficits de aprendizaje operante (alrededor de un año). Además, se detecta una disminución de la expresión de los marcadores génicos del estriado en ratones heterocigotos a partir de las 18 semanas de edad (Dorner et al., 2007).

Por tanto, el nuevo modelo de ratón zQ175neo imita de cerca la lesión genética humana y presenta alteraciones moleculares y de comportamiento robustas y tempranas (figura 7). Debido a que son genéticamente el mejor modelo para la EH, el desarrollo del fenotipo motor es de progresión lenta y son animales longevos, los ratones heterocigotos zQ175neo son útiles para la evaluación de posibles intervenciones terapéuticas (Menalled et al., 2012).



Figura 7. Ratón heterocigoto de la cepa zQ175neo.

#### 1.5.3.2 Fondo genético de la cepa zQ175neo heterocigota.

Muchos modelos de ratón de EH están ahora disponibles en diferentes fondos de cepas congénitas, lo que permite la selección de modelos de ratón y combinaciones de las cepas de fondo más adecuadas para el fenotipo particular a evaluar. Independientemente del esquema de apareamiento, es probable que el fondo afecte a los fenotipos de la EH que manifiestan. La cepa

zQ175neo se ha criado sobre un fondo genético C57BL/6J congénito (WT), lo que ha permitido realizar estudios directos de comparación de todos estos ratones sin las complicaciones de confusión de diferentes antecedentes genéticos.

Los ratones C57BL/6J se utilizan comúnmente como una cepa de uso general y de fondo para la generación de congénitos que llevan mutaciones tanto espontáneas como inducidas (Engber, 2011). Aunque esta cepa es refractaria a muchos tumores, es un fondo permisivo para la máxima expresión de la mayoría de las mutaciones. Los ratones C57BL/6J se utilizan en una amplia variedad de áreas de investigación que incluyen biología, diabetes y obesidad, genética, inmunología y neurobiología, así como para la producción de ratones transgénicos. Además, en general, los ratones C57BL/6J se reproducen bien, son longevos y tienen una baja susceptibilidad a los tumores (Crusio et al., 2013).

## **2. El 4QMn como medicamento huérfano.**

Bionos Biotech SL. es el único propietario de una patente para el desarrollo y explotación en exclusiva del compuesto poliamínico 4QMn, que podría proteger las células en el contexto de múltiples enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la acumulación de proteínas.

### **2.1 El compuesto Pytren-4QMn.**

El Grupo de Investigación de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (GQS-UV), viene realizando una intensa actividad en su campo, particularmente en el desarrollo de compuestos poliamínicos con aplicaciones biomédicas. En los últimos años, han sintetizado tanto familias de compuestos con actividad antioxidante como con actividades antiparasitaria y/o antitumoral. Con tal finalidad, este grupo lideró un proyecto interdisciplinar Consolider Ingenio en el que participaron equipos de investigación de nueve instituciones de españolas. Entre ellas, Bionos Biotech S.L., que está validando el compuesto Pytren-4QMn como posible candidato a fármaco contra enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación de depósitos de proteínas.

#### **2.1.1 Composición molecular y estructura.**

La nomenclatura simplificada Pytren-4Q hace referencia a la molécula 6-[(4-(4-quinolil)-3-azabutil)]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecaféano desarrollada por el GQS-UV. Fue diseñado para coordinar un ion metálico dentro de su estructura de una manera similar a cómo las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD) coordinan los iones metálicos para catalizar la transferencia de electrones entre radicales y estos iones metálicos. Por tanto, Pytren-4Q es un compuesto poliamínico tipo escorpiando mimético de las enzimas SOD (Serena et al., 2015). Las SOD son

una familia de enzimas que eliminan los aniones radicales superóxido altamente reactivos catalizando su dismutación en las especies no radicales dióxígeno e hidrógeno peróxido (Abreu & Cabelli, 2010). Los aniones superóxido son producidos por diferentes enzimas en una gran cantidad de procesos normales (como la respiración celular y durante el metabolismo del ácido araquidónico) y patológicos. En general, el superóxido, formado como un subproducto de la respiración mitocondrial, es perjudicial para la función y la supervivencia celular (Fridavich, 1995). Debido a su alta reactividad, actúa sobre cualquier molécula, siendo especialmente sensibles los ácidos nucleicos, las proteínas y los fosfolípidos. Su interacción con dichas moléculas produce modificaciones estructurales, que se traducen en alteraciones funcionales (Winterbourn & Kettle, 2003). Por tanto, desequilibrios en las concentraciones de aniones superóxido están asociadas con el envejecimiento celular y algunas enfermedades neurodegenerativas (Maier & Chan, 2002).

El comportamiento de esta molécula está relacionado con parámetros estructurales y electroquímicos. Pytren-4Q presenta una estructura similar al centro activo de la enzima SOD siendo capaz de reemplazarlo en sus interacciones (Clares et al., 2015). Se han desarrollado diferentes estudios en los que se ha determinado que la presencia de unidades de quinolina en este tipo de moléculas permite completar la esfera de coordinación para un metal como manganeso, cobre o hierro (figura 8), lo que confiere una mayor estabilidad termodinámica y cinética a los correspondientes complejos metálicos.

Adicionalmente, los distintos grupos sustituyentes proporcionan un entorno hidrófobo para el metal, lo que presenta menor toxicidad y mayor eficiencia funcional tanto *in vitro* como *in vivo* (Clares et al., 2015). Se ha usado la nomenclatura simplificada 4QMn para hacer referencia a dicho complejo con manganeso. Bionos Biotech SL. ha estudiado las posibles rutas de acción de la molécula 4QMn, así como también ha realizado estudios para validar su acción.



Figura 8. Dibujo de bolas y palos de la estructura cristalina del complejo Mn (II) del compuesto pytren-4Q  $[Mn(\text{pytren-4Q})]^{2+}$ . Fuente: Clares et al. 2015.

### 2.1.2 Estudios *in vitro*.

Las prometedoras propiedades fisicoquímicas del compuesto 4QMn dieron lugar a los primeros ensayos para determinar su actividad en un entorno biológico. Dichos estudios se desarrollaron en bacterias, levaduras y células humanas en colaboración con diferentes líderes del proyecto Consolider Ingenio.

En primer lugar, se determinó que el compuesto presentaba actividad SOD en organismos vivos. Se realizó un estudio en bacterias y levaduras en las que dicha actividad estaba comprometida (Clares et al., 2015). El crecimiento aeróbico de *E. coli* deficiente en *SodAsodB* y *S. cerevisiae* deficiente en *Sod2* en medios de cultivo restrictivos es muy bajo y puede ser rescatado por el compuesto 4QMn, que es capaz de penetrar en la célula para compensar dicha deficiencia. En presencia de oxígeno y en un medio de cultivo restrictivo, el 4QMn apoyó el crecimiento de *E. coli* deficiente de *SodAsodB* y de *S. cerevisiae* deficiente en *Sod2* a los niveles de la respectiva cepa WT (figura 9) (Clares et al., 2015).

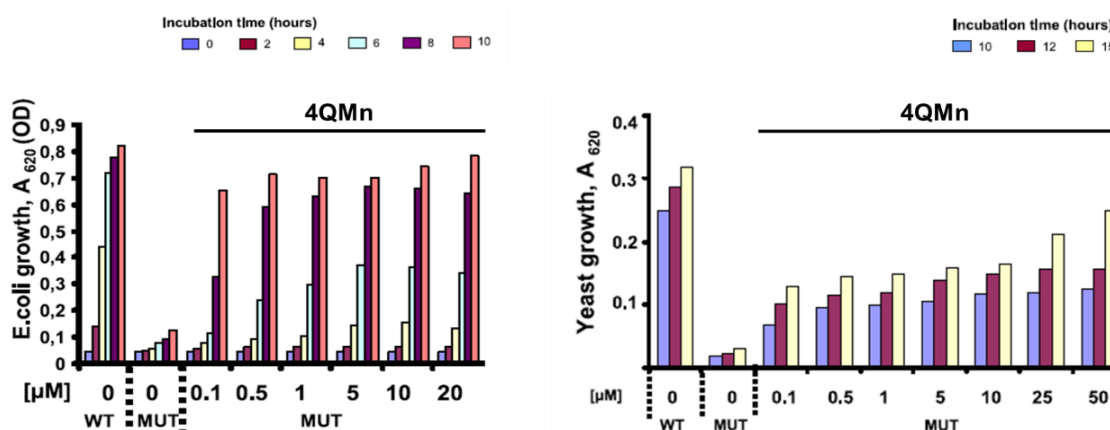


Figura 9. Crecimiento de *E. coli* deficiente en *SodAsodB* y de *S. cerevisiae* deficiente en *Sod2* con el tratamiento con 4QMn. Fuente: adaptación de Clares et al. 2015

Por otro lado, el compuesto 4QMn estimulaba la autofagia y la actividad del proteasoma. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) por su gran experiencia en estudios relacionados con la autofagia. En primer lugar, para evaluar este mecanismo de acción, se estudió la proteína LC3. LC3 es una proteína soluble en células en condiciones normales de crecimiento, que se asocia a la membrana durante la inanición de aminoácidos. La proporción de LC3II aumenta durante la inducción de autofagia respecto LC3I (Tanida et al., 2004). Basándose en este hecho, se desarrollaron diferentes ensayos en los que se utilizaron fibroblastos humanos con mutaciones en Laforina y Malina, patologías en las que los mecanismos de autofagia están comprometidos (Aguado et al., 2010). Como resultado del tratamiento de las células deficitarias de autofagia con 4QMn, los niveles de LC3-II aumentaron,

indicando que el 4QMn podría rescatar los niveles de autofagia (datos no publicados). En segundo lugar, se realizó un estudio para evaluar el efecto del compuesto 4QMn en la formación de vacuolas autofágicas. Las imágenes de microscopía mostraron que los fibroblastos humanos aumentaron el número de vacuolas autofágicas después del tratamiento con 4QMn, lo que indica que el 4QMn activó la autofagia en estas células (datos no publicados).

Por tanto, los datos iniciales del laboratorio indicaron que el compuesto 4QMn podría estar actuando a dos niveles. Por un lado, protegiendo del estrés oxidativo por su actividad mimética de SOD, un mecanismo perfectamente descrito por el grupo desarrollador de la molécula. Y, por otro lado, mediante un mecanismo de activación de la autofagia.

### 2.1.3 Estudios *in vivo*.

Por un lado, Bionos Biotech SL. evaluó la capacidad antioxidante del compuesto 4QMn en vertebrados. Se desarrolló un ensayo en el que embriones de peces *Oryzias latipes* (Medaka) fueron tratados con 4QMn durante 24 horas. A continuación, se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración LC50 durante 96 horas, y se determinó el porcentaje de mortalidad. Los resultados mostraron que el 4QMn confirió protección *in vivo* contra el estrés oxidativo reduciendo la mortalidad debido a su capacidad antioxidante (figura 10) (Clares et al., 2015).

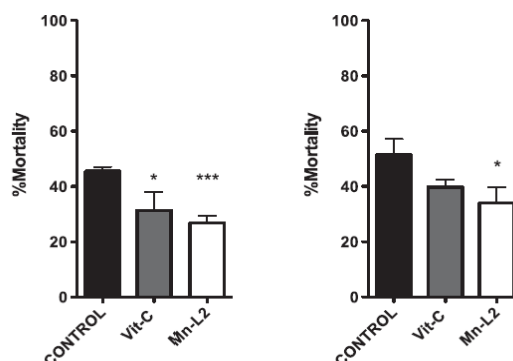


Figura 10. Mortalidad (%) de embriones de Medaka obtenida después del tratamiento con Vitamina C (como control positivo) y 4QMn, nombrado Mn-L2. Fuente: Adaptación de Clares et al. 2015.

Por otro lado, se llevaron a cabo diferentes estudios en colaboración con el Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe para evaluar el efecto del compuesto 4QMn en un modelo transgénico de *Caenorhabditis elegans* para la EH, que tiene el gen ortólogo de la Huntingtina y no posee regiones poliQ en ninguna proteína (Lee et al., 2017). El fenotipo observado mostraba déficit mecanosensorial, anomalías morfológicas axonales y disfunción neuronal directamente proporcional a la longitud de la poliQ. Todo ello sucede en ausencia de muerte neuronal (Lee et al., 2017; Voisine et al., 2007). Los estudios consistieron, en primer lugar, en determinar el efecto mecanosensorial de diferentes dosis del compuesto evaluando la respuesta

al toque del organismo transgénico. Además, se administró metformina como control positivo, un fármaco que activa la autofagia (Gao et al., 2020). Se observó que el 4QMn recuperaba la actividad neuronal de manera dosis dependiente, es decir, los resultados mostraron una mejora en la neurosensibilidad en comparación con el control. En segundo lugar, se determinó el efecto del compuesto en los agregados del organismo transgénico. Se observó una disminución del número de agregados en *C. elegans* con el tratamiento, en presencia de citoquina (bloqueador de la autofagia). Estos datos no están publicados aún, pero se obtuvieron en paralelo a la realización de esta tesis confirmando la inducción de la autofagia por 4QMn.

#### 2.1.4 Propiedad intelectual.

En el sector biotecnológico, el costo de la elaboración de productos y procesos nuevos es, en general, muy alto, mientras que el costo de su imitación es relativamente bajo. Es por ello por lo que la protección de la propiedad intelectual es un pilar fundamental para cualquier desarrollo farmacéutico. Además, actualmente los productos en desarrollo en colaboración con otras empresas están sujetos a distintos tipos de protección intelectual, que van desde la protección del uso hasta el secreto industrial pasando por la posesión de manera exclusiva del producto en cuestión. Bionos Biotech S.L. tiene tres patentes relacionadas con el 4QMn extendidas globalmente que protegen su desarrollo.

#### 2.1.5 Designación de medicamento huérfano.

Bionos Biotech SL. ha presentado la documentación para la designación del 4QMn como medicamento huérfano por la Agencia Europea del Medicamento (AEM). En el año 2017 se desarrolló un dossier con toda la información y resultados de los estudios con 4QMn para someterlo a la aprobación de la AEM como medicamento huérfano (*orphan drug designation*). Los medicamentos huérfanos se definen como fármacos que no serían desarrollados por la industria farmacéutica por razones económicas pero que responden a necesidades de salud pública (Isaacson, 2016). En la UE, para designar un medicamento como huérfano se deben cumplir los siguientes tres criterios (Mikami, 2019):

- I. Que se destine para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad que amenace la vida o conlleve una incapacidad crónica. Bionos Biotech SL. presentó el 4QMn para el tratamiento de Enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la EH.
- II. Que la prevalencia de la enfermedad no sea mayor de 10.000 en la UE o resulte improbable que la comercialización del medicamento genere suficientes ingresos para justificar la inversión necesaria para desarrollarlo.



III. Que no exista ninguna terapia satisfactoria autorizada para dicha afección o, de existir, el medicamento aportará un beneficio considerable a quienes padecen dicha afección.

Tras revisar la documentación aportada, la AEM solicitó presentar estudios de eficacia del compuesto 4QMn *in vivo* en un modelo animal de EH para completar la fase preclínica de su desarrollo y así poder obtener con éxito la designación de medicamento huérfano.

### 3. Oportunidad de negocio.

En la actualidad, Europa gasta alrededor del 10% del PIB en hospitales y asistencia sanitaria, lo que destaca la importancia de la salud en la política de la UE. En este contexto, *Rare Disease* es uno de los temas verticales del programa Horizon 2020 Social Challenge, que es crucial para el bienestar de los ciudadanos de la UE, para la reducción de los costes sanitarios y para el bienestar de la sociedad en general (Schiermeier, 2020).

El desarrollo de medicamentos paliativos de enfermedades neurodegenerativas que actualmente no tienen cura es un gran mercado al que siguen con gran interés las compañías farmacéuticas porque si un medicamento puede demostrar ser eficaz, no encontrará una gran carga administrativa, lo que facilitará su entrada en el mercado como un *Orphan Drug* (Isaacson, 2016). En este contexto, la participación de empresas privadas que apoyan las últimas etapas clínicas y facilitan la transición a la comercialización industrial es la clave para el desarrollo efectivo de terapias para enfermedades raras.

El mercado objetivo es el sector farmacéutico, que cada vez confía más en la investigación de nuevos medicamentos y cuya participación es la clave para el desarrollo eficaz de terapias para enfermedades raras (que afectan a más de 30 millones de ciudadanos de la UE) y simplifica las vías de aprobación regulatoria. Las tendencias en la industria farmacéutica indican que la inversión en I+D aumentó en un crecimiento compuesto anual (CARG) del 3,66%, incrementando su gasto total de 96.200 millones de € en 2010 a 120.000 millones en 2018 (EvaluatePharma®, 2018).

Centrándose en el mercado de la EH, se estima que aumentará alrededor de 252,6 millones de € en 2014 a más de 2,6 mil millones de € en 2024, lo que representa una elevada tasa de crecimiento anual compuesto del 25,6%. Este amplio crecimiento tendrá los siguientes factores del mercado global (de Estados Unidos, Francia, Alemania, Italia, España, el Reino Unido y Japón): Prevalencia creciente de la EH, comercialización de medicamentos en fase avanzada, incrementar el gasto en I+D en terapias de la EH por compañías farmacéuticas y que las terapias se centran en la reducción de la expresión de mHtt (Drug Development & Delivery. (s.f.)).

En este contexto, la oportunidad de negocio que lleva a Bionos Biotech SL. a desarrollar el compuesto 4QMn surge de dos hechos principales:

- ✓ No hay cura disponible en el mercado. Las limitaciones de la tetrabenazina y la ausencia de fármacos eficaces alternativos para el tratamiento de la EH exigen el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos con el fin de instalar la calidad de vida de los pacientes afectados.
- ✓ Crecimiento constante de pacientes con la EH. La prevalencia de la enfermedad crece constantemente, lo que se traduce en un mercado en constante crecimiento que se estima que alcanzará los 2.600 millones de € en 2024.

## 4. Objetivos.

### Objetivo general

Realización de los primeros estudios preclínicos del compuesto 4QMn en ratones zQ175neo como modelo murino de la Enfermedad de Huntington.

### Objetivos específicos

- I. Ensayos de toxicidad aguda y crónica en ratones WT para determinación de dosis y vía de administración.
- II. Ensayos de distribución tisular del compuesto en ratones WT.
- III. Crecimiento y mantenimiento de la colonia de ratones transgénicos zQ175neo.
- IV. Caracterización de la cepa de ratones zQ175neo heterocigota como modelo murino de la EH.
- V. Validación del efecto del 4QMn en ratones zQ175neo heterocigotos.

\* Estancia para la colaboración en el estudio del mecanismo de acción del 4QMn en el modelo de *C. elegans* con 40 repeticiones del triplete CAG.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Preparación del compuesto 4QMn para su posterior administración.

En cada ensayo, el compuesto 4QMn se preparó utilizando una mezcla molar 1:0,95 de 4Q (M: 589,43 g/mol) y MnSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (M: 169,02 g/mol) en agua de calidad Milli-Q. Las diluciones para preparar las dosis administradas a los ratones por vía intraperitoneal (IP) se realizaron en solución de NaCl 0,9%, mientras que las dosis administradas por vía intragástrica (IG) e intranasal (IN) se prepararon en Tris-HCl 1M pH 7,2. La dosis administrada *ad libitum* se preparó en agua estéril.

La equivalencia de la dosis administrada en mg/kg y la concentración molar se realizó en base al peso (aproximadamente 30 g machos y 22 g hembras) y el volumen aproximado de sangre (2 ml) de los ratones. Para ello, se preparó una dilución a partir del stock en base al volumen a administrar (200 µl oral/IP, 20 µl IN y 5 ml *ad libitum*). El stock de 4QMn se preparó en cada ocasión a una concentración de 900mM. A partir de éste, se realizó la dilución correspondiente para alcanzar la concentración calculada en base a la dosis de interés.

## 2. Ensayos de toxicidad aguda y crónica en ratones *wild type*.

El estudio de toxicidad del compuesto 4QMn se realizó en ratones de la cepa WT C57BL/6J con el objetivo principal de determinar la dosis no tóxica que administrar en estudios posteriores.

### 2.1 Ensayos para la determinación de dosis límite.

En primer lugar, se determinó la dosis límite o dosis letal que marcó el límite máximo por debajo del cual se debe administrar el 4QMn en los siguientes experimentos.

El primer estudio que se realizó para calcular la dosis límite consistió en la administración por vía IG de diferentes cantidades de 4QMn a ratones de la cepa WT divididos en grupos por sexos hasta obtener la muerte de algún individuo tras 48 horas (tabla 2). Las dosis fueron 25, 200 y 2000 mg/kg y se prepararon individualmente para cada ratón en función de su peso en un volumen final de 200 µl por animal. Para la administración por vía IG, se empleó una cánula de tamaño apropiado para su uso en ratones (Cibertec, España).

Tabla 2. Primer ensayo de dosis límite administrando vía IG.

Dosis IG (mg/kg)	Ratones C57BL/6J	Tiempo total de observación (h)
25	3 ♂ + 3 ♀	48
200	3 ♂ + 3 ♀	48
2000	1 ♂	1

Se realizó un segundo ensayo empleando la misma vía de administración con el objetivo de ajustar la dosis a administrar en estudios posteriores. En esta ocasión, se utilizaron las dosis 500 y 1000 mg/kg (tabla 3) administradas por vía IG. El compuesto se preparó de igual forma en función del peso de cada animal en un volumen de 200  $\mu$ l.

Tabla 3. Segundo ensayo de dosis límite administrando vía IG.

Dosis IG (mg/kg)	Ratones C57BL/6J	Tiempo total de observación (h)
500	3 ♂ + 3 ♀	48
1000	1 ♂	48

Para poder estudiar varias vías de administración en los ensayos posteriores, una vez fijada la dosis por vía oral, se estudió la dosis límite por vía IP. Se administró una dosis inicial de 1 mg/kg a 6 ratones y una dosis de 10 mg/kg a un ratón, en un volumen total de 100  $\mu$ l por animal (tabla 4).

Tabla 4. Tercer ensayo de dosis límite administrando vía IP.

Dosis IP (mg/kg)	Ratones C57BL/6J	Tiempo total de observación (h)
1	3 ♂ + 3 ♀	48
10	1 ♂	1

## 2.2 Ensayos de toxicidad aguda.

A continuación, se iniciaron los estudios de toxicidad. El primer paso fue la realización de un ensayo de toxicidad aguda, en el que se estudió el efecto nocivo de una única administración de 4QMn por vía IP. Se establecieron 3 grupos de 5 ratones que fueron tratados con el vehículo NaCl 0,9%, o con dos dosis de 4QMn (1 mg/kg y 0,1 mg/kg) durante 14 días (tabla 5). Para determinar el posible efecto nocivo del compuesto, se evaluó, por un lado, el bienestar del animal valorando su peso corporal semanalmente. Por otro lado, el daño hepático valorando la actividad Alanina Transaminasa (ALT) en plasma. Para ello, se realizó una extracción de 200  $\mu$ l de sangre de la vena facial a día 0 (nivel basal) y a día 14 (nivel final) en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Fisher Scientific, Estados Unidos). Se obtuvo el plasma por centrifugación en frío y se almacenó a -80°C.

Tabla 5. Ensayo de toxicidad aguda administrando vía IP.

Compuesto	Dosis IP	Ratones C57BL/6J	Tiempo total del estudio (d)
NaCl	0,90%	2 ♂ + 3 ♀	14
4QMn	0,1 mg/kg	3 ♂ + 2 ♀	14
	1 mg/kg	2 ♂ + 3 ♀	14

### 2.2.1 Cuantificación de actividad Alanina Transaminasa en plasma.

El efecto nocivo del compuesto se determinó mediante la evaluación de los valores de actividad ALT en plasma utilizando el kit *ALT Colorimetric Activity Assay* (Cayman Chemicals, Estados Unidos). La medición de la actividad ALT se llevó a cabo controlando la velocidad de oxidación de NADH en un sistema de reacción acoplado que emplea lactato deshidrogenasa (LDH) (figura 11).

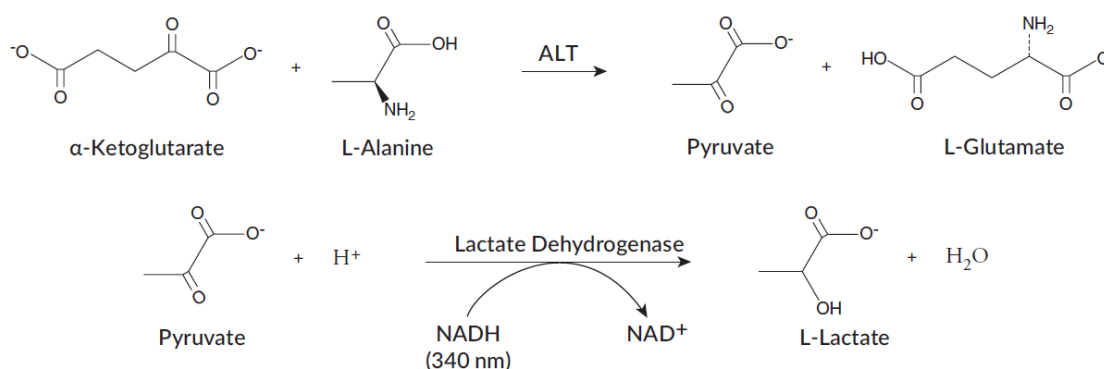


Figura 11. Esquema de las reacciones de cuantificación de actividad ALT.

El ensayo de actividad colorimétrica de ALT consistió en la adición del sustrato de la reacción, L-alanina, resuspendido en tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, bicarbonato de sodio 10 mM, piridoxal-5-fosfato 0,1 mM, azida de sodio al 0,01%) y los cofactores (NADH y LDH) junto con las muestras de plasma sin diluir o ALT de corazón porcino, como control positivo. Tras una incubación de 15 minutos a 37°C, se añadió a cada reacción el iniciador de ALT ( $\alpha$ -cetoglutarato) y se determinó la absorbancia a 340 nm cada minuto durante un total de 10 minutos en el lector híbrido multi-modal de microplacas Synergy™ H1.

El análisis de los datos consistió, en primer lugar, en la determinación del cambio de absorbancia por minuto. Para ello, se graficaron los valores de absorbancia en función del tiempo para obtener la pendiente (tasa) de la porción lineal de la curva. La velocidad de reacción a 340 nm se determinó utilizando el coeficiente de extinción NADH de  $4.11 \text{ mM}^{-1}$  empleando la siguiente fórmula para calcular la actividad ALT:

$$\text{ALT activity (U/ml)} = \frac{(\Delta A/\text{min}) \times 0.21 \text{ ml}}{4.11 \text{ mM}^{-1} \times 0.02 \text{ ml}}$$

Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba ANOVA unidireccional ordinaria comparando las muestras tratadas frente a las muestras control (sin tratamiento). La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  con una confianza del 95%. Los resultados gráficos se representaron como media  $\pm$  SEM (Error Estándar de la Media) normalizando al grupo no tratado como control de referencia de forma que los datos definieron la diferencia originada por el tratamiento con 4QMn.

### 2.3 Ensayos de toxicidad crónica.

Finalmente, se evaluó la toxicidad de varias dosis administradas de forma continua en un periodo de tiempo mayor. El primer ensayo de toxicidad crónica consistió en la administración de 1, 2 y 5 mg/kg de 4QMn a grupos de 5 ratones por vía IP cada 4 días y NaCl 0,90% al grupo control durante 28 días (tabla 6). Se observó la supervivencia, el peso corporal de cada grupo y la relación del peso del hígado de cada animal respecto su peso corporal.

Tabla 6. Primer ensayo de toxicidad crónica. Administración IP.

Compuesto	Dosis IP	Ratones C57BL/6J	Tiempo total del estudio (d)
NaCl	0,90%	3 ♂ + 2 ♀	28
4QMn	1 mg/kg	2 ♂ + 3 ♀	28
	2 mg/kg	3 ♂ + 2 ♀	28
	5 mg/kg	3 ♂ + 2 ♀	28

Con el objetivo de refinar el procedimiento, cumpliendo así con uno de los principios básicos de la experimentación con animales, se realizó un segundo ensayo para evaluar la toxicidad crónica administrando el compuesto por vía IG tres días a la semana (lunes, miércoles y viernes) durante tres meses (tabla 7). En este caso, se observó la supervivencia de los ratones, y el daño hepático a través de la cuantificación de actividad ALT y mediante tinción de secciones de hígado con Hematoxilina-Eosina (H-E) para determinar la presencia de células inflamatorias.

Tabla 7. Segundo ensayo de toxicidad crónica. Administración IG.

Compuesto	Dosis IG	Ratones C57BL/6J	Tiempo total del estudio (d)
Tris-HCl	1 M pH 7,2	1 ♂ + 2 ♀	90
4QMn	5 mg/kg	2 ♂ + 1 ♀	90
	10 mg/kg	1 ♂ + 2 ♀	90
	50 mg/kg	2 ♂ + 1 ♀	90

Para la cuantificación de actividad ALT, se extrajeron 200  $\mu$ l de sangre a cada ratón de la vena facial cada 15 días durante los 3 meses de tratamiento en tubos con EDTA (Fisher Scientific, Estados Unidos). Se obtuvo el plasma por centrifugación en frío y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la finalización del ensayo. Finalmente, se analizaron los valores de actividad ALT empleando de

nuevo el kit *ALT Colorimetric Activity Assay* (Cayman Chemicals, Estados Unidos) (protocolo detallado en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos).

### 2.3.1 Tinción Hematoxilina-Eosina.

Para la determinación de daño hepático, se evaluó la presencia de células inflamatorias realizando una tinción de secciones de hígado con H-E. Para ello, transcurridos los 90 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el hígado de cada animal, que fue fijado en etanol 80% durante 72 horas e incluido en parafina. Para ello, dado que la parafina no es miscible en agua, en primer lugar, se deshidrataron las muestras empleando concentraciones crecientes de etanol durante diferentes tiempos (etanol al 96% durante 90 minutos, etanol al 100% durante 2 horas, etanol al 100% limpio durante la noche) y xilol durante 2 horas. Finalmente, las muestras deshidratadas se incluyeron en parafina a 60°C durante 1 hora y en parafina limpia durante 1 hora más en el inclusor. Las muestras incluidas en parafina fueron cortadas en el microtomo en secciones de 10 µm y colocadas en portaobjetos. Para realizar la tinción H-E, en primer lugar, se desparafinaron las muestras a 60°C durante 1 hora y se rehidrataron con xilol durante 20 minutos, concentraciones decrecientes de etanol (etanol 100% durante 10 minutos y etanol 70% durante 10 minutos) y finalmente agua hasta que se comenzó la tinción.

En segundo lugar, para realizar la tinción, las muestras se bañaron en Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) durante 30 segundos. Tras limpiar los portaobjetos con agua corriente, se realizaron dos pases en alcohol clorhídrico (1:200 de HCl en etanol 70%) y se volvieron a limpiar. Se realizaron 5 pases en agua amoniacal (15-20 gotas de amoniaco en agua) y se bañaron en Eosina alcohólica (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) durante 30 segundos (eosina al 0,25% en etanol 19%). Tras limpiar los portaobjetos, las muestras se rehidrataron con concentraciones crecientes de etanol y xilol (20 pases de etanol al 96%, 20 pases de etanol al 100%, 3 pases de xilol). Finalmente, las muestras se montaron con medio DPX y se realizaron fotos en un microscopio de luz transmitida (Leica, Alemania) con el objetivo de 10X.

## **3. Determinación de la presencia de 4Q en tejidos de ratones *wild type*.**

Los ensayos cuya finalidad fue evaluar la presencia del compuesto 4Q en diferentes tejidos se realizaron en ratones WT de la cepa C57BL/6J con el objetivo principal de detectar el compuesto en el cuerpo estriado de los ratones.



### 3.1 Primer ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Se realizó un primer ensayo en el que se administró la dosis máxima no tóxica de 4QMn por vía IP. Los animales se distribuyeron en 5 grupos de 3 ratones WT. El grupo control fue tratado con NaCl 0,9% y sacrificado a las 24h. Los grupos tratados se sacrificaron a los 15 minutos, 1, 4 y 24 horas (tabla 8).

Tabla 8. Primer ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Compuesto	Dosis IP	Ratones C57BL/6J	Tiempo analizado
NaCl	0,90%	2 ♂ + 1 ♀	24 h
4QMn	1 mg/kg	1 ♂ + 2 ♀	15 m
		2 ♂ + 1 ♀	1 h
		1 ♂ + 2 ♀	4 h
		2 ♂ + 1 ♀	24 h

Para cumplir con la regla de las tres R en la experimentación con animales, en este mismo ensayo se evaluó también la toxicidad aguda del compuesto en tiempos cortos. De forma que, por un lado, se extrajo 200 µl de sangre de la vena facial en tubos con EDTA (Fisher Scientific, Estados Unidos) a inicio y término del ensayo. Se recogió el plasma por centrifugación en frío y se almacenó a -80°C. Los valores de ALT en plasma se evaluaron utilizando de nuevo el kit ALT Colorimetric Activity Assay (Cayman Chemicals, Estados Unidos) (protocolo detallado en el apartado 2.2.1 de Materiales y Métodos). Finalmente, por otro lado, se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical. El cerebro e hígado fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido de forma inmediata para ser conservados a -80°C hasta su análisis.

#### 3.1.1 Análisis de la acumulación del 4Q en tejido sólido.

El análisis de la acumulación del compuesto se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas (UPLC-MS/MS) en la Unidad Analítica del IIS La Fe. La unión del manganeso al 4Q no es covalente, de forma que constantemente los iones metálicos se intercambian en el organismo. De forma que esta técnica se optimizó para la detección de 4Q en las muestras sin manganeso. Para determinar la presencia de dicho compuesto en las muestras de interés, se prepararon soluciones estándar. Las soluciones estándar consistieron en la elaboración de un stock de 4Q a una concentración de 5 mg/ml en metanol. A partir de esta solución, se prepararon otras soluciones menos concentradas en el rango de 10-200 ng/ml en agua: acetonitrilo (90:10, v/v) y se inyectaron en las condiciones optimizadas. Se colocaron aproximadamente 150 mg de cada muestra de tejido congelado en tubos de 2 ml que contenían perlas de cerámica CK14 (Precellys, Francia). Se agregaron 500 µl de acetato de etilo y los tejidos se homogeneizaron dos veces durante 40 segundos a 6.000 rpm a 4°C en un sistema Precellys 24 Dual equipado con un enfriador Criolys (Precellys, Francia). Los tubos se

centrifugaron a 3.000 g durante 5 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios. Se realizó una segunda extracción con otros 500 µl de acetato de etilo y se evaporó a sequedad en un concentrador Savant speedvac. Posteriormente se reconstituyó en 50 µl de agua: acetonitrilo (90:10, v/v), y se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a placas de 96 pocillos para su posterior análisis UPLC-MS/MS. El análisis se realizó utilizando un sistema Acquity UPLC (Waters, Reino Unido) equipado con una columna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm; Waters, Reino Unido) empleando agua y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% como fases móviles. El análisis de MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters, Reino Unido) con una fuente ESI que trabaja en el modo de iones positivos y en el modo MRM.

### 3.2 Ensayo de detección de 4Q en sangre.

En base a los resultados obtenidos, se desarrolló un segundo ensayo para determinar si el compuesto era capaz de circular por el torrente sanguíneo de los ratones. Éste consistió en la administración de una dosis de 4QMn de 20 mg/kg por vía IG a dos ratones. Se les extrajo 300 µl sangre de la vena facial en tubos sin anticoagulante (Fisher Scientific, Estados Unidos) trascurridos 30, 60 y 120 minutos después de la administración (tabla 9). El suero se recogió por centrifugación en frío y se almacenó a -80°C hasta su análisis por UPLC-MS/MS.

Tabla 9. Ensayo de detección de 4Q en sangre.

Compuesto	Dosis IG	Ratones C57BL/6J	Tiempo analizado (min)
4QMn	20 mg/kg	2 ♂ + 1 ♀	30
		1 ♂ + 2 ♀	60
		1 ♂ + 2 ♀	120

#### 3.2.1 Análisis de la acumulación del 4Q en sangre.

Se analizó la acumulación del compuesto 4Q en cada muestra por UPLC-MS/MS, sin manganeso. Por un lado, las soluciones estándar consistieron en la elaboración de un stock de 4Q a una concentración de 5 mg/ml en metanol. A partir de esta solución, se prepararon otras soluciones menos concentradas en el rango de 10-200 ng/ml en agua: acetonitrilo (90:10, v/v) y se inyectaron en las condiciones optimizadas. Por otro lado, se precipitaron las proteínas de 150 µl de cada muestra de suero mediante la adición de 3 volúmenes de metanol frío. Los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios y se evaporaron hasta sequedad en un concentrador Savant speedvac. Luego, el extracto se reconstituyó en 50 µl de agua: acetonitrilo (90:10, v/v), se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4°C, y los sobrenadantes se transfirieron a placas de 96 pocillos para su posterior análisis UPLC-MS/MS. El análisis fue realizado utilizando un sistema Acquity UPLC (Waters, Reino Unido) equipado con una columna

Acquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm; Waters, Reino Unido) empleando agua y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% como fases móviles. El análisis de MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas Waters Xevo TQ-S (Waters, Reino Unido) con una fuente ESI que trabaja en el modo de iones positivos y en el modo MRM.

### 3.3 Segundo ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

En función de los resultados obtenidos, se diseñó un nuevo ensayo a tiempos más cortos. Se establecieron grupos de tres ratones. Consistió en la administración de una única dosis de 5 mg/kg de 4QMn por vía IN y una única dosis de 15 mg/kg por vía IP para determinar la presencia del compuesto por UPLC-MS/MS a 15 min, 30 min, 1 hora y 2 horas en el estriado e hígado (tabla 10). Trascurridos dichos tiempos, el estriado e hígado fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido de forma inmediata para ser conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por UPLC-MS/MS (protocolo detallado en el apartado 3.1.1 de Materiales y Métodos).

Tabla 10. Segundo ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Compuesto	Vía	Dosis	Ratones C57BL/6J	Tiempo (min)
4QMn	IP	15 mg/kg	1 ♀	10
			1 ♂ + 2 ♀	15
	IN	5 mg/kg	1 ♂ + 2 ♀	30
			2 ♂ + 1 ♀	60
			2 ♂ + 1 ♀	120

### 3.4 Tercer ensayo de detección de 4Q en cerebro e hígado.

Para determinar la presencia del 4Q en el cerebro a partir de la administración por vía IG, se llevó a cabo un último experimento en el que se administró el compuesto 4QMn a una dosis de 50 mg/kg por vía IG a grupos de dos ratones (tabla 11). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical al cabo de 15 y 30 minutos. Tanto el cerebro como el hígado fueron extraídos inmediatamente después de la muerte del animal. El córtex, el estriado y los restos del cerebro de cada ratón se congelaron, al igual que el hígado, en nitrógeno líquido para ser almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis por UPLC-MS/MS (protocolo detallado en el apartado 3.1.1 de Materiales y Métodos).

Tabla 11. Tercer ensayo de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Compuesto	Dosis IG	Ratones C57BL/6J	Tiempo (min)
4QMn	50 mg/kg	1 ♂ + 1 ♀	15
		1 ♂ + 1 ♀	30

## **4. Crecimiento y mantenimiento de la colonia de ratones transgénicos zQ175neo heterocigotos.**

El crecimiento y mantenimiento de la colonia de ratones transgénicos ha sido un proyecto complejo que se ha llevado a cabo bajo la supervisión del veterinario responsable del animalario del IIS La Fe.

### **4.1 Cruces para la generación de ratones transgénicos zQ175neo.**

La colonia de ratones transgénicos zQ175neo que se ha criado y mantenido como modelo de EH pertenece a la cepa #029928 de Jackson Laboratory (B6J.129S1-Htttm1.1Mfc/190ChdJ), que muestra un fenotipo neurológico progresivo que imita muchas de las características de la EH en humanos. Se compraron 6 ratones macho de 10 semanas de edad. Tras su llegada, los animales pasaron un periodo de aclimatación y cuarentena de 15 días según las indicaciones de la Directiva 53/2013, hasta que se estabularon en la sala de cría del animalario del IIS La Fe. Cada uno de los cruces se ha realizado siguiendo el protocolo detallado a continuación: se coloca un ratón macho en edad reproductora (entre 8 y 40 semanas de edad) en una jaula, tras 24 horas se colocan 3 hembras de la cepa C57BL/6J en cada una de ellas. Los cruces se separaron en el momento en el que se apreció tapón vaginal o después de 5 días. Tras 21 días de gestación, se procedió al destete, genotipado y separación de las camadas por sexos aproximadamente a las tres semanas de vida. Dependiendo del número de ratones necesarios para cada experimento, se repitió el proceso con otras hembras de cepa WT. Según recomendaciones del proveedor, para el correcto mantenimiento del stock de ratones transgénicos, cada uno de los cruces fue diseñado de forma que los parentales no fueran consanguíneos para mantener la variabilidad dentro de la colonia.

### **4.2 Genotipado por PCR.**

El genotipado de cada nueva camada se realizó por PCR a partir de ADN extraído de muestras de la cola de cada animal. De esta forma se clasificaron los ratones en WT y heterocigotos para su posterior uso en los correspondientes estudios.

#### **4.2.1 Extracción de ADN.**

Los genotipados se han realizado por PCR. Para ello, se identificó cada cría de ratón con un pendiente y se le diseccionó unos 25 mm de cola. Se extrajo el ADN de las muestras siguiendo las especificaciones del kit de Invitrogen PureLink® Genomic ADN (Invitrogen, Estados Unidos). La preparación de los tejidos consistió en la digestión de las muestras por calor con el tampón de digestión genómica PureLink® y proteinasa K durante 4 horas. Se recuperó el lisado por centrifugación a máxima velocidad durante tres minutos a temperatura ambiente. Para eliminar

el ARN, cada lisado se incubó con RNAsa A durante dos minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadió el tampón PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer y etanol 100% a cada lisado. Tras agregar el lisado preparado a la columna PureLink® Spin Column, el ADN se unió a la columna. El ADN se lavó por centrifugación con el tampón de lavado 1 y 2 preparados con etanol. Finalmente, el ADN se eluyó con agua purificada y desionizada (agua MilliQ) y se almacenó a -20°C.

#### 4.2.2 PCR.

La reacción de amplificación se realizó siguiendo las especificaciones del kit KAPA Mouse Genotyping (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Cada reacción fue formada por KAPA2G Fast Genotyping Mix 1X, 0,5 µM de cebador directo (GCGGGCTTATACCCCTACAG), 0,5 µM de cebador reverso (TCCAGGACAGCCAGAGCTAC) y 1 µl del extracto de ADN. La mezcla se completó hasta un volumen final de 25 µl con agua MilliQ. El perfil térmico de la reacción fue una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos que consistieron en 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 15 segundos de hibridación a 60°C y 15 segundos de extensión a 72°C. Por último, una extensión final de 1 minuto a 72°C. El producto de PCR se almacenó a 4°C hasta la realización de la electroforesis.

#### 4.2.3 Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 2% en tampón TBE 1X. Se añadió 1 µl de tampón de carga LB 6X a 5 µl del producto de la amplificación. La separación se llevó a cabo con un voltaje de 80 V en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 1X. Para conocer el tamaño de los fragmentos se empleó el marcador *DNA Ladder* 200 pb (Takara, Francia).

### 4.3 Mantenimiento de la colonia.

El mantenimiento de ambas especies de ratones fue realizado por el personal cualificado del animalario del IIS La Fe. Los animales fueron cambiados de cubeta y supervisados semanalmente. Tuvieron libre acceso a agua fresca y limpia, así como total disposición al alimento apropiado para roedores. Por otro lado, se trató de cubrir sus necesidades etológicas y disponiendo de enriquecimiento ambiental tal como material para formar nidos y para roer. La supervisión fue más minuciosa en momentos puntuales, como en el periodo de cruce y cría, prestando especial atención en el momento del parto y lactancia, así como durante la realización de los experimentos de eficacia del compuesto de interés. Tras el genotipado realizado a las crías a los 21 días de vida, los animales se clasificaron en base a su genotipo para ser empleados en los distintos tipos de ensayos que se han llevado a cabo a lo largo del proyecto.

## **5. Caracterización de biomarcadores en ratones zQ175neo heterocigotos.**

En primer lugar, se caracterizaron los marcadores a partir de los cuales determinar la efectividad del compuesto 4QMn en el modelo murino de la enfermedad de Huntington perteneciente a la cepa #029928 de Jackson Laboratory, Estados Unidos. Para ello se evaluaron los siguientes cuatro aspectos.

### **5.1 Fenotipo.**

Para estudiar cómo varía el fenotipo de los ratones transgénicos a lo largo del tiempo respecto a los ratones WT y realizar el seguimiento de los ratones tratados frente a los controles sin tratar, se estudió la actividad locomotriz a través de la realización de pruebas locomotoras. Por otro lado, se anotó el peso de los ratones semanalmente para evaluar el bienestar de los animales.

#### **5.1.1 Pruebas locomotoras.**

La actividad locomotriz se evaluó realizando una grabación mensual para puntuar la reducción de la actividad locomotora siguiendo los siguientes cinco patrones descritos en bibliografía (Guyenet et al., 2010).

Prueba de equilibrio: se evaluó la trayectoria y equilibrio de cada ratón sobre el borde de una cubeta (figura 12A). Procedimiento:

1. Limpiar la jaula entre ratones con un paño con etanol
2. Pasar comida por la cornisa para marcarla con su olor
3. Colocar el ratón en un extremo
4. Hacer un video por ratón de 40 segundos

Prueba de movilidad: se suspendió cada ratón de la cola y se comprobó la movilidad de sus patas traseras (figura 12B). Procedimiento:

1. Colocar un folio colgando de la estantería
2. Coger el ratón por la cola y situarlo delante del folio
3. Grabar un video por ratón de 15 segundos

Prueba de orientación: se colocó cada ratón en un campo abierto con algunas distracciones y se comprobó su orientación (figura 12C). Procedimiento:

1. Hacer el circuito de la imagen
2. Colocar el ratón en el centro
3. Grabar un video por ratón de 40 segundos

Prueba de cifosis: se evaluó la curvatura anormal de la columna vertebral asociada al modelo murino de enfermedad neurodegenerativa (figura 12D). Procedimiento: Hacer una foto a cada ratón en su posición natural

Prueba de fuerza: se colgó cada ratón de una rejilla y se comprobó si es capaz de mantenerse sujeto y no caerse (figura 12E). Procedimiento:

1. Colocar el ratón en posición horizontal sobre una rejilla en suspensión
2. Grabar un video por ratón de 15 segundos.

Cada prueba fue evaluada individualmente en ciego adaptando las apreciaciones motoras descritas por Guyenet et al. al fenotipo observado en nuestros ratones. Las valoraciones fueron definidas de 0 a 3 siguiendo los criterios de la tabla 12, siendo 0 la puntuación del fenotipo sin daño aparente y 3 el mayor grado de severidad, excepto la evaluación de la fuerza, cuya valoración fue 0 o 1.

#### 5.1.2 Peso.

El peso de los ratones refleja el bienestar animal. Cada ratón fue pesado al inicio de cada ensayo y cada semana durante el transcurso de éste, hasta su finalización. Una pérdida del 20% del peso corporal inicial se estableció como uno de los criterios de punto final humanitario.

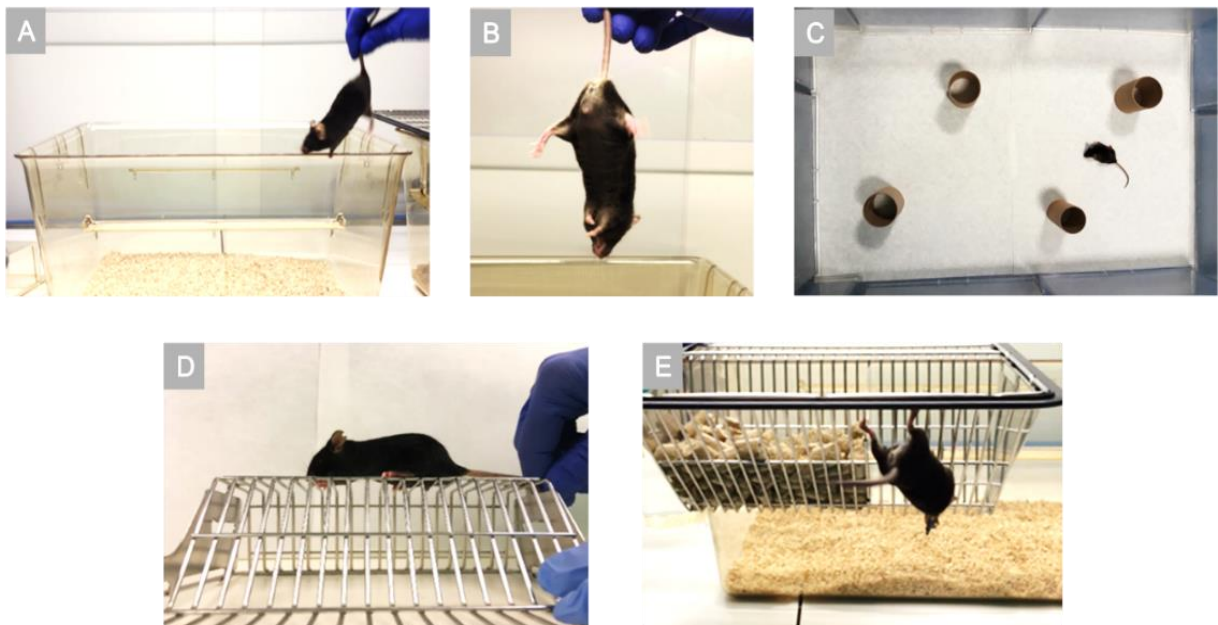


Figura 12. Imágenes representativas de las pruebas locomotoras. A) Prueba de equilibrio. B) Prueba de movilidad. C) Prueba de orientación. D) Prueba de cifosis. E) Prueba de fuerza.

Tabla 12. Valoración del fenotipo de los ratones.

Valoración	Equilibrio
0	Camina sin perder el equilibrio por toda la cornisa
1	Camina descoordinado
2	Pierde el equilibrio y/o no camina por la cornisa
3	El ratón se cae de la cornisa
Valoración	Cifosis
0	Sin cifosis persistente al caminar
1	Cifosis leve, pero puede enderezar la columna
2	Cifosis leve, pero sin poder enderezar la columna
3	Cifosis pronunciada
Valoración	Movilidad
0	Las patas se extienden alejándose del abdomen
1	Una o ambas patas se retraen parcialmente hacia el abdomen
2	Una o ambas patas se retraen considerablemente hacia el abdomen
3	Una o ambas patas se retraen totalmente hacia el abdomen
Valoración	Orientación
0	El ratón se mueve sin aparente daño motor por todo el circuito
1	El ratón recorre 3/4 partes del circuito con aparente daño motor
2	El ratón recorre la mitad del circuito con aparente daño motor
3	El ratón no recorre el circuito en absoluto
Valoración	Fuerza
0	El ratón no se cae de la rejilla
1	El ratón se cae de la rejilla

## 5.2 Expresión génica.

Se ha evaluado la expresión de varios biomarcadores descritos en bibliografía por RT-qPCR a partir de ARN extraído de muestras de sangre y cuerpo estriado.

### 5.2.1 Extracción de ARN a partir de muestras de sangre.

Se extrajo alrededor de 250  $\mu$ l de sangre de los ratones por punción de la vena facial en tubos con EDTA (Fisher Scientific, Estados Unidos), a tiempo inicial y cada mes hasta el final del estudio. Inmediatamente después se procedió a la extracción del ARN total con TRIzol™ LS. La lisis de muestras con reactivo TRIzol mantiene la integridad del ARN al tiempo que destruye las células y disuelve los componentes celulares. El reactivo TRIzol también proporciona una inhibición inmediata y muy eficaz de la actividad de la ribonucleasa durante la homogeneización de muestras. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación del ARN total con



cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa. Para ello, se añadieron 750 µl de TRIzol™ LS frío (Thermo Fisher, Estados Unidos) y se homogeneizó enérgicamente. Tras centrifugar las muestras 5 minutos a 12.000 g a 4°C, los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo, donde se incubaron 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteínicos. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo a cada tubo y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 12.000 g a 4°C y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo, donde se añadieron 500 µl de isopropanol y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12.000 g a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se realizó un lavado, resuspendiendo el pellet en 1 ml de etanol 75%, y centrifugando 5 minutos a 7.500 g a 4°C. Tras descartar el sobrenadante y secar los tubos a 37°C con el fin de evaporar el etanol residual, el ARN se resuspendió en 30 µl de agua RNase-Free y se almacenó a -80°C.

### 5.2.2 Extracción de ARN a partir de muestras de cuerpo estriado.

Se añadió una bola de acero a cada tubo que contenía el tejido conservado a -80°C junto con 350 µl TRIzol™ frío (Thermo Fisher, Estados Unidos). Los tubos se colocaron en el disruptor celular TissueLyser LT (Qiagen, Alemania) durante 5 minutos a 50 Hz. Seguidamente, se añadieron 140 µl de Cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000 g a 4°C; en este paso se eliminan los restos celulares. De esta forma se formaron dos fases por diferencia de densidad; la fase fenólica orgánica, que contiene al ADN y restos de proteínas desnaturalizadas y la fase superior acuosa, que contiene el ARN en cloroformo. Esta fase se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 350 µl de etanol 100%. Tras la lisis, el ARN se purificó por columnas siguiendo las indicaciones del kit KIT RNeasy® Mini (Qiagen, Alemania). El ARN de la muestra lisada se unió a la membrana de sílice transparente de las columnas pertenecientes a dicho kit y se lavó con distintos tampones para eliminar los contaminantes. Finalmente, se eluyó en 30 µl de agua libre de ARNasa y se guardó a -80°C.

### 5.2.3 Estimación de la calidad y cantidad de ARN.

La medida de la concentración de ARN se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). La concentración se obtuvo a partir de la absorbancia a 260 nm, longitud de onda de mayor absorbancia para los ácidos nucleicos. Además, se evaluó la pureza del ARN respecto a la cantidad de proteínas en la muestra en base al ratio de las absorbancias 260 nm/280 nm, y respecto a la cantidad de solventes orgánicos en la muestra a

partir del ratio 260 nm/230 nm. Se consideró una pureza elevada cuando los ratios estaban comprendidos entre 1,8-2 para 260 nm/280 nm, y 2-2,2 para el ratio 260 nm/230 nm.

#### 5.2.4 Retrotranscripción.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo según el protocolo del kit comercial PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, Francia). En este tipo de reacción se pretende transcribir toda la información contenida en el ARNm (transcriptoma) a ADN complementario (ADNc), de manera que a partir de cada molécula de ARNm se sintetiza una cadena de ADNc. Para ello, se tomaron 2 µg de ARN de cada una de las muestras. En cada tubo de reacción se añadieron 6,5 µl de ARN, 0,2 µl del tampón PrimeScript 5x, 0,5 µl del mix I de enzima RT, 0,5 µl de oligo dT 50 µM, 0,5 µl de hexámeros aleatorios 100 µM según las indicaciones del protocolo del kit y se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción en el termociclador termociclador UnoCycler 732-1200 (VWR, Alemania) incubando las reacciones a 37°C durante 15 minutos y a 85°C durante 5 segundos. Como producto final se obtuvieron 2 µg de ADNc de cada muestra en un volumen de total de 20 µl a una concentración de 100 ng/µl. En conjunto, el ADNc sintetizado representa el contenido de ARNm en las células en el momento de la extracción.

#### 5.2.5 RT-qPCR.

La tecnología de la PCR en tiempo real permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Se fundamenta en la adaptación de un termociclador y un fluorímetro, que permite detectar la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al ADN. Con esta técnica, los productos de amplificación se analizan en el momento de fase exponencial de la PCR. Esto permite estimar la concentración relativa o absoluta del gen en estudio.

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante el método de cuantificación relativa denominado "Método comparativo  $\Delta\Delta Ct$ ". En este tipo de análisis es preciso el estudio de un gen control o "endógeno", a parte del gen diana. Como genes de control endógeno deben escogerse aquellos genes cuya expresión no varíe en las diferentes condiciones experimentales. Estos genes sirven para relativizar la expresión del gen diana respecto al gen control endógeno. Además del control del gen endógeno, es necesaria una muestra control o calibrador. El calibrador es una muestra o conjunto de muestras unificadas, que representa el estado normal de expresión del gen diana y que, por tanto, permite comparar la expresión del gen diana de una muestra experimental (tratamiento) de una muestra normal (control).

Cuando la PCR a tiempo real se realiza después de una reacción de transcripción inversa (RT-PCR, del inglés reverse transcription PCR) en la que se sintetiza ADNc a partir de ARN, esta

técnica permite determinar la cantidad de ARN de una muestra mediante una cuantificación relativa. Esto se aplica tanto al ARNm como a ARN de pequeño tamaño. Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se realiza comparando la expresión del gen analizado respecto a la expresión de un gen de referencia cuya expresión es uniforme en diferentes condiciones experimentales (gen control endógeno). Este gen control endógeno sirve para normalizar posibles variaciones de la cantidad de ADNc que se añade a cada reacción, mediante el ajuste de la expresión de este gen respecto a las diferentes concentraciones de ARN total de las muestras empleado en la síntesis de ADNc.

#### 5.2.6 Diseño y eficacia de cebadores.

Para la realización de las qPCRs, se diseñaron parejas de cebadores específicos para la amplificación de cada uno de los genes seleccionados en bibliografía, así como genes de referencia de sangre y cuerpo estriado (actina y UBC respectivamente). Se buscó la secuencia de dichos genes de *Mus musculus* en el Centro Nacional de Información Biotecnológica y mediante la herramienta Primer BLAST se seleccionaron parejas de cebadores de una longitud de alrededor de 20 nucleótidos que presentaran una composición de GC menor del 60%, con una temperatura de hibridación de alrededor de 60°C y que no hibridaran entre sí. Estas parejas fueron fabricadas y servidas por Sigma-Aldrich.

A continuación, se determinó la eficacia de cada una de las parejas realizando una curva estándar por qPCR y evaluando su especificidad en las curvas de fusión. La morfología de esta curva nos permitió identificar los productos amplificados y distinguirlos de los dímeros de cebadores y otros pequeños artefactos de amplificación. Solo se aprobaron las parejas de cebadores que no presentaron dobles picos en la curva de fusión y cuya eficiencia fue superior al 92% con una  $R^2$  igual o superior a 0,98%.

#### 5.2.7 Componentes y programa de RT-qPCR,

Para la realización de la RT-qPCR se empleó el kit TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara, Francia). Siguiendo sus especificaciones, cada reacción contuvo 5 µl del Master mix Syber RT-PCR, 0,04 µl de Rox, 0,02 µl de una solución 10 µM del cebador directo (tabla 13), 10 µM del reverso (tabla 13), 4,42 µl de agua MiliQ y 0,5 µl de ADNc.

El termociclador utilizado en este trabajo ha sido el equipo de PCR a tiempo real QuantStudio 5 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), que emplea un sistema de detección de fluorescencia basado en SYBR Green. Este fluorocromo interacciona con el surco menor del ADN, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución, por

lo que el incremento en la cantidad de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida.

El programa de PCR implementado consistió en una desnaturalización del ADN a 95°C por 3 minutos, posteriormente 40 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturalizar el ADN, 7 segundos a 60°C para el alineamiento de los iniciadores y la extensión de 30 segundos a 72°C, finalmente el programa concluyó con 3 minutos de extensión final a 72°C.

Tabla 13. Cebadores directos (D) y reversos (R) para la amplificación de los genes de la sangre y el estriado relacionados con la EH.

Sangre		Estriado/Cerebro	
<i>Actina</i> F	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	<i>Bdnf</i> F	TGGTTTTCTTCGTTGGGCCG
<i>Actina</i> R	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	<i>Bdnf</i> R	TCTGGAGAGCGTGAATGGGC
<i>Anxa3</i> D	TGTTAGTTTTAGCTGCGGGA	<i>Cnr1</i> F	TGAAGGGAACATGCTGCGGA
<i>Anxa3</i> R	TGGTGAGAACAATGGGGCA	<i>Cnr1</i> R	TGAACTCCACCGTGAACCCC
<i>Aqp9</i> D	CGCCGTTCCATTTTCTCCCG	<i>Darpp32</i> D	TGCCTATACGCCCCCATCAC
<i>Aqp9</i> R	CGGGGCTGCAACTGTCTTTG	<i>Darpp32</i> R	CCCGAAGCTCCCCTAACTCA
<i>Canx</i> D	GTCGTCTAGCCAGCCTTCAG	<i>Drd2</i> F	GATGGATCGGGGAGAGTGAGC
<i>Canx</i> R	ATGACTGGGATGAAGACGCC	<i>Drd2</i> R	AGTGAACAGGCGGAGAATGGAT
<i>Clk3</i> D	GGAGAACAACCTCCAGCCT	<i>Fan1</i> D	GCACACTTCTACATCAGCCCC
<i>Clk3</i> R	AGATGTTCTCTGGCTTCAA	<i>Fan1</i> R	GAGGTGAAAGGCCCCAGTGA
<i>Cystm1</i> D	GAGGTGGTGGGTAGGGGTA	<i>Mlh1</i> D	CAAGCATCTCCTCGTCTCCCC
<i>Cystm1</i> R	CAGCCCCATACCCACCTTAT	<i>Mlh1</i> R	CTTGACGCCTTTCTGCAGCC
<i>P2y5</i> D	GGCCGCTGGAAAGTTCTCAAAG	<i>Nefl</i> D	AACAAGGTCTGGAAGCCGA
<i>P2y5</i> R	CGTTTGCATTGCTGTGTGGTTC	<i>Nefl</i> R	CCTGCTTCTCGTTAGTGGCG
<i>S100a9</i> D	ATTCAGACAAATGGTGGGAAG	<i>Pde10a</i> F	GCGATGATGGCTTTGCGGAT
<i>S100a9</i> R	CATACACTCCTCAAAGCTCA	<i>Pde10a</i> R	CGCTGTACTCCACCTCCACC
<i>Serca2</i> D	ACACACCCACGATTGCATTG	<i>Ubc</i> F	CCCAAGAACAAGCACAAGGAGG
<i>Serca2</i> R	CGAGGAAGGGGAAGAAACGA	<i>Ubc</i> R	ACGTGAGCCCAGTGTTAC
<i>Taf7</i> D	CCAAGGGCACTCGATCCACT		
<i>Taf7</i> R	GCCCCAGAATATGCCGCTA		
<i>Znf238</i> D	TGGAGACGTAGGGAAGCAGA		
<i>Znf238</i> R	GATGATGACCCCAGAGAGCG		

### 5.2.8 Análisis de expresión génica.

La expresión génica se determinó mediante el cálculo de la cantidad relativa (RQ). La expresión génica relativa fue calculada a partir de las cantidades relativas de cada gen (de referencia o de interés), y fueron estimadas con la ecuación:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ . Donde  $\Delta\Delta CT$  corresponde a la diferencia entre  $\Delta CT$  (muestras) y  $\Delta CT$  (calibrador); siendo  $\Delta CT$  (muestras) =  $CT$  (gen interés) –

CT (gen referencia) y  $\Delta$ CT (calibrador) = CT (gen interés en calibrador) – CT (gen referencia en calibrador).

### 5.3 Evaluación de agregados de Huntingtina en el cuerpo estriado.

Se estudiaron los agregados de Huntingtina presentes en el cuerpo estriado de los ratones zQ175neo heterocigotos de dos años. Para ello, las muestras del tejido se incluyeron en OCT para ser cortadas en secciones, sobre las que se localizó la mHtt por inmunohistoquímica.

#### 5.3.1 Inclusión muestras en OCT.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el estriado que fue fijado en 1 ml de paraformaldehído (PFA) 4% en PBS 1x durante 24 horas en agitación y a temperatura ambiente durante 5 días. El PFA se sustituyó por nuevo PFA 4% y se mantuvo a 4°C sin agitación durante 5 días. A continuación, se quitó el PFA y se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 min en agitación. Los tejidos se introdujeron en una solución de sacarosa al 15% y posteriormente al 30% en PBS 1X hasta que se hundieron. Por último, las muestras se incluyeron en OCT de (Thermo Scientific, Estados Unidos) en baño de isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

#### 5.3.2 Corte de los bloques de OCT.

Los cortes se realizaron empleando el criostato. En este equipo todo el sistema de corte se encuentra encerrado en una cámara refrigerada cuya temperatura estaba programada a -25°C. Tras colocar los bloques de OCT en el soporte, se adquirieron secciones de cada estriado de 10  $\mu$ m de grosor, las cuales se adhirieron por contacto a portaobjetos específicos para criosecciones Superfrost® plus (Thermo Scientific, Estados Unidos). Una vez se secaron, se guardaron a -20°C hasta la realización de la inmunohistoquímica.

#### 5.3.3 Inmunohistoquímica.

Se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS 1x para eliminar el OCT. Las muestras se permeabilizaron con Tritón X-100 0.3% durante 10 minutos y fueron bloqueadas durante una hora con tampón fosfato salino (PBS) que contenía Tritón X-100 0.3% y 10% FBS. La incubación con el anticuerpo primario EM48 (MAB5374. Sigma, Estados Unidos) diluido 1:500 en la solución de bloqueo fue realizada durante 24 horas. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS 1x, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 (ab150113. Abcam, Reino Unido) en dilución 1:500 y DAPI (ab228549. Abcam, Reino Unido). Finalmente, se realizaron tres últimos lavados de 10 minutos con PBS 1x y se montaron con el medio de conservación de fluorescencia FluorSave™ (Sigma, Estados Unidos).

### 5.3.4 Adquisición y análisis de las imágenes.

La adquisición de muestras se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia automatizado INCell Analyzer 2200 (Cytiva, Estados Unidos), equipado con una fuente de iluminación de estado sólido y diferentes objetivos de magnificación y filtros de excitación/emisión de fluorescencia. Las imágenes se recogieron a través de una cámara sCMOS de 16 bits, utilizando el objetivo de 20x. Para la adquisición se utilizaron dos pares de filtros dicroicos de excitación/emisión: 390/18 de excitación y 432.5/48 de emisión para DAPI, 475/28 de excitación y 511.5/23 de emisión para la detección del anticuerpo frente a la Huntingtina conjugado con FITC.

Las imágenes se analizaron con el programa INCell Developer Toolbox (Cytiva, Estados Unidos). El flujo de trabajo para el análisis de las muestras consistió en la segmentación de los núcleos basándonos en la fluorescencia del DAPI (figura 13), y la segmentación de los gránulos/acúmulos de Huntingtina basándonos en la fluorescencia de la FITC (figura 13).

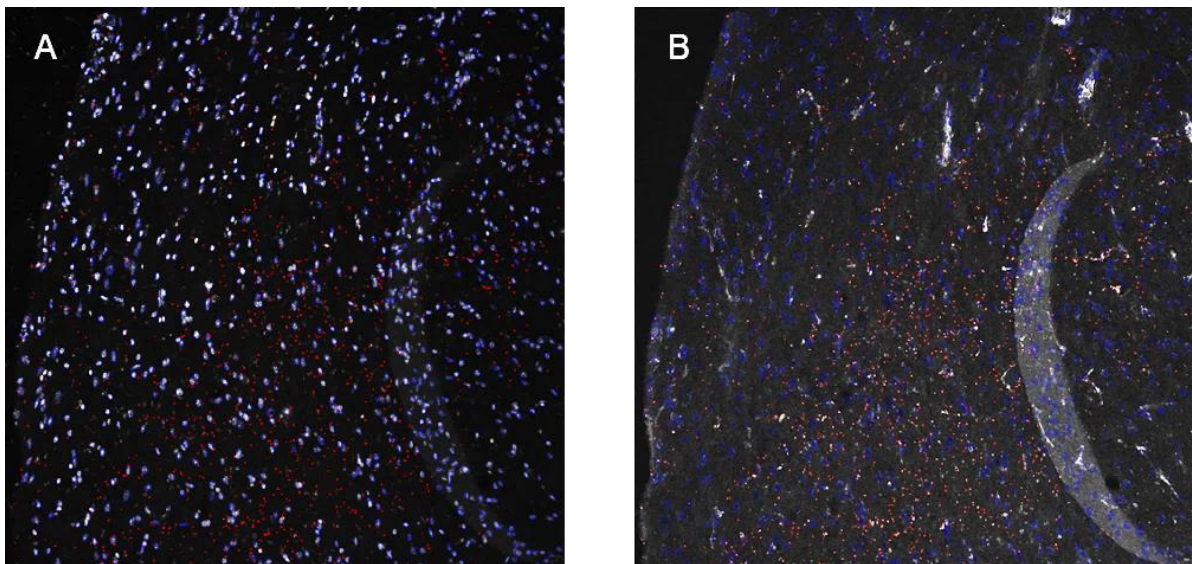


Figura 13. Ejemplo de segmentación de DAPI (A) y FITC (B). Las máscaras azules son los núcleos, las rojas los acúmulos. Las imágenes son en blanco y negro. Las máscaras aparecen en las dos imágenes, en la del DAPI las máscaras azules coinciden con los núcleos y en la de FITC las máscaras rojas coinciden con los acúmulos.

Tras la segmentación, se aplicaron una serie de algoritmos matemáticos para calcular el número de núcleos, el número de acúmulos de Huntingtina, así como el área de éstos. Además, se detectaron los acúmulos que se encontraban en los núcleos celulares y se cuantificó el número y el área de estos, así como el número de núcleos que presentaba dichos acúmulos.

## 5.4 Cuantificación de proteínas en tejido murino.

La cuantificación de Huntingtina y Darpp32 en el estriado de los ratones heterocigotos se realizó por Western Blot, método que mediante tres procedimientos (separación, electrotransferencia e inmunodetección) permite identificar y cuantificar proteínas específicas de una mezcla compleja, como los tejidos.

### 5.4.1 Extracción y cuantificación de proteína total.

Se extrajo alrededor de 200 mg de cada tejido de interés *post mortem*. Para la obtención del total de proteína de cada tejido, se ha empleado el tampón de extracción de proteína RIPPA (tabla 14). Se adicionaron 300  $\mu$ l de RIPPA junto con una bola de acero a cada muestra almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se colocaron en el disruptor celular TissueLyser LT (Qiagen, Alemania) durante 5 minutos a 50 Hz para disgregar el tejido. Seguidamente, fueron centrifugadas a máxima velocidad durante cinco minutos y se almacenaron los sobrenadantes a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El contenido proteico de todas las preparaciones se determinó por el método de Bradford, siguiendo las especificaciones del kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se construyó, en primer lugar, una curva patrón de albumina sérica bovina, a partir de una solución de concentración 1 mg/ml. A continuación, se añadieron a cada punto de la curva y a cada muestra 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford en dilución 1:50 proporcionado por el kit. Las reacciones se incubaron durante media hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , y finalmente, se midió su absorbancia a 550 nm en el espectrofotómetro Halo Led 96 (Dynamica, Reino Unido). Para determinar la concentración de proteína, cada valor de absorbancia correspondiente a cada muestra se interpoló en la curva patrón.

### 5.4.1 Electroforesis en gel SDS-PAGE.

En primer lugar, se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE para separar las proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico en condiciones desnaturizantes. Los extractos celulares se prepararon en alícuotas que contenían 20 ng de proteína total, donde se les añadió el tampón de desnaturización de proteínas Laemmli 1x (tabla 14) y agua destilada hasta completar un volumen de 20  $\mu$ L. Posteriormente, se completó la desnaturización de las proteínas calentando cada muestra a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Se prepararon geles SDS-PAGE para la realización de la electroforesis. Éstos estaban formados por un gel superior concentrador, que contiene un 4% de acrilamida-bisacrilamida, y un gel inferior de separación, que contiene un 8%. Además, el contenido de los geles estaba compuesto por una mezcla de agentes desnaturizantes y agentes polimerizantes (tabla 14). Las muestras se cargaron en los geles junto con el marcador preteñido de peso molecular de 11 a 245 kDa

(ab116028. Abcam, Reino Unido) sobre el equipo de electroforesis Miniprotean de Bio-RAD, sumergido en el tampón de electroforesis (tabla 14). Los geles fueron sometidos a una corriente eléctrica de 60 V para concentrar las proteínas en el gel concentrador, y de 140 V para separar las proteínas en el gel separador.

#### 5.4.2 Electotransferencia.

Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ premium 0.2 μm (GE Healthcare, Estados Unidos), mediante transferencia electroforética. Para ello, se enfrentó el gel que contiene las proteínas con la membrana de nitrocelulosa, de tal manera que se formó un sándwich en el que el conjunto gel-membrana quedó en el centro, rodeado de una capa de papel de filtro y una capa de esponja por ambos lados. El sándwich de transferencia se colocó en un soporte Miniprotean de Bio-RAD, sumergido en el tampón de transferencia (tabla 14) y se sometió a una corriente eléctrica de 100 V durante 1 hora y 30 minutos. De esta forma, las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa, donde se adhirieron. Para comprobar que la transferencia fue exitosa, cada membrana fue teñida de forma reversible con Ponceau S. Finalmente, las membranas que contenían las proteínas se lavaron con el tampón TBS-T (tabla 14) para eliminar la tinción.

#### 5.4.3 Inmunodetección.

Por último, las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en agitación continua para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a su superficie. Por tanto, éstas se colocaron en cubetas donde se adicionó una solución de bloqueo compuesta de tampón TBS-T con leche desnatada al 5% p/v. Una vez bloqueadas, las membranas se cortaron, tomando como referencia las bandas del marcador preteñido y cada fragmento se incubó con el correspondiente anticuerpo primario (tabla 15), diluido en solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C en agitación. A continuación, se realizaron tres lavados con TBS-T y se realizó una incubación con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (tabla 15), diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se retiró el anticuerpo secundario y se lavó la membrana con TBS-T del mismo modo que se hizo cuando se retiró el anticuerpo primario.

Por último, los fragmentos de membrana fueron revelados siguiendo las especificaciones del kit de detección de Western-Blot Amersham™ ECL™ Prime (Cytiva, Estados Unidos). Se realizó una mezcla 1:1 de los dos reactivos proporcionados por el kit para constituir el sustrato de la peroxidasa de los anticuerpos secundarios, que dio lugar a la generación de un producto quimioluminiscente. Las membranas se introdujeron en el equipo Amersham™ Imager 600, el



cual generó imágenes digitales del Western Blot. Finalmente, se cuantificó la densidad de las bandas empleando el software Image Studio™ Lite.

Tabla 14. Componentes de los tampones para la realización de los Western Blot.

RIPPA		Laemmli 4x	
NaCl	150 mM	Dodecilsulfato sódico	4%
Tritón X-100	1%	β-mercaptoetanol	10%
Ácido etilendiaminotetraacético	1 mM	Glicerol	20%
Dodecilsulfato sódico	1%	Bromofenol azul	0,5 mg/ml
Sodio desoxicolato	0,5%	Tris-HCl pH 6,8	125 mM
Tris-HCl pH 7,2	50 mM		
Inhibidor de proteasas	1x		

Gel concentrador		Tampón de electroforesis	
Acrilamida-bisacrilamida	4%	Tris-HCl pH 8,7	20 mM
Dodecilsulfato sódico	0,1%	Glicina	200 mM
Persulfato amónico	0,1%	Dodecilsulfato sódico	0,1%
N,N,N',N' Tetrametiletildiamina	0,08%		
Tris-HCl pH 6.8	1 M		

Gel separador		Tampón de electrotransferencia	
Acrilamida-bisacrilamida	8 o 12%	Tris	5 mM
Dodecilsulfato sódico	0,1%	Glicina	10 mM
Persulfato amónico	0,1%	Metanol	20%
N,N,N',N' Tetrametiletildiamina	0,08%		
Tris-HCl pH 8.8	1,5 M		

TBS-T	
Tris	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%

Tabla 15. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la inmunodetección.

Primario			Secundario		
Nombre	Dilución	Referencia	Nombre	Dilución	Referencia
Anti-Htt	1:5000	ab109115, Abcam	Anti-Rb IgG - HRP	1:5000	ab97051, Abcam
Anti-Darpp32	1:5000	ab40801, Abcam			
Anti-β-tubulina	1:5000	ab6046, Abcam			

## 6. Validación del compuesto 4QMn en ratones zQ175neo heterocigotos.

### 6.1 Primer experimento piloto.

El objetivo de este primer ensayo fue evaluar la administración de varias dosis y varias vías de administración. Para ello, se administraron las dosis de 10 y 20 mg/kg de 4QMn por vía IG tres veces a la semana (lunes, miércoles y viernes) y una dosis de 5 mg/kg *ad libitum* 5 días a la semana a ratones zQ175neo heterocigotos de ambos sexos de 22 semanas de edad, durante un total de 28 semanas (tabla 16). El grupo control fue administrado con Tris-HCl 1M pH 7.2 por vía IG.

Durante el transcurso del ensayo, por un lado, se extrajo alrededor de 200 µl de sangre de la vena facial de todos los ratones cada mes. Se evaluó la expresión de varios marcadores sanguíneos de progresión de la enfermedad descritos en bibliografía por qPCR (apartado 5.2 de Materiales y Métodos). Además, los ratones se pesaron cada semana con el objetivo de preparar la dosis a administrar y controlar su bienestar. Además, se tomó registro de su supervivencia. Por otro lado, se realizó una grabación mensual para evaluar el fenotipo motor (apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Finalmente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical transcurridas las 28 semanas de duración del estudio. Inmediatamente después, se extrajeron ambos estriados de cada ratón, uno de ellos fue destinado a la evaluación de los agregados de Huntingtina por Inmunohistoquímica (apartado 5.3 de Materiales y Métodos) y el otro para la evaluación de los marcadores de progresión de la EH descritos en bibliografía por qPCR (apartado 5.2 de Materiales y Métodos).

Tabla 16. Primer experimento piloto.

Edad inicial	Compuesto	Vía	Dosis	Ratones zQ175neo	Edad final
22 semanas	Tris-HCl	IG	1 M pH 7,2	2 ♂ y 4 ♀	50 semanas
	4QMn	IG	10 mg/kg	2 ♂ y 5 ♀	
			20 mg/kg	2 ♂ y 5 ♀	
		<i>ad libitum</i>	5 mg/kg	7 ♀	

### 6.2 Segundo experimento piloto.

En base a los resultados obtenidos en el primer ensayo, se desarrolló un nuevo estudio cuyo objetivo fue evaluar si el compuesto 4QMn era capaz de modificar la expresión génica de los marcadores de la EH en el cuerpo estriado en un periodo de tiempo menor. Para ello, se les administró 4QMn *ad libitum* a 10 ratones de ambos sexos de 55 semanas de edad durante 4 semanas (tabla 17). Se realizó una grabación a tiempo inicial y final del estudio para valorar el

fenotipo motor (apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Por otro lado, se registró el peso y la supervivencia de todos los ratones cada semana. Finalmente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y de nuevo, el cuerpo estriado fue extraído inmediatamente. De las dos secciones de cuerpo estriado de cada ratón, una fue destinada a la evaluación de los agregados de Huntingtina por Inmunohistoquímica (apartado 5.3 de Materiales y Métodos) y la otra para la evaluación de los marcadores de progresión de la EH descritos en bibliografía por qPCR (apartado 5.2 de Materiales y Métodos).

Tabla 17. Segundo experimento piloto.

Edad inicial	Vía	Compuesto	Dosis	Ratones zQ175neo	Edad final
55 semanas	<i>ad libitum</i>	H <sub>2</sub> O		5 ♂ y 5 ♀	59 semanas
		4QMn	5 mg/kg	5 ♂ y 5 ♀	

### 6.3 Primer ensayo de eficacia.

En base a los resultados obtenidos, se realizó un tercer ensayo para validar el fármaco en ratones de mayor edad a largo plazo. Éste consistió en la administración de 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* a ratones de ambos sexos de 55 semanas de edad durante 42 semanas (tabla 18). Se registró el peso y la supervivencia de todos los ratones cada semana. Por otro lado, se realizaron grabaciones para la evaluación del fenotipo motor cada dos meses (apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Trascurridas 42 semanas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente se extrajo el cuerpo estriado de cada animal. El estriado de cada ratón fue destinado a la cuantificación de Huntingtina anómala por Western Blot (apartado 5.4 de Materiales y Métodos), la evaluación de los cúmulos de Huntingtina por Inmunohistoquímica (apartado 5.3 de Materiales y Métodos) y la evaluación de los marcadores de la enfermedad descritos en bibliografía por qPCR (apartado 5.2 de Materiales y Métodos).

Tabla 18. Primer ensayo de eficacia del compuesto 4QMn.

Edad inicial	Vía	Compuesto	Dosis	Ratones zQ175neo	Edad final
55 semanas	<i>ad libitum</i>	H <sub>2</sub> O		6 ♂ y 8 ♀	97 semanas
		4QMn	5 mg/kg	4 ♂ y 6 ♀	

### 6.4 Segundo ensayo de eficacia.

Este estudio fue diseñado para evaluar el efecto del compuesto 4QMn sobre la Huntingtina anómala en diferentes órganos de los ratones zQ175neo de avanzada edad (72 semanas). Éstos fueron administrados con 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* durante un mes (tabla 19).

Se registró el peso y la supervivencia de todos los ratones cada semana. Por otro lado, se realizó una grabación a inicio y término del estudio para valorar el fenotipo motor (apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Finalmente, los ratones fueron sacrificados 4 semanas después del inicio del estudio. Inmediatamente después, diferentes órganos (bazo, cerebro, corazón, hígado, músculo, páncreas y riñón) fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido y conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para evaluar la Huntingtina por Western Blot (apartado 5.4 de Materiales y Métodos).

Tabla 19. Segundo ensayo de eficacia del compuesto 4QMn.

Edad inicial	Vía	Compuesto	Dosis	Ratones zQ175neo	Edad final
72 semanas	<i>ad libitum</i>	H <sub>2</sub> O		2 ♂	76 semanas
		4QMn	5 mg/kg	2 ♂	

## 7. Análisis estadístico.

Todos los datos que comparan dos grupos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t-Student para datos no apareados mediante el software GraphPad Prism v8.4. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  con una confianza del 95%. Los resultados gráficos se representaron como media  $\pm$  SEM y se analizaron estadísticamente comparando las muestras de diferente manera en función del objetivo del estudio. En los ensayos destinados a caracterizar la cepa zQ175neo, se compararon los resultados obtenidos entre ratones WT y ratones transgénicos zQ175 heterocigotos, y la representación de los datos se realizó normalizando al grupo C57BL/6J como control de referencia de forma que los datos definieron la diferencia debida a la cepa transgénica. La representación de los datos resultantes de los ensayos para la validación del compuesto 4QMn, donde se compararon los ratones transgénicos heterocigotos tratados con 4QMn con los no tratados, se realizó normalizando al grupo de ratones transgénicos heterocigotos no tratado como control de referencia de forma que los datos definieron la diferencia originada por el tratamiento con 4QMn.

## 8. Estudio del mecanismo de acción del 4QMn en *C. elegans*.

En base a los resultados de los estudios con 4QMn realizados en colaboración con el CIPF, que sugirieron que la activación de la autofagia por nuestro compuesto en células deficitarias de autofagia podría estar mediada por la ruta de AMPK, hipotetizamos que la activación de la autofagia por 4QMn podría estar mediada también por la ruta de AMPK en células que sobreexpresasen Huntingtina. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron varios experimentos en *C. elegans* en colaboración con el IIS La Fe.

## 8.1 Mecanismo de acción relacionado con AMPK.

Se emplearon animales transgénicos que expresan 40 repeticiones del triplete CAG (cepa AM141; genotipo-rmls133[unc-54p::40Q::YFP]). Además, se empleó la misma cepa con una mutación en *aak-2*, proteína que conforma el centro activo de la enzima AMPK (40Q; *aak-2*), que regula diferentes procesos metabólicos, incluida la autofagia. Ambas cepas dan lugar a cúmulos proteicos a lo largo de todo el organismo, fenotipo cuantificable porque los agregados colapsan en cuerpos de inclusión que son fácilmente observados en un estereoscopio equipado con fluorescencia. El estudio consistió en determinar el efecto del 4QMn en el número de agregados en los animales tras la administración del compuesto a animales de ambas cepas en estadio larvario L1 hasta su desarrollo a joven-adulto, en el cual ya se han empezado a formar los agregados proteicos.

En primer lugar, se realizó la embrioprep. Para ello, se recogieron en medio M9 estéril ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42 mM, NaCl 85,5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM) los animales y huevos de 5 placas amplificadas durante 72 horas. Se centrifugaron durante un minuto a 1.500 rpm y se les añadió la solución disgregante (hipoclorito sódico y NaOH 625 mM) para eliminar los animales, dejando intactos los huevos. Tras tres lavados con M9 sin suplementos, los huevos se mantuvieron 24 horas a 20°C en agitación. En este punto, los huevos eclosionan dando lugar a larvas en estadio L1 sincronizadas, que no se desarrollan en este medio.

A continuación, se llevaron a cabo los cultivos en líquido de los animales en estadio L1. Cada cultivo fue preparado en tubos que contuvieron 1500 larvas, 1ml de un cultivo de la bacteria OP50 resistente a estreptomicina, colesterol 5 µg/ml, nistatina 12,5 µg/ml y estreptomicina 10 µg/ml en medio M9. Para cada condición, se le añadió agua o 4QMn 20 µM como las condiciones de control o tratamiento respectivamente. Los cultivos se incubaron en agitación a 20°C durante 96 horas.

Finalmente, se contaron los agregados de 10 animales en estadio joven adulto por condición. El experimento se realizó por triplicado para la obtención de tres réplicas biológicas. Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba t-Student para datos no apareados mediante el software GraphPad Prism v8.4. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  con una confianza del 95%. Los resultados gráficos se representaron como media  $\pm$  SEM y se analizaron estadísticamente tomando el grupo no tratado (al que se le añadió agua) como control de referencia de forma que los datos definieron la diferencia originada por el tratamiento con 4QMn.

## 8.2 Mecanismo de acción relacionado con *Lgg-1* y *Bec-1*.

Se emplearon animales transgénicos que expresan 40 repeticiones del triplete CAG (cepa AM141; genotipo-rmls133[unc-54p::40Q::YFP]) cuyos genes *Lgg-1* y *Bec-1* fueron silenciados por interferencia mediada por ARN (RNAi) inducido con IPTG. Los agregados de estas construcciones también colapsan en cuerpos de inclusión que son fácilmente observados en un estereoscopio equipado con fluorescencia. El estudio consistió en determinar el efecto del 4QMn en el número de agregados de los animales sin genes silenciados y con los genes *Lgg-1* y *Bec-1* silenciados en el estadio joven-adulto de su desarrollo, en el cual ya se han empezado a formar los agregados proteicos. Se administró metformina como control positivo, un fármaco que induce la activación de la enzima AMPK en modelos animales de EH (*C. elegans* y roedores), induce protección celular, reduce la agregación de mHtt y reduce la inflamación.

En primer lugar, se realizó la embrioprep. Para ello, se recogieron los animales y huevos de 5 placas amplificadas durante 72 horas en medio M9 estéril (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM). Se centrifugaron durante un minuto a 1.500 rpm y se les añadió la solución disgregante (hipoclorito sódico y NaOH 625 mM) para eliminar los animales, dejando los huevos intactos. Tras tres lavados con M9 sin suplementos, se mantuvieron 24 horas a 20°C en agitación, los cuales eclosionaron dando lugar a larvas en estadio L1 sincronizadas, que no pueden desarrollarse en este medio.

A continuación, se llevaron a cabo los cultivos en líquido de los animales en estadio L1. Cada cultivo fue preparado en tubos que contuvieron 1500 larvas, 1 ml de un cultivo de la bacteria OP50 resistente a estreptomicina, colesterol 5 µg/ml, nistatina 12,5 µg/ml y estreptomicina 10 µg/ml en medio M9. Para cada condición, se le añadió agua, metformina 2 mM o 4QMn 20 µM para obtener las condiciones de control, control positivo o tratamiento respectivamente. Los cultivos se incubaron en agitación a 20°C durante 48 horas.

Seguidamente, se realizó el silenciamiento génico por RNAi en medio líquido. Para ello, se añadió IPTG 4 µM a los cultivos de las bacterias resistentes a carbamicina que contienen los vectores con *Lgg-1*, *Bec-1* y una tercera cepa sin vector (EV) previamente crecidos. Tras dos horas a 37°C en agitación, las bacterias se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en M9. Por otro lado, se lavaron los animales con M9 y de nuevo se prepararon los cultivos en tubos con 1 ml de un cultivo de la bacteria correspondiente resistente a carbamicina previamente inducida, colesterol 5 µg/ml, nistatina 12,5 µg/ml, carbamicina 10 µg/ml, IPTG 4 µM y la correspondiente condición (agua, metformina 2 mM o 4QMn 20 µM). Los cultivos se incubaron en agitación durante 48 horas a 20°C.

Finalmente, se contaron los agregados de 10 animales en estadio joven adulto por condición. El experimento se realizó por duplicado para la obtención de dos replicas biológicas. Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba ANOVA unidireccional ordinaria comparando las muestras tratadas frente a las muestras control (sin tratamiento) mediante el software GraphPad Prism v8.4. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  con una confianza del 95%. Los resultados gráficos se representaron como media  $\pm$  SEM normalizando al grupo no tratado como control de referencia de forma que los datos definieron la diferencia originada por el tratamiento con metformina o 4QMn.

## RESULTADOS



## RESULTADOS

Los resultados de estudios realizados en Bionos Biotech S.L. en *E. coli*, *S. cerevisiae*, embriones del pez *O. latipes*, fibroblastos humanos y modelos de la EH en *C. elegans* revelaron que el compuesto 4QMn actúa por un mecanismo de doble protección celular frente al estrés oxidativo mediante su acción catalítica como mimético de la enzima SOD y también por su capacidad de estimular o activar la autofagia y la actividad del proteosoma. Por tanto, el compuesto 4QMn podría reducir las perturbaciones en el estado redox de las células, las cuales pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan múltiples componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Por otro lado, la acumulación de proteínas defectuosas que se produce en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EH que acumula depósitos de Huntingtina (Menalled, 2005), podría ser contrarrestada por el 4QMn mediante una activación de la autofagia y el proteosoma que daría lugar a un incremento de la tasa de degradación de estos depósitos y, como consecuencia, se reducirían los síntomas de la enfermedad.

El objetivo de esta tesis fue, en primer lugar, determinar la toxicidad y la accesibilidad del compuesto 4QMn al cerebro *in vivo* de ratones WT. Por otro lado, caracterizar los ratones zQ175neo heterocigotos como modelo murino de la EH y, finalmente, evaluar la eficacia del compuesto sobre este modelo.

### 1. Ensayos de toxicidad aguda y crónica en ratones *wild type*.

La toxicidad puede definirse, en general, como la capacidad de una sustancia para causar daño o provocar la muerte. Es fundamental determinar el perfil de toxicidad del candidato a fármaco en su proceso de desarrollo. Nuestro estudio de toxicidad del compuesto 4QMn se realizó en ratones WT de la cepa C57BL/6J con el objetivo principal de determinar la dosis no tóxica con la que realizar los estudios de eficacia posteriormente.

#### 1.1 Ensayos de dosis límite.

En primer lugar, se determinó la dosis límite a partir de la cual seguir trabajando. El ensayo de dosis límite consistió en la administración de diferentes cantidades de 4QMn a ratones de la cepa WT por vía IG hasta obtener la muerte de algún individuo tras 48 horas. El ratón tratado con 2000 mg/kg murió 5 minutos después, los demás ratones se mantuvieron con vida los dos días (tabla 20).

Tabla 20. Resultados del primer ensayo de dosis límite.

Dosis IG (mg/kg)	Ratones C57BL/6J	Tiempo total de observación (h)	Muerte
25	3 ♂ + 3 ♀	48	No
200	3 ♂ + 3 ♀	48	No
2000	1 ♂	1	Sí

Por tanto, se inició un segundo ensayo de dosis límite a partir de 500 mg/kg. En este caso, el ratón tratado con 1000 mg/kg murió al cabo de una hora, en cambio, los ratones tratados con 500 mg/kg sobrevivieron. Por tanto, se obtuvo una dosis no tóxica de 500 mg/kg por vía IG (tabla 21).

Tabla 21. Resultados del segundo ensayo de dosis límite.

Dosis IG (mg/kg)	Ratones C57BL/6J	Tiempo total de observación (h)	Muerte
500	3 ♂ + 3 ♀	48	No
1000	1 ♂	48	Sí

Para poder estudiar varias vías de administración en los ensayos posteriores, una vez fijada la dosis por vía oral, se realizó un nuevo ensayo para determinar la dosis límite por vía IP. La administración IP de 10 mg/kg de 4QMn a un ratón le ocasionó aturdimiento y parálisis alrededor de una hora después. En cambio, una dosis diez veces menor no ocasionó la muerte de ningún animal, por tanto, se estableció 1 mg/kg como dosis límite por vía IP (tabla 22).

Tabla 22. Resultados del tercer ensayo de dosis límite.

Dosis IP (mg/kg)	Ratones C57BL/6J	Tiempo total de observación (h)	Muerte
1	3 ♂ + 3 ♀	48	No
10	1 ♂	1	Aturdimiento, parálisis

## 1.2 Ensayo de toxicidad aguda.

En segundo lugar, una vez se estableció la dosis límite por ambas vías de administración, se inició un ensayo de toxicidad aguda para establecer la dosis que ocasiona daño en el organismo. Este ensayo evaluó los efectos nocivos en el hígado durante un período de 14 días, después de la administración de una dosis única de 4QMn de 1 y 0,1 mg/kg por vía IP (tabla 23). La supervivencia de todos los grupos fue del 100%. La toxicidad hepática se evaluó mediante la cuantificación de la actividad ALT en plasma, siendo el nivel basal menor de 0,1 U/ml (Yang et al., 2009). No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de actividad ALT a término y al inicio del ensayo, por lo que se concluyó que las dosis de 1 y 0,1 mg/kg administradas por vía IP no produjeron toxicidad hepática tras 14 días en los ratones tratados (figura 14). Para determinar el posible efecto nocivo del compuesto, también se evaluó el bienestar de los

animales registrando el peso corporal inicial y de las dos siguientes semanas (figura. 15). El peso de los animales pertenecientes al grupo control y tratamiento se incrementó durante el estudio pese a que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con 4QMn respecto al grupo control (NaCl 0,9%).

Tabla 23. Resultados del ensayo de toxicidad aguda.

Compuesto	Dosis IP	Ratones C57BL/6J	Tiempo total del estudio (d)	Muerte
NaCl	0,90%	2 ♂ + 3 ♀	14	0
4QMn	0,1 mg/kg	3 ♂ + 2 ♀	14	0
	1 mg/kg	2 ♂ + 3 ♀	14	0

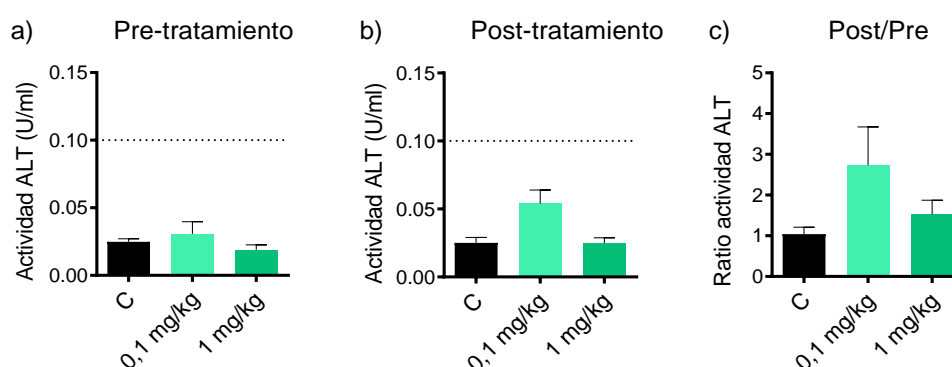


Figura 14. Niveles de actividad ALT en plasma en el ensayo de toxicidad aguda. a) Niveles ALT a día 0, estado basal. b) Niveles ALT a día 14, previo sacrificio. c) Ratio entre los niveles del día 14 y los basales.

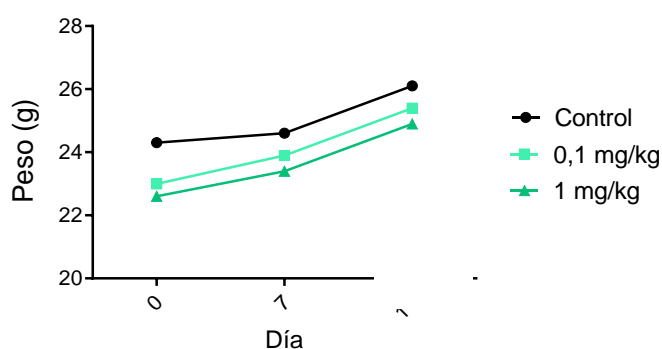


Figura 15. Peso corporal de los ratones del ensayo de toxicidad aguda.

### 1.3 Ensayos de toxicidad crónica.

Finalmente, se evaluó la capacidad del compuesto 4QMn de causar daños a largo plazo para ajustar al máximo posible la dosis óptima de trabajo. El primer ensayo de toxicidad crónica consistió en la administración de una dosis de 1, 2 y 5 mg/kg tres días a la semana (lunes, miércoles y viernes) durante un mes por vía IP (tabla 24). Durante el ensayo de toxicidad crónica

se registró la supervivencia, así como el peso corporal de los ratones y se determinó la relación del peso del hígado respecto al peso corporal de cada animal. El resultado fue una supervivencia del 100% de los ratones pertenecientes al grupo control y de los tratados con la dosis IP de 1 mg/kg. Un ratón tratado con 2 mg/kg y otro con 5 mg/kg murieron después de 8 y 12 días del inicio del ensayo respectivamente, dando lugar a una supervivencia grupal del 80% (figura 16).

Tabla 24. Resultados del primer ensayo de toxicidad crónica.

Compuesto	Dosis IP	Ratones C57BL/6J	Tiempo total del estudio (d)	Muerte
NaCl	0,90%	3 ♂ + 2 ♀	28	0
4QMn	1 mg/kg	2 ♂ + 3 ♀	28	0
	2 mg/kg	3 ♂ + 2 ♀	28	1
	5 mg/kg	3 ♂ + 2 ♀	28	1

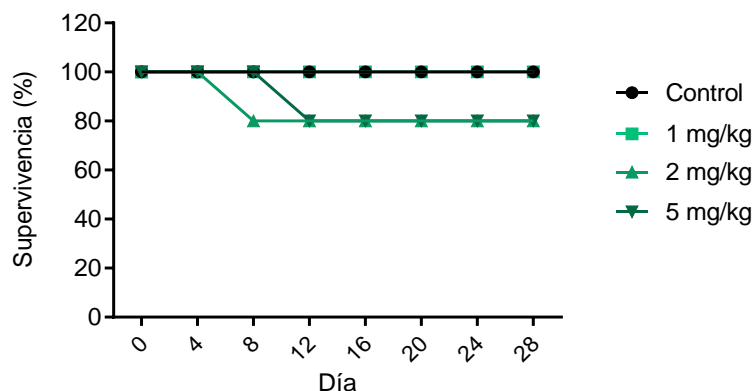


Figura 16. Registro de la supervivencia del primer ensayo de toxicidad crónica.

Por otro lado, como resultado, no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal de los ratones y la relación del peso del hígado respecto su peso corporal en los ratones tratados respecto el grupo control, (figura 17). Por tanto, estos parámetros no se vieron influenciados por la administración del compuesto.

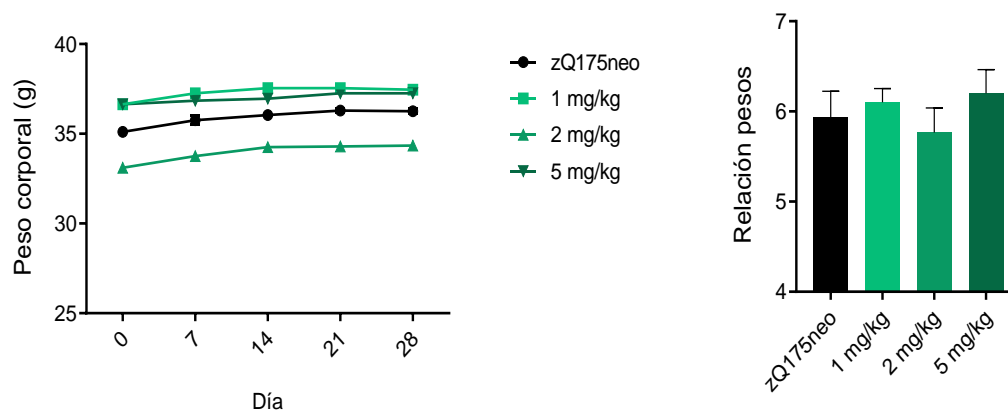


Figura 17. Peso y relación del peso hepático con el peso corporal.

Durante este mismo ensayo se observó que la administración continua por vía IP a largo plazo produjo dolor e incluso pequeñas heridas en el animal, lo cual imposibilitó el empleo de esta vía de administración para futuros ensayos de eficacia a largo plazo. Por tanto, con el objetivo de refinar el procedimiento, cumpliendo así con uno de los principios básicos de la experimentación con animales, se realizó un nuevo experimento para evaluar la toxicidad crónica administrando el compuesto a las dosis de 5, 10 y 50 mg/kg por vía IG tres veces a la semana durante tres meses (tabla 25). Se observó la supervivencia y el peso de los ratones cada semana, así como los valores de actividad ALT en plasma cada 15 días y la presencia de células inflamatorias en el hígado a término como indicadores de daño hepático.

Tabla 25. Resultados del segundo ensayo de toxicidad crónica.

Compuesto	Dosis IG	Ratones C57BL/6J	Tiempo total del estudio (d)	Muerte
Tris-HCl	1 M pH 7,2	1 ♂ + 2 ♀	90	1
4QMn	5 mg/kg	2 ♂ + 1 ♀	90	1
	10 mg/kg	1 ♂ + 2 ♀	90	0
	50 mg/kg	2 ♂ + 1 ♀	90	2

En cuanto a la supervivencia, todos los ratones tratados con 10 mg/kg sobrevivieron. En cambio, un ratón tratado con 5 mg/kg y un ratón perteneciente al grupo control murieron transcurridas 7 y 9 semanas respectivamente, por tanto, la supervivencia de ambos grupos fue del 66%. Dos de los ratones tratados con 50 mg/kg murieron a las 4 y 5 semanas del inicio del ensayo, de tal forma que la supervivencia de este grupo se redujo al 33% (figura 18). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el peso de los ratones tratados ni controles a lo largo del ensayo, es decir, no hubo cambios superiores al 20%, por lo que se pudo concluir que el peso de los ratones no se vio influido por el tratamiento por vía IG (figura 18).

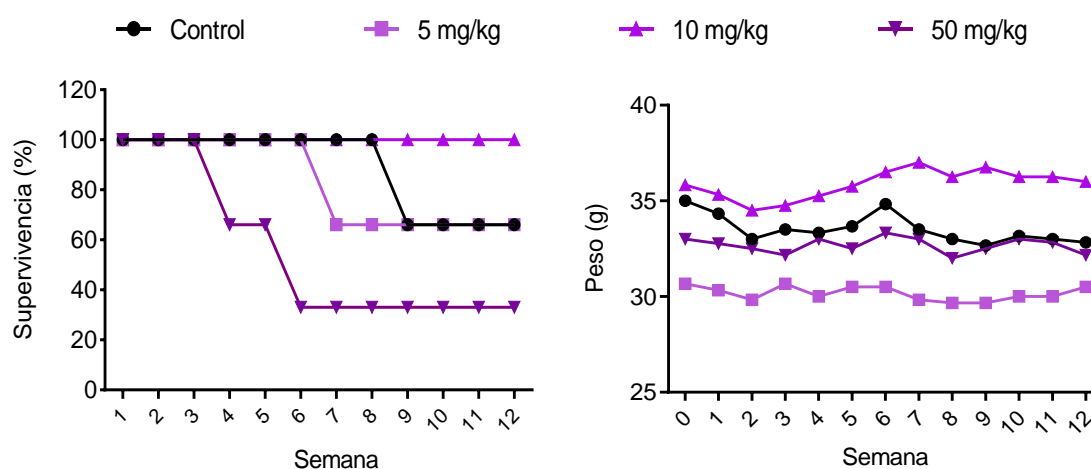


Figura 18. Supervivencia y peso corporal de los ratones durante el transcurso del segundo experimento de toxicidad crónica.

En cuanto la evaluación del daño hepático, por un lado, solo la dosis de 50 mg/kg produjo niveles tóxicos de actividad ALT (superior a 0,1 U/ml) a los 30 días (figura 19). No se alcanzaron niveles tóxicos por el tratamiento con el resto de las dosis inferiores, por tanto, se concluyó que la administración de 5 y 10 mg/kg de 4QMn por vía IG durante 3 meses no produjo toxicidad hepática. Además, por otro lado, los resultados mostraron inflamación hepática claramente visible solo en el ratón administrado con 50 mg/kg durante tres meses, evidente por la presencia de células inflamatorias (Canet et al., 2012) (figura 20). Por tanto, se concluyó que solo la dosis de 50 mg/kg por vía IG produjo daño hepático en el ratón tratado que sobrevivió.

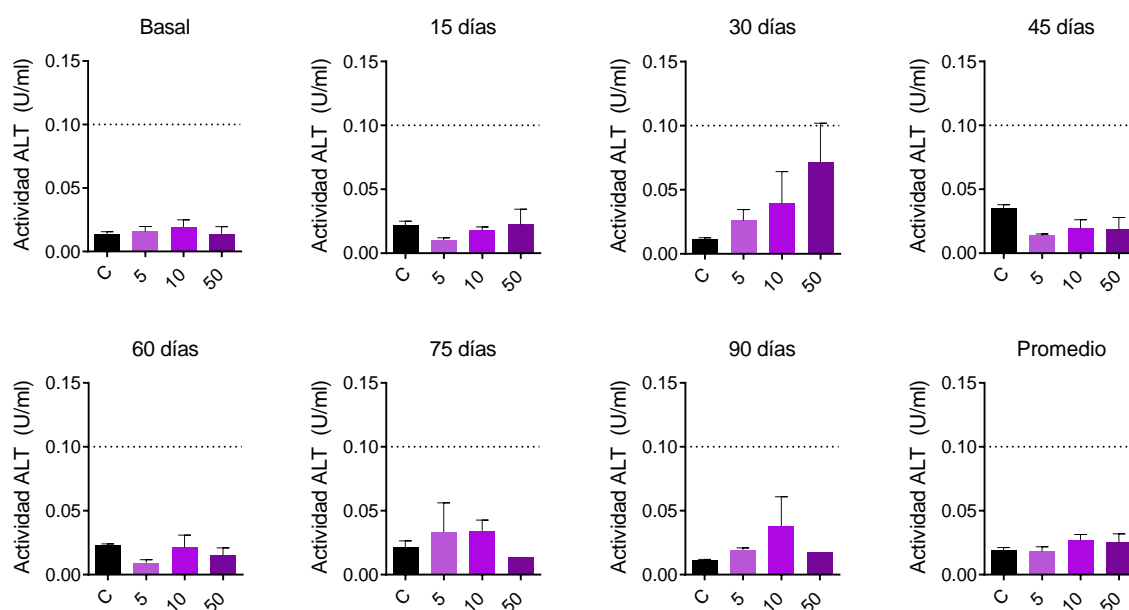


Figura 19. Valores de actividad ALT en plasma durante el experimento de toxicidad crónica.

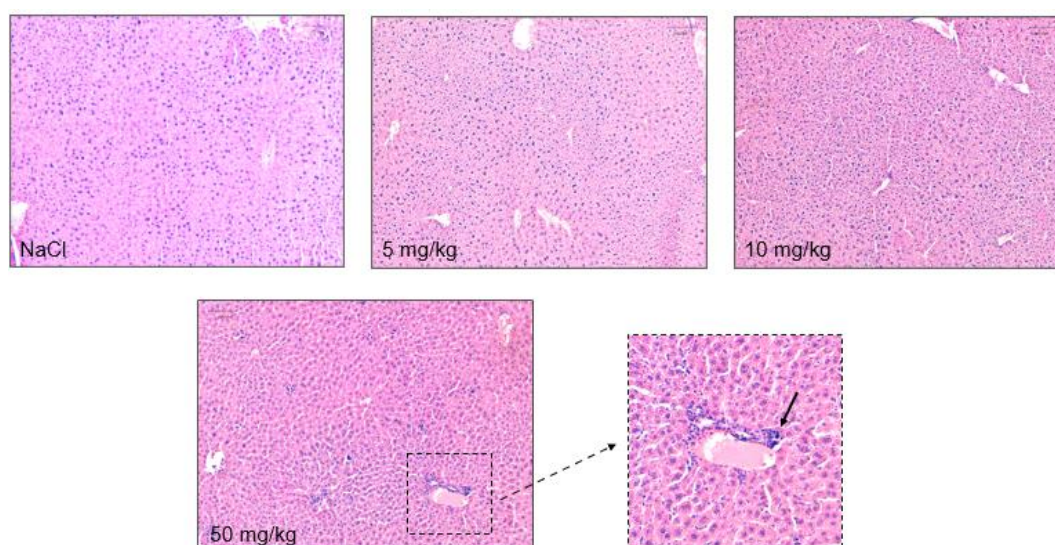


Figura 20. Imágenes de la tinción con H-E del hígado representativas de cada grupo de animales del segundo experimento de toxicidad crónica. Solo se observaron células inflamatorias en el hígado de ratones tratados a la dosis de 50 mg/kg (flecha).

## 2. Determinación de la presencia de 4Q en tejidos de ratones *wild type*.

El principal objetivo fue determinar si el compuesto es capaz de circular por el torrente sanguíneo y atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para llegar al cerebro, donde tendría lugar su actividad puesto que los depósitos de Htt característicos de la EH se encuentran en las neuronas, principalmente en las de proyección estriatal (Wright et al., 2019).

### 2.1 Detección del compuesto 4Q por UPLC-MS/MS.

La detección de la molécula 4Q se puso a punto por UPLC-MS/MS en la Unidad Analítica del IIS La Fe. Se detectó el compuesto 4Q sin estar conjugado a manganeso, puesto que la unión a este metal no es covalente. El peso molecular del 4Q ionizado es 391.3, que como resultado de su rotura por el haz de alta energía genera dos fragmentos detectables por espectrometría de masas con tamaños de 207 y 164 que aparecen con un tiempo de retención de 1.83 minutos (figura 21). En cada análisis, se incluyó un blanco para determinar el ruido de fondo por cromatografía (figura 21).

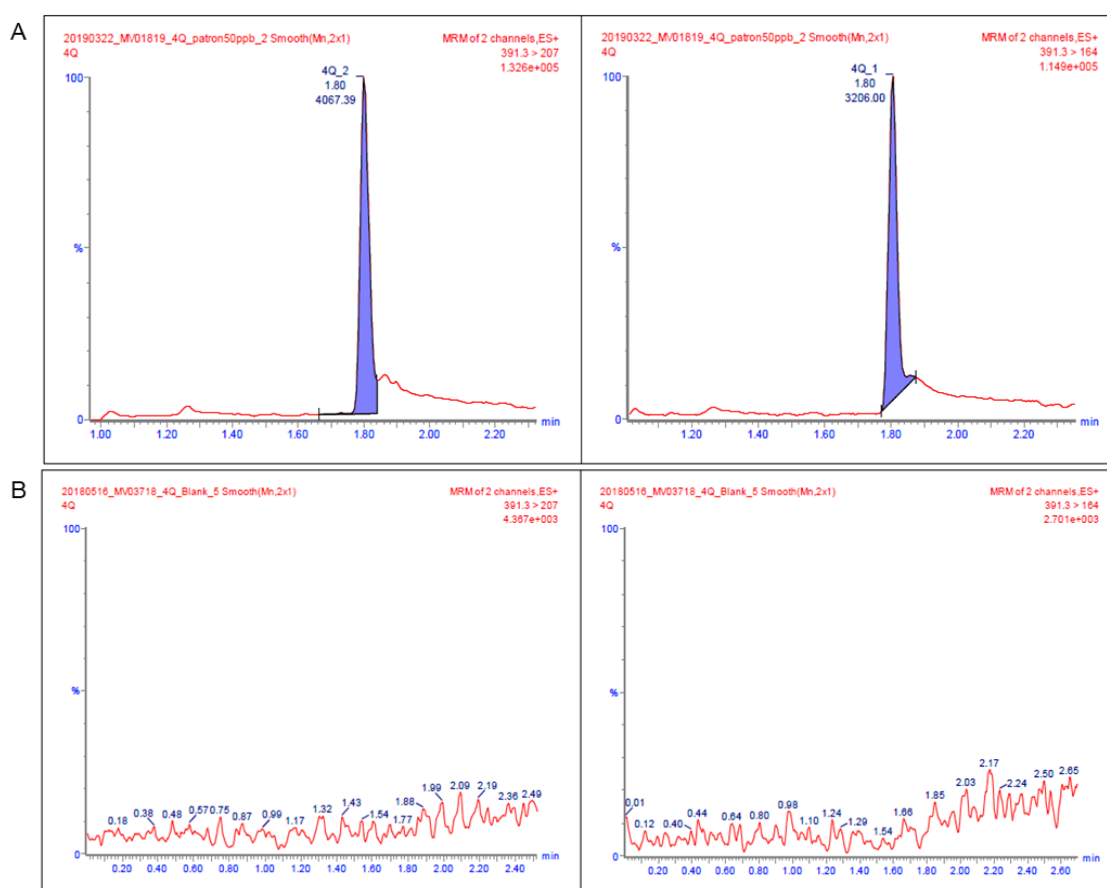


Figura 21. Cromatograma representativo de la detección de 4Q (A) y del ruido de fondo (B) en el análisis por UPLC-MS/MS.

## 2.2 Primera prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Para determinar la biodistribución del 4Q en ratones, se realizó un primer ensayo en el que se administró la dosis máxima no tóxica por vía IP (1 mg/kg) a cuatro grupos de 3 ratones de la cepa WT para evaluar la presencia del compuesto por UPLC-MS/MS transcurridos 15 minutos, 1, 4 y 24 horas (tabla 26).

La presencia o ausencia de 4Q en las muestras fue confirmada por la presencia o no de un pico cromatográfico a los 1,8 minutos (tiempo de retención) y en ambas transiciones: 391,3> 207 y 391,3> 164. Como resultado, no se detectó presencia de 4Q en ninguna de las muestras de cuerpo estriado, así como tampoco se detectó en las muestras de hígado control (ratones tratados con NaCl). Por otro lado, el 4Q se detectó en las muestras de hígado de los ratones transcurridos 15 minutos, 1, 4 y 24 horas de recibir 1 mg/kg de 4QMn por vía IP (tabla 26).

Tabla 26. Resultados de la primera prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Compuesto	Dosis IP	Ratones C57BL/6J	Tiempo analizado	4Q en estriado	4Q en hígado
NaCl	0,90%	2 ♂ + 1 ♀	24 h	No	No
4QMn	1 mg/kg	1 ♂ + 2 ♀	15 min	No	Sí
		2 ♂ + 1 ♀	1 h	No	Sí
		1 ♂ + 2 ♀	4 h	No	Sí
		2 ♂ + 1 ♀	24 h	No	Sí

Con el objetivo de cumplir las tres R, en este mismo experimento se evaluó también la toxicidad aguda del compuesto en tiempos más cortos. Los resultados mostraron que los niveles de actividad ALT a término y al inicio del ensayo no alcanzaron valores indicativos de toxicidad hepática, por lo que la administración de 1 mg/kg de 4Q por vía IP no produjo toxicidad hepática tras 24 horas (figura 22).

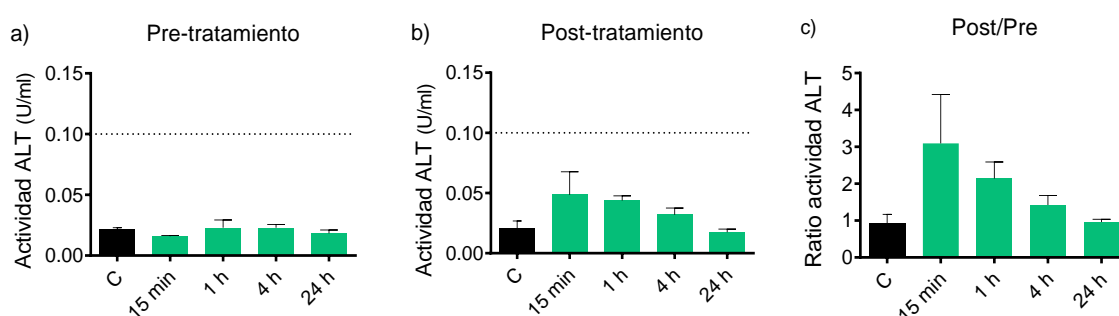


Figura 22. Niveles de actividad ALT en plasma tras tiempos cortos de tratamiento. a) Actividad basal. b) Actividad final, previo sacrificio. c) Ratio entre los niveles del día 14 y los basales.



### 2.3 Prueba de detección de 4Q en sangre.

En base la imposibilidad de implementar la vía IP como vía de administración en ensayos de eficacia del compuesto 4Q a largo plazo, así como la ausencia de 4Q en el cuerpo estriado empleando esta forma de administración, se desarrolló un nuevo ensayo para determinar si el compuesto era capaz de circular por el torrente sanguíneo de los ratones. Éste consistió en la evaluación de la presencia de 4Q en la sangre tras 30, 60 y 120 minutos de ser administrados con 20 mg/kg de 4QMn por vía IG (tabla 27), dosis menor que la tóxica tras ser administrada de forma crónica.

La presencia o ausencia de 4Q en las muestras fue confirmada por la presencia o no de un pico cromatográfico a los 1,8 minutos (tiempo de retención) y en ambas transiciones: 391,3> 207 y 391,3> 164. Se detectó 4Q en las muestras de sangre extraídas 15 minutos, 1, 4 y 24 horas después de ser administrados con 20 mg/kg de 4QMn por vía IG (tabla 27). Por tanto, se concluyó que el compuesto 4Q fue capaz de circular por el torrente sanguíneo.

Tabla 27. Resultados de la prueba de detección de 4Q en sangre.

Compuesto	Dosis IG	Ratones C57BL/6J	Tiempo analizado (min)	4Q en sangre
4QMn	20 mg/kg	2 ♂ + 1 ♀	30	Sí
		1 ♂ + 2 ♀	60	Sí
		1 ♂ + 2 ♀	120	Sí

### 2.4 Segunda prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Para determinar si el compuesto 4Q atraviesa la BHE, se desarrolló un nuevo ensayo en el que los ratones fueron administrados con una dosis superior de 4QMn por vía IP (15 mg/kg), así como por vía IN (5 mg/kg), puesto que el tracto respiratorio compone una vía directa al cerebro. La presencia del compuesto se determinó por UPLC-MS/MS transcurridos 15, 30, 60 y 120 minutos en el hígado y el cuerpo estriado de los ratones (tabla 28).

La presencia o ausencia de 4Q en las muestras fue confirmada por la presencia o no de un pico cromatográfico a los 1,8 minutos (tiempo de retención) y en ambas transiciones: 391,3> 207 y 391,3> 164. Por un lado, el ratón tratado con 15 mg/kg de 4QMn por vía IP murió a los 10 minutos, de tal forma que se suspendió la administración del compuesto por esta vía pese a que finalmente se detectó en el estriado e hígados extraídos de dicho animal. Por otro lado, el compuesto no fue detectado en el hígado de los ratones a los 15 minutos, ni en el hígado ni estriado de los ratones transcurridos 120 minutos de ser administrados por vía IN. En cambio, el 4Q fue detectado a los 15 minutos de ser administrados por vía IN, y también fue débilmente detectado en el estriado

de los ratones tras 30 y 60 minutos de ser administrados por vía IN (tabla 28). De esta forma, se concluyó que el compuesto 4Q fue capaz de atravesar la BHE.

Tabla 28. Resultados de la segunda prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Compuesto	Vía	Dosis	Ratones C57BL/6J	Tiempo analizado (min)	4Q en estriado	4Q en hígado
4QMn	IP	15 mg/kg	1 ♀	10	Sí	Sí
	IN	5 mg/kg	1 ♂ + 2 ♀	15	Sí	No
			1 ♂ + 2 ♀	30	Sí	Sí
			2 ♂ + 1 ♀	60	Sí	Sí
			2 ♂ + 1 ♀	120	No	No

## 2.5 Tercera prueba de detección de 4Q en cuerpo estriado e hígado.

Para determinar si el compuesto 4Q es capaz de atravesar la BHE siendo administrado por vía IG, se desarrolló un nuevo ensayo en el que los ratones fueron administrados con una dosis elevada de 4QMn por vía IG (50 mg/kg). La presencia del compuesto se evaluó por UPLC-MS/MS en el cerebro e hígado transcurridos 15 y 30 minutos (tabla 29).

La presencia o ausencia de 4Q en las muestras fue confirmada por la presencia o no de un pico cromatográfico a los 1,8 minutos (tiempo de retención) y en ambas transiciones: 391,3> 207 y 391,3> 164. Se detectó 4Q en los restos de cerebro y en el hígado transcurridos 15 y 30 minutos de su administración por vía IG (tabla 29). En cambio, no fue detectado en el córtex ni en el estriado, posiblemente debido a que la dilución que sufre el compuesto durante el procesamiento de las muestras imposibilita la detección por UPLC-MS/MS. De esta forma, se concluyó que el compuesto 4Q fue capaz de atravesar la BHE siendo administrado por vía IG.

Tabla 29. Resultados de la tercera prueba de detección de 4Q en cerebro e hígado

Compuesto	Dosis IG	Ratones C57BL/6J	Tiempo (min)	4Q en córtex	4Q en estriado	4Q en restos	4Q en hígado
4QMn	50 mg/kg	1 ♂ + 1 ♀	15	No	No	Sí	Sí
		1 ♂ + 1 ♀	30	No	No	Sí	Sí

## 3. Crecimiento y mantenimiento de la colonia de ratones transgénicos zQ175neo.

### 3.1 Cruces para la generación de ratones transgénicos zQ175neo.

Tras la llegada de los seis machos heterocigotos zQ175neo, los cruces para la obtención de nuevas camadas se desarrollaron con éxito durante los primeros meses. Transcurrido alrededor

de un año, las hembras empezaron a tener cada vez menos crías pese a que estaban en edad reproductora. Se realizaron varios cruces combinando diferentes progenitores masculinos evitando parentales, pero los cruces continuaron sin ser eficientes. Tras consultarlo con el veterinario a cargo del animalario, se dedujo que el problema podría ser causado por la endogamia. Por tanto, se compraron nuevas hembras WT, de 15 semanas de edad, para realizar nuevos cruces con los machos zQ175neo en edad reproductora que ya teníamos. Como resultado, los cruces volvieron a proporcionar nuevas camadas de forma que se consiguió restaurar la colonia de ratones heterocigotos de la cepa zQ175neo.

### 3.2 Genotipado.

Aproximadamente a las tres semanas de vida, las nuevas camadas se destetaron y genotiparon por PCR. El producto resultante de la amplificación fue una banda de 229 pb en ratones WT visualizada por electroforesis en gel de agarosa (figura 23). Los ratones heterocigotos presentaron una banda de 280 pb correspondiente al alelo mutado y una banda de 229 pb correspondiente al alelo WT (figura 23). Durante los tres años de tesis doctoral, se obtuvieron un total de 137 ratones de la cepa WT y 116 ratones de la cepa zQ175neo heterocigotos.

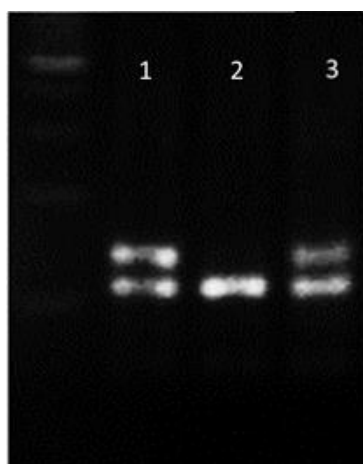


Figura 23. Gel representativo de la identificación del genotipo. 1 y 3) Dos bandas indicativo de ratones zQ175neo heterocigotos. 2) Banda de menor tamaño indicativo de ratón C57BL/6J.

## 4. Caracterización de biomarcadores en ratones zQ175neo heterocigotos.

Se caracterizaron los marcadores a partir de los cuales determinar la efectividad del compuesto 4Q en el modelo murino de la EH perteneciente a la cepa #029928 de Jackson Laboratory, Estados Unidos. Para ello se evaluaron los siguientes cuatro aspectos:

## 4.1 Fenotipo.

### 4.1.1 Pruebas locomotoras.

La elaboración de las pruebas locomotoras a lo largo del tiempo ha permitido determinar las características de nuestros ratones zQ175neo heterocigotos como modelo murino de la EH en comparación con los ratones WT. Para poder evaluar la eficacia del compuesto a nivel fenotípico, se evaluó si nuestra cepa desarrollaba un fenotipo lesivo, tal y como está descrito en bibliografía (Guyenet et al., 2010). Como resultado, los ratones jóvenes y de hasta un año no desarrollaron el fenotipo severo definido en literatura. Por tanto, la valoración de las pruebas no mostró apenas diferencias entre los ratones WT y nuestra cepa zQ175neo puesto que la manifestación del fenotipo de nuestros ratones fue leve (tabla 30). Como se describe en el apartado 5.1.1 de Materiales y Métodos, se esperaba que las valoraciones fueran alrededor de 3, en cambio, en la mayoría de las pruebas, el fenotipo más agresivo fue valorado como 1 en ratones de alrededor de un año de vida. Por tanto, en ratones de menos de un año de vida, esta evaluación no fue adecuada para desarrollar nuestros ensayos de eficacia del candidato a fármaco.

Tabla 30. Valoración de las pruebas locomotoras

	<i>C57BL/6J</i>	zQ175neo	Nuestro zQ175neo
Equilibrio	0	2-3	0-1
Movilidad	0	2-3	0-1
Orientación	0	2-3	0-1
Cifosis	0	2-3	0-1
Fuerza	0	1	0

En cambio, el fenotipo fue progresivamente más severo en ratones de un año de vida en adelante, coincidiendo así con las valoraciones esperadas indicadas en la tabla 30 para ratones zQ175neo heterocigotos. Por tanto, las pruebas locomotoras anteriormente descritas fueron definidas como marcador para la valoración del fenotipo locomotor de los ratones de más de un año de vida en los ensayos de validación del compuesto 4QMn.

### 4.1.2 Peso.

Se comparó el peso de ratones de ambos sexos de la cepa WT con el de ratones heterocigotos de la cepa zQ175neo. En primer lugar, se observó que, a partir de las 12 semanas, el peso de los machos era superior al de las hembras en ambas especies. Por otro lado, se empezaron a apreciar diferencias en el peso entre ambas especies a partir de las 12 semanas, siguiendo en ambos casos una tendencia alcista. En cambio, alrededor del año de vida, el peso de los ratones transgénicos disminuyó ligeramente, no ocurriendo lo mismo en los WT, cuyo peso siguió

aumentando con el tiempo (figura 24). Cabe destacar que ninguno de nuestros animales transgénicos experimentó una disminución del 20% o superior de su peso corporal con el tiempo.

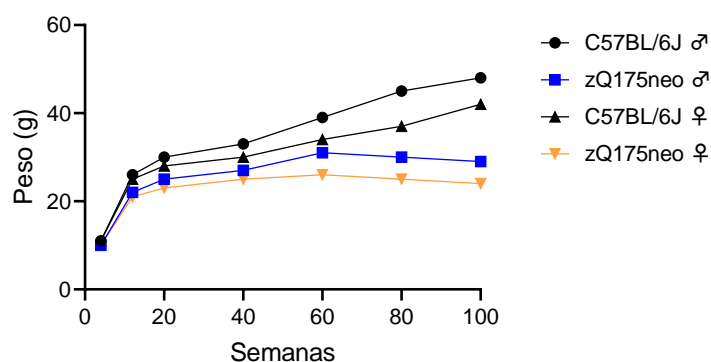


Figura 24. Peso ratones WT y zQ175neo heterocigotos a lo largo del tiempo.

## 4.2 Expresión génica.

Se evaluó la expresión de varios genes en la sangre y en el estriado de los ratones para determinar cuáles son biomarcadores de la enfermedad en los ratones zQ175neo heterocigotos.

### 4.2.1 Expresión de genes sanguíneos.

La extracción mensual de 250  $\mu$ l de sangre a cada ratón durante el experimento piloto ocasionó un elevado daño físico y anímico al animal, puesto que supuso una elevada pérdida de su volumen sanguíneo. Los animales necesitaron varios días para recuperarse de cada extracción, lo cual podría afectar a los resultados del experimento. Además, los resultados del análisis de la expresión de los genes que *Anxa3*, *Aqp9*, *Canx*, *Clk3*, *Cystm1*, *P2y5*, *S100a9*, *Serca2*, *Taf7* y *Znf238* presentaron mucha variabilidad dentro de los mismos grupos biológicos, razón añadida por la que se decidió descartar este método como forma de evaluación del efecto del compuesto 4QMn en nuestro modelo murino de EH.

### 4.2.2 Expresión de genes en el cuerpo estriado.

Se estudió la expresión de los genes *Bdnf*, *Cnr1*, *Darpp32*, *Drd2*, *Fan1*, *Mlh1*, *Nefl* y *Pde10a* descritos en la literatura como marcadores de progresión de la enfermedad. La expresión de estos genes en el estriado de ratones heterocigotos zQ175neo de ambos sexos se comparó con la de ratones WT de ambos sexos, todos de dos años. Los resultados mostraron que la expresión de *Darpp32* fue menor en ratones zQ175neo machos heterocigotos ( $-4,647 \pm 0,5937$ ;  $p > 0,005$ ) y hembras ( $-1,210 \pm 0,4529$ ;  $p > 0,005$ ) respecto a los ratones WT. La expresión de *Nefl* también se mostró inhibida en ratones transgénicos macho ( $-0,7175 \pm 0,2308$ ;  $p > 0,005$ ), pero no se encontraron diferencias significativas en las hembras. La expresión de *Mlh1* se encontró inhibida

en ratones heterocigotos macho ( $-0,6525 \pm 0,2690$ ;  $p > 0,005$ ) pero este gen se encontró sobrepresado en hembras ( $0,3820 \pm 0,1906$ ;  $p > 0,005$ ). Finalmente, la expresión de *Fan1* se estuvo inhibida en ratones heterocigotos macho ( $-1,891 \pm 0,2346$ ;  $p > 0,005$ ), mientras que en hembras no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (figura 25). Por tanto, evaluar la expresión de estos cuatro genes fue adecuado para determinar la eficacia del compuesto de interés sobre los ratones zQ175neo heterocigotos.

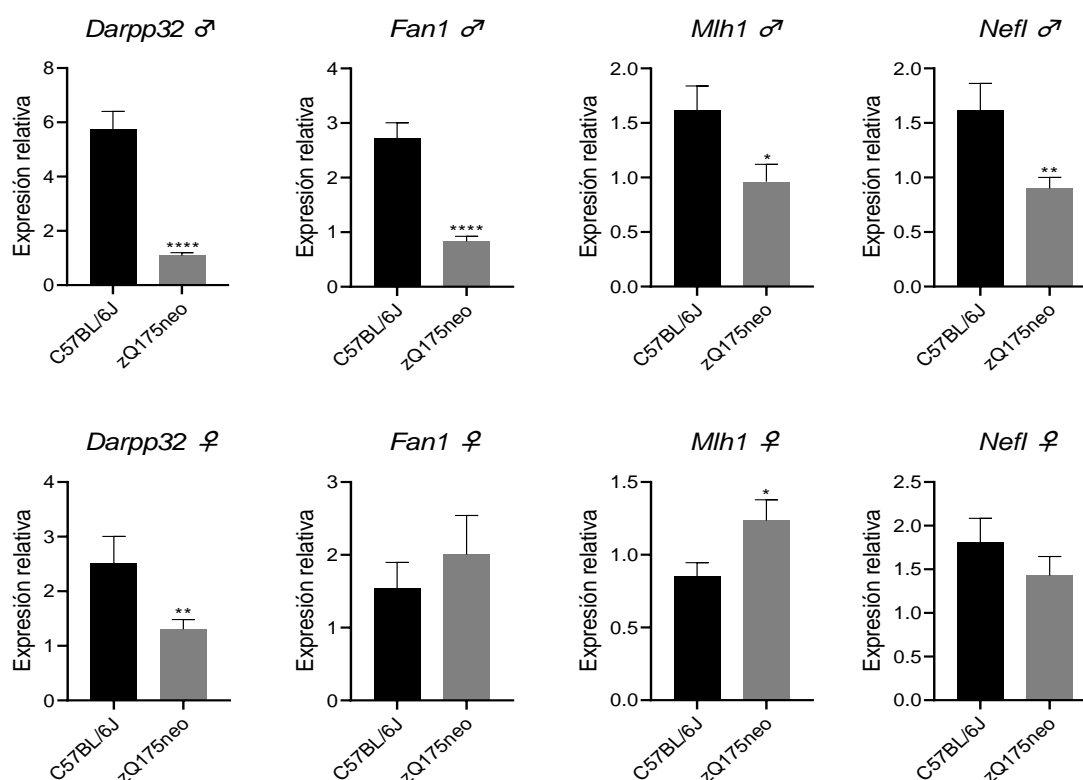


Figura 25. Expresión relativa de genes relacionados con la progresión de la EH.

#### 4.3 Evaluación de agregados de Huntingtina en el cuerpo estriado.

La evaluación la acumulación de mHtt por inmunohistoquímica reveló que los ratones zQ175neo adultos de ambos sexos presentaron agregados ampliamente distribuidos en el cuerpo estriado de forma no homogénea. Además, estos cúmulos de mHtt se encontraron principalmente en el núcleo de las células. En cambio, como cabría esperar, no se encontraron en ratones de la cepa WT de la misma edad y sexo (figura 26). Por tanto, el estudio del número de acúmulos de Huntingtina, así como el área de éstos y su localización intracelular fue adecuado para la evaluación de la eficacia del compuesto candidato a fármaco.

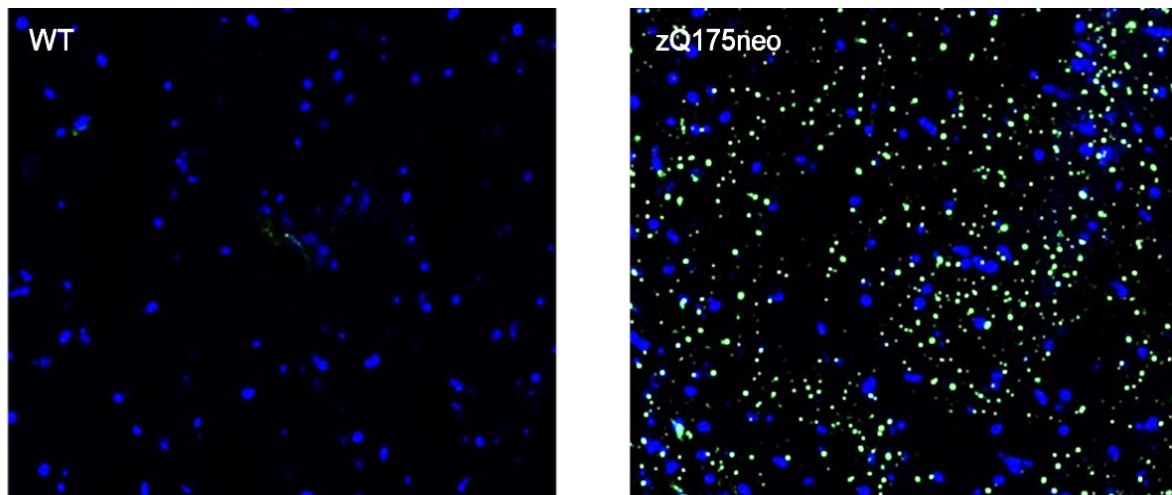


Figura 26. Imágenes representativas de la detección de agregados de mHtt. Se aprecian los núcleos celulares en azul y los cúmulos de mHtt en verde.

#### 4.4 Cuantificación de Darpp32 en el cuerpo estriado.

Los niveles de la proteína Darpp32, el marcador neuronal espinoso medio, cuantificados por Western Blot son significativamente inferiores ( $-33,08 \pm 8,780$ ;  $p > 0.005$ ) en el cuerpo estriado de los ratones zQ175neo (figura 27). Esta reducción de los niveles de Darpp32 puede deberse a una disfunción neuronal selectiva más que a una neurodegeneración general (Peng et al., 2016). Por tanto, la evaluación de los niveles de esta proteína mediante esta técnica fue considerada para valorar la eficacia del compuesto 4QMn en ratones zQ175neo.

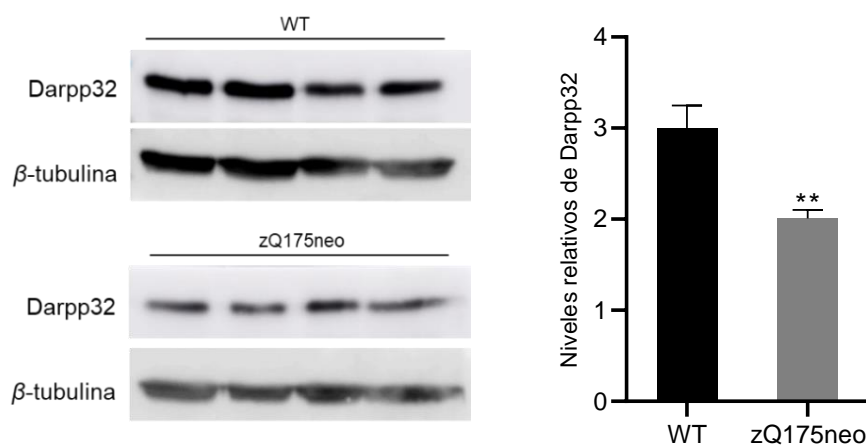


Figura 27. Niveles de Darpp32 en el cuerpo estriado de ratones WT y zQ175neo heterocigotos de dos años.

## 5. Validación del compuesto 4QMn en ratones zQ175neo heterocigotos.

El efecto del compuesto se determinó llevando a cabo cuatro estudios diferentes diseñados con el objetivo de refinar la dosis y vía de administración del 4QMn (experimentos piloto), así como evaluar la eficacia de dicho compuesto poliamínico como tratamiento contra la EH en el modelo murino zQ175neo (ensayos de eficacia).

### 5.1 Primer experimento piloto.

En primer lugar, la supervivencia de los ratones del grupo control de ambos sexos (no tratados con 4QMn) fue del 100%, así como la de los machos administrados con 20 mg/kg por vía IG y las hembras tratadas con 10 y 20 mg/kg mediante la misma vía. En cambio, una semana después del inicio del ensayo, una hembra tratada con 5 mg/kg tuvo que ser sacrificada por ceguera, que se estableció como punto final humanitario. Por otro lado, un ratón tratado con 10 mg/kg murió transcurridas dos semanas desde el inicio, por lo que la supervivencia de este grupo fue del 50% (figura 28). La muerte de ambos animales se produjo muy al inicio del ensayo, mientras que durante el transcurso del tratamiento crónico ningún otro animal murió.

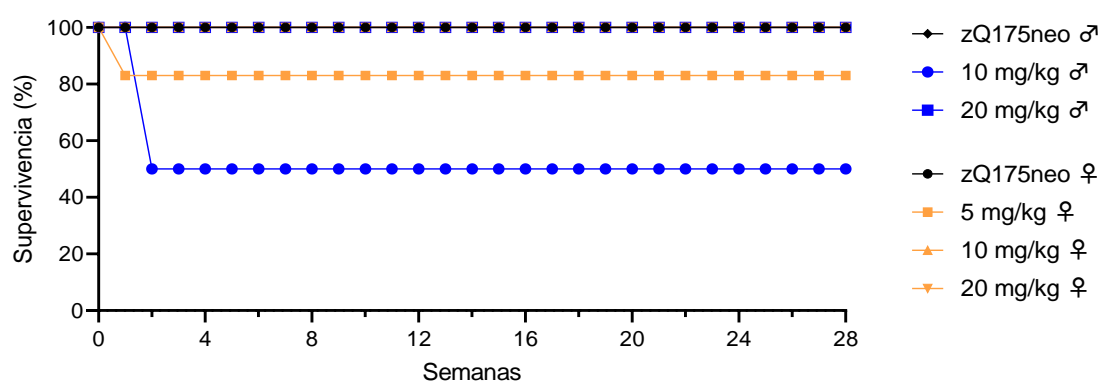


Figura 28. Supervivencia (%) de los ratones del experimento piloto.

Además, los ratones fueron pesados cada semana durante el transcurso del experimento piloto con el fin de evaluar su bienestar. El análisis de estos valores indicó que ningún ratón disminuyó un 20% o más de su peso inicial, por tanto, no se tuvo que aplicar el punto final humanitario a ningún animal (figura 29).



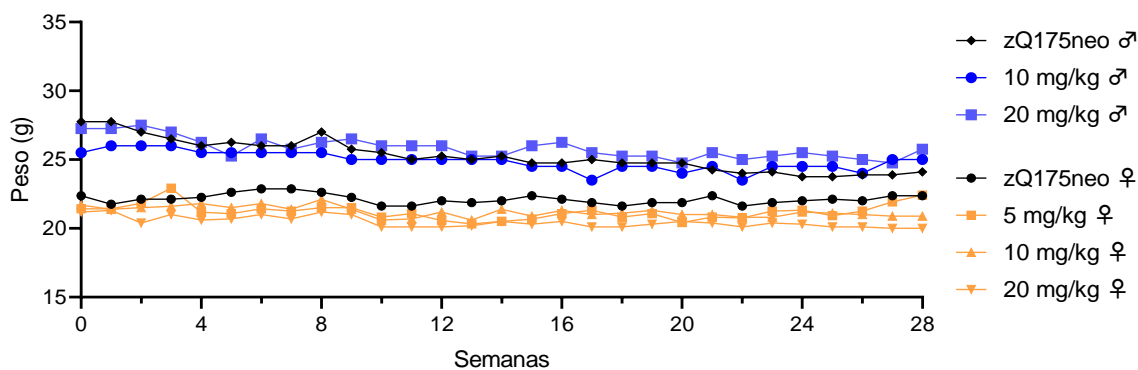


Figura 29. Peso corporal de los ratones del experimento piloto.

Por otro lado, se evaluó el fenotipo motor de los ratones pertenecientes al grupo control frente a los tratados. Los ratones heterocigotos zQ175neo no presentaron el fenotipo originado por la enfermedad que cabría esperar durante su primer año de vida (tanto los grupos control como los tratados) según la información disponible. Como consecuencia, las valoraciones de las pruebas mensuales fueron entre 0 y 1, como se ha comentado anteriormente (tabla 30). De tal manera que no se pudo determinar el efecto del compuesto a nivel fenotípico.

Por otra parte, se analizó la expresión de varios genes en el cuerpo estriado de los ratones relacionados con la EH en humanos y modelos animales. La tabla 31 contiene los resultados numéricos de la cuantificación relativa (apartado 5.2.8 de Materiales y Métodos) de la expresión de los genes *Bdnf*, *Cnr1*, *Darpp32*, *Drd2*, *Fan1*, *Mlh1*, *Nefl* y *Pde10a* en el cuerpo estriado de cada grupo de ratones del experimento piloto y de ratones WT de un año. Para facilitar la comparación con los tratamientos, se normalizaron los datos tomando como valor de referencia la expresión en la cepa zQ175neo, a la que se le otorgó un valor de 1. La expresión de un determinado gen es mayor o menor en los ratones tratados y en los WT en función de si su valor de RQ es superior o inferior a 1 respectivamente. En la tabla se representó el aumento de la expresión génica en tonalidades rojas, y la disminución en verdes, respecto a los ratones zQ175neo sin tratar, cuyo RQ es 1. Los resultados sugirieron que la expresión de los genes *Bdnf*, *Cnr1*, *Darpp32*, *Fan1*, *Mlh1*, *Nefl* y *Pde10a* se encuentra inhibida en los ratones transgénicos zQ175neo heterocigotos de ambos sexos, excepto el gen *Fan1* en hembras, que se encuentra sobreexpresado. En cambio, el gen *Drd2* presentó una expresión similar en ambas cepas, WT y zQ175neo. Por otro lado, el tratamiento con 4QMn indujo modificaciones en la expresión de varios genes siendo administrado durante 28 semanas *ad libitum*. Además, cabe destacar que los ratones de un año (cuando fueron sacrificados) no mostraron el fenotipo esperado característico del modelo murino zQ175neo.

Tabla 31. Expresión de los genes *Bdnf*, *Cnr1*, *Darpp32*, *Fan1*, *Mlh1*, *Nefl* y *Pde10a* en el cuerpo estriado murino de ratones WT y zQ175neo de ambos sexos. \*mg/kg

Gen	WT ♂	zQ175neo ♂	Valores de RQ	
			zQ175neo ♂ (n10)	
			10* IG	20* IG
<i>Bdnf</i>	1,287	1	0,947	0,426
<i>Cnr1</i>	4,714	1	0,206	1,010
<i>Darpp32</i>	4,166	1	4,283	0,575
<i>Drd2</i>	0,901	1	0,61	0,622
<i>Fan1</i>	2,321	1	0,535	1,646
<i>Mlh1</i>	1,473	1	0,399	0,974
<i>Nefl</i>	1,594	1	0,375	0,562
<i>Pde10a</i>	1,658	1	0,293	0,684

Gen	WT ♀	zQ175neo ♀	Valores de RQ		
			zQ175neo ♀ (n20)		
			5* <i>ad libitum</i>	10* IG	20* IG
<i>Bdnf</i>	1,337	1	0,355	0,412	0,706
<i>Cnr1</i>	4,450	1	0,532	0,481	0,269
<i>Darpp32</i>	4,006	1	0,709	0,732	0,065
<i>Drd2</i>	0,937	1	2,59	1,824	0,615
<i>Fan1</i>	0,665	1	1,338	0,944	1,223
<i>Mlh1</i>	1,372	1	1,034	0,897	0,674
<i>Nefl</i>	1,382	1	0,498	0,629	0,656
<i>Pde10a</i>	1,575	1	0,952	0,736	0,270

A partir de estos resultados, se establecieron 5 mg/kg *ad libitum* como dosis y vía de administración del 4QMn porque se apreció efecto en la expresión. También, de esta forma, los ratones estarían en contacto constante con el compuesto y no sufrirían lesiones físicas o anímicas a causa del método de administración a largo plazo. Además, para el resto de los estudios de eficacia se estableció emplear ratones de un año o más puesto que hasta el momento no presentaron fenotipo motor lesivo.

## 5.2 Segundo experimento piloto.

En primer lugar, la supervivencia de los ratones fue del 100% en todos los grupos. El peso corporal de todos los ratones no experimentó una disminución igual o superior al 20% (figura 30), por tanto, no hubo que aplicar el criterio de punto final humanitario. En segundo lugar, el fenotipo de los ratones se consideró leve, mostrando valoraciones entre 0 y 1 tanto a tiempo inicial como final (anexo 1) debido a que solo tenían un año de vida, como en el primer experimento piloto. De tal forma que no se pudo evaluar el efecto sobre el fenotipo motor del tratamiento con 4QMn durante solo un mes.

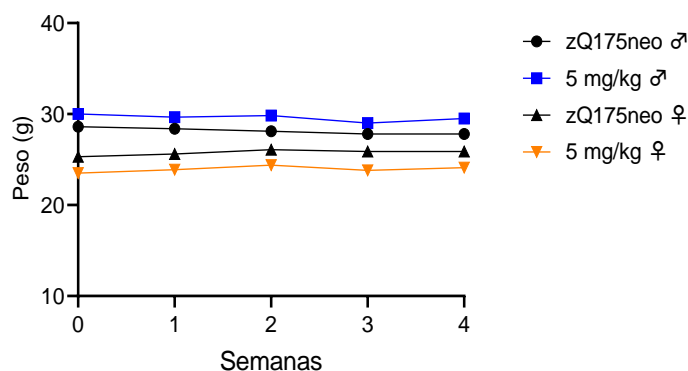


Figura 30. Peso de los ratones del segundo ensayo de eficacia. Se representa en rojo el aumento y en verde la disminución de expresión respecto al grupo control.

Por último, se evaluó la expresión de los marcadores que presentaron diferencias significativas en el cuerpo estriado de ratones zQ175neo heterocigotos respecto los WT de dos años (*Darpp32*, *Fan1*, *Mlh1* y *Nefl*). En la tabla 32 se representó el aumento de la expresión génica en tonalidades rojas, y la disminución en verdes, respecto a los ratones zQ175neo sin tratar, cuyo RQ es 1. Los resultados indicaron que el 4QMn pudo modificar la expresión de algunos de los marcadores siendo administrado durante solo un mes, pero de igual forma que en el experimento piloto anterior, los ratones no mostraron el fenotipo documentado para estos animales.

Tabla 32. Expresión de marcadores en el cuerpo estriado murino del segundo experimento piloto.

Gen	zQ175neo ♂ ♀	Valores de RQ	
		♂ (n5)	♀ (n5)
<i>Darpp32</i>	1	1,037	0,389
<i>Nefl</i>	1	0,885	1,944
<i>Mlh1</i>	1	0,771	1,007
<i>Fan1</i>	1	0,869	1,265

### 5.3 Primer ensayo de eficacia.

En primer lugar, la figura 31 representa la supervivencia de los ratones del primer ensayo de eficacia del compuesto 4QMn. Las hembras tratadas mantuvieron una supervivencia del 100%. Dos hembras control murieron al cabo de 3 y 7 meses de la primera administración del compuesto, por lo que la supervivencia del grupo fue del 75%. Transcurrido un mes y medio desde el inicio del ensayo, un ratón macho control murió, por lo que la supervivencia de este grupo fue del 83%. Además, un ratón macho en tratamiento murió transcurridas 11 semanas del ensayo, por lo que la supervivencia del grupo fue también del 75%. El tratamiento con 4QMn no aumentó la mortalidad de los animales, que fue atribuida a causas naturales o propias de la enfermedad dado que también ratones del grupo control murieron durante el experimento. Es importante destacar que estos ratones tienen una vida media aproximada de dos años, de igual forma que los ratones WT.

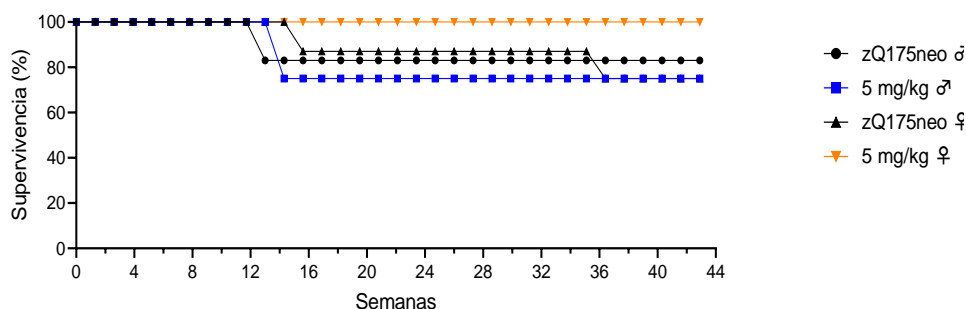


Figura 31. Supervivencia (%) de los ratones del primer ensayo de eficacia.

En segundo lugar, se supervisó el bienestar de los animales registrando su peso cada semana durante el transcurso del ensayo (figura 32). No se observaron disminuciones del peso corporal iguales o superiores al 20% en ningún ratón incluido en el estudio. Pese a que los machos control sufrieron una importante disminución de peso corporal con el tiempo, ningún ratón tuvo que ser sacrificado como punto final humanitario.

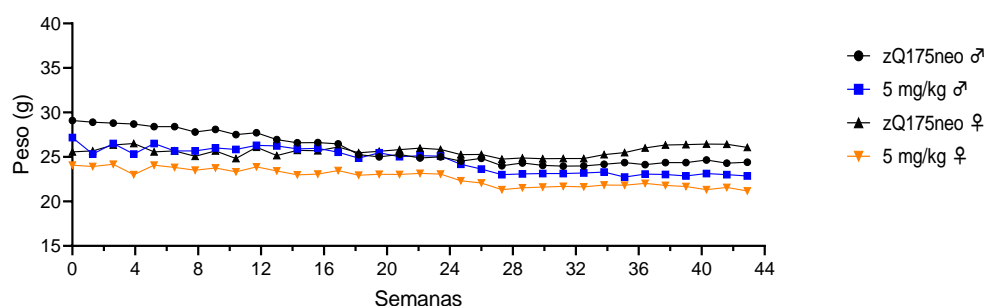


Figura 32. Peso corporal de los ratones del primer ensayo de eficacia.

Por otro lado, la evaluación del fenotipo motor mostró que el tratamiento con 4QMn retrasó significativamente la pérdida de fuerza característica de la enfermedad en machos zQ175neo heterocigotos durante los tres primeros meses ( $-0,4000 \pm 0,1470$  y  $-0,4551 \pm 0,1700$ ;  $p < 0,005$ ). El 4QMn también retrasó la pérdida de equilibrio en hembras zQ175neo heterocigotas de forma significativa ( $-1,131 \pm 0,3337$  y  $-0,9167 \pm 0,3436$ ;  $p < 0,005$ ) entre el cuarto y el séptimo mes de tratamiento (figura 33). Finalmente, el fenotipo del grupo control y tratado converge, pero es interesante el efecto del 4QMn sobre la aparición del fenotipo lesivo de los ratones en edad adulta. El retraso de la pérdida de fuerza y equilibrio en los pacientes tratados con 4QMn mejoraría su calidad de vida. Cabe destacar que este tipo de evaluaciones están intrínsecamente limitadas por un componente motivacional y ambiental que complica su ejecución, además, algunas de las pruebas realizadas revelan cierto aprendizaje a la hora de desempeñar las actividades. Los resultados del resto de pruebas se encuentran en el anexo 2, en las cuales no se observó efecto del compuesto en los animales tratados.

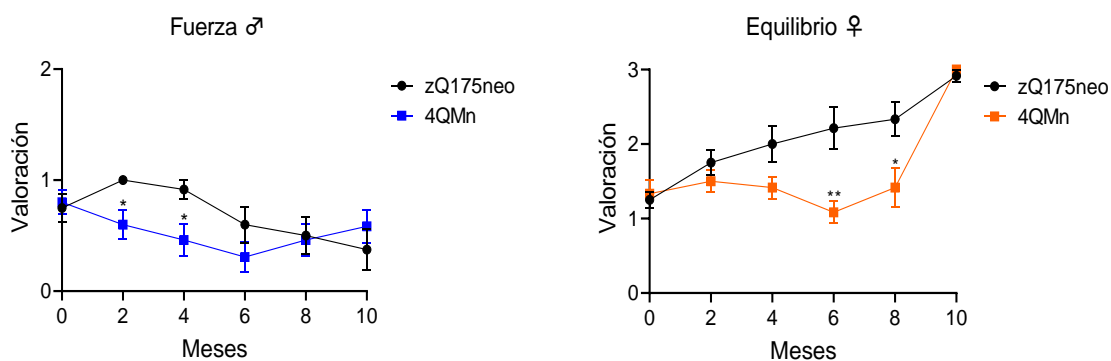


Figura 33. Valoración de la fuerza de los machos y el equilibrio de las hembras del primer ensayo de eficacia.

El análisis de la expresión génica en el cuerpo estriado de los ratones mostró un aumento significativo de la expresión de *Darpp32* ( $2,105 \pm 0,2887$ ;  $p > 0,005$ ) en los ratones macho tratados con 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* respecto al grupo control (figura 34). Por tanto, el 4QMn podría restablecer la expresión de *Darpp32* a niveles WT en machos. Por otro lado, la expresión del gen *Mlh1* presentó la misma tendencia sin ser estadísticamente significativa, lo que sugirió que el 4QMn también podría inducir su expresión. En cambio, no se observaron diferencias significativas con el tratamiento en la expresión de los genes *Nefl* ni *Fan1* de los ratones macho, ni en ninguno de estos marcadores en hembras (figura 34).

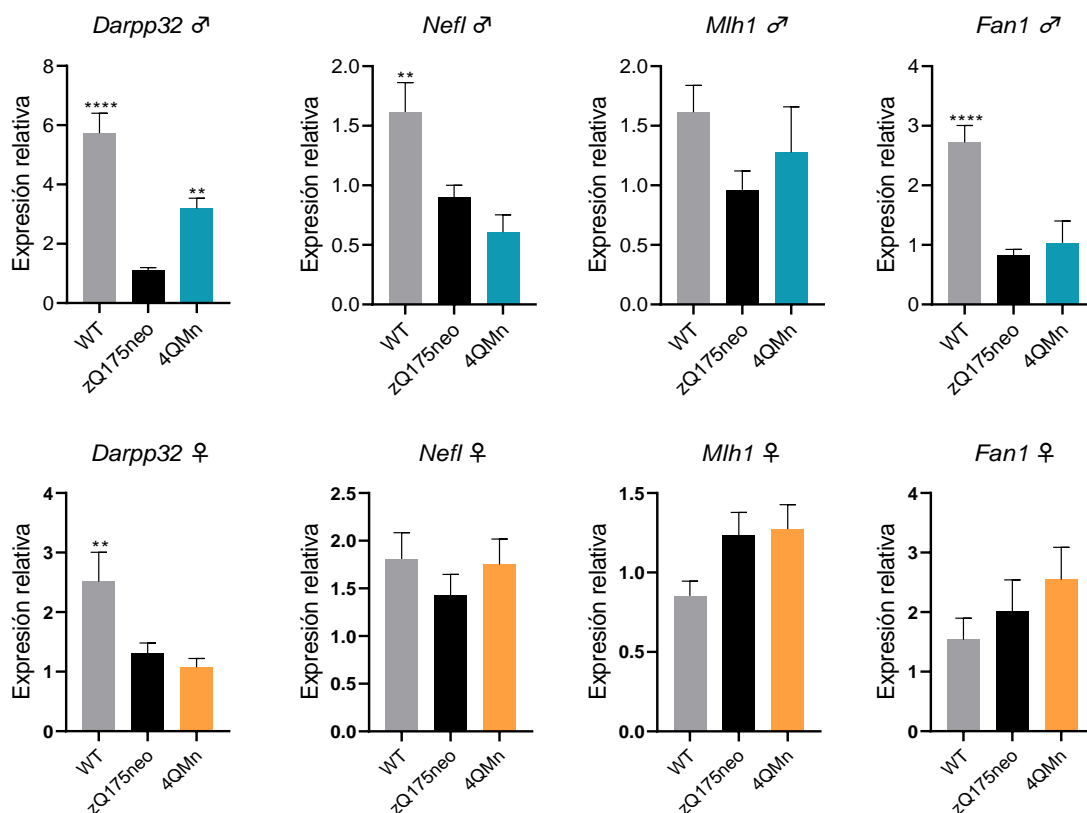


Figura 34. Expresión relativa de los genes *Darpp32*, *Nefl*, *Mlh1* y *Fan1* en el cuerpo estriado de ratones macho y hembras.

En los machos heterocigotos, la evaluación de los gránulos de Huntingtina en el cuerpo estriado mostró que el tratamiento con 4QMn disminuyó el número de núcleos con gránulos ( $-0,08425 \pm 0,02482$ ;  $p > 0,005$ ) en machos tratados respecto al grupo control (sin tratar), pero no afectó al tamaño (área) de los gránulos (figura 35). Sin embargo, en las hembras, ni el número de gránulos ni su área se vieron significativamente afectados por el compuesto 4QMn (figura 36).

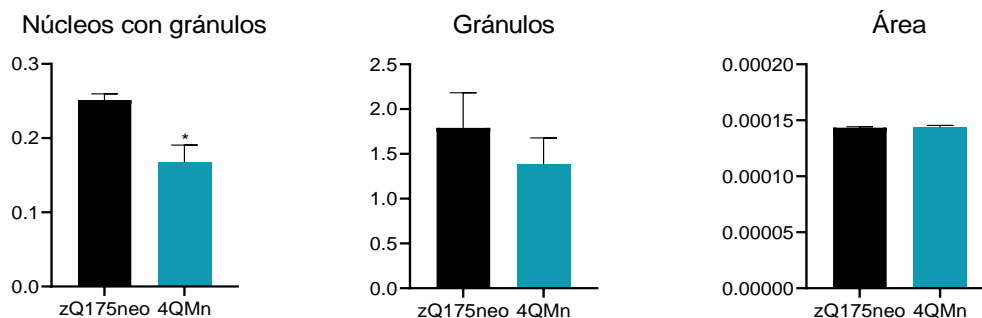


Figura 35. Análisis de los gránulos en el cuerpo estriado de machos.

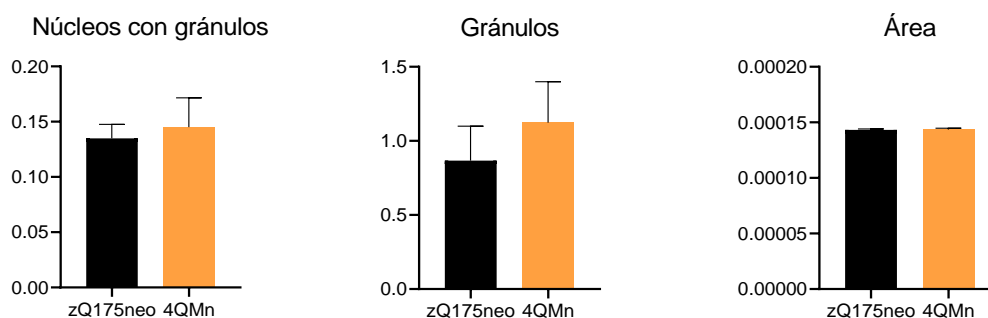


Figura 36. Análisis de los gránulos en el cuerpo estriado de hembras.

La cuantificación de Huntingtina en el estriado de los ratones no mostró diferencias significativas con el tratamiento debido a la variabilidad de los datos, en cambio, los resultados sugirieron una tendencia a la baja en los machos tratados durante este ensayo (figura 37). Esta observación avalaría los resultados anteriormente descritos en los que se cuantificó menos núcleos con gránulos en este mismo grupo de ratones, a diferencia de en hembras, donde no se encontraron cambios. Finalmente, los resultados de la cuantificación de Darpp32 sugirieron una tendencia por parte del 4QMn a incrementar los niveles de proteína en los ratones macho tratados, pese a que la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa (figura 37). Hay que recordar el espacio temporal de desarrollo de la enfermedad, el tratamiento con 4Q *ad libitum* y la dificultad de encontrar diferencias en este tipo de modelos murinos para evaluar la eficacia del compuesto en nuestro modelo murino de EH.

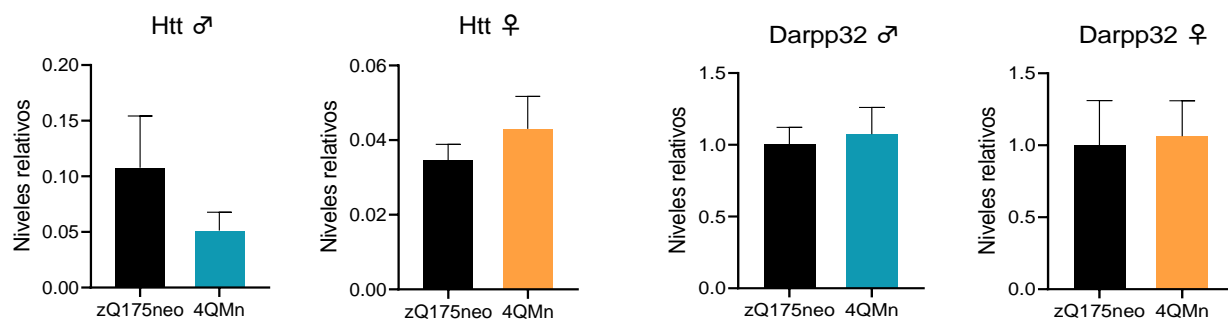


Figura 37. Niveles de Huntingtina y Darpp32 en el cuerpo estriado de los ratones del primer ensayo de eficacia.

#### 5.4 Segundo ensayo de eficacia.

En primer lugar, la supervivencia en el segundo ensayo de eficacia fue del 100% tanto en el grupo control como en el tratado (figura 38). El peso de los ratones se mantuvo durante el transcurso del ensayo, por lo que no se tomaron medidas de punto final humanitario (figura 38). En segundo lugar, estos ratones de dos años presentaron un fenotipo muy severo originado por los últimos estadios de la enfermedad, por tanto, de nuevo, los resultados ensayos de tan solo un mes de duración no son concluyentes (anexo 4).

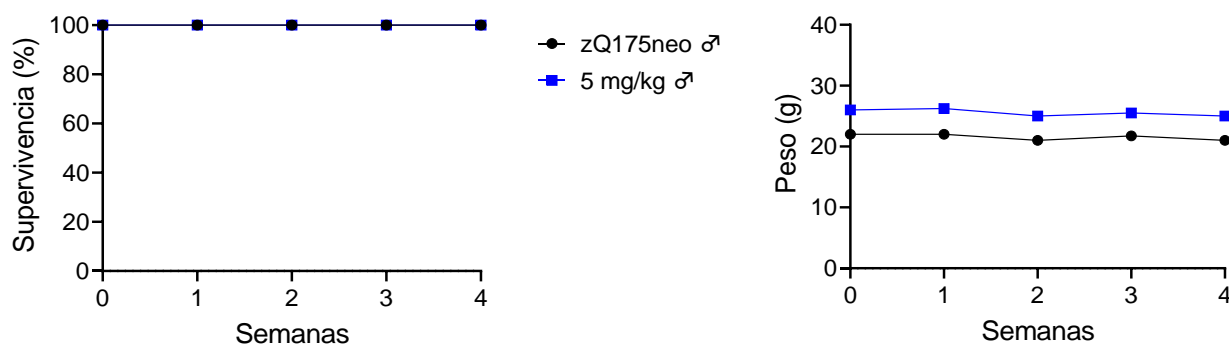


Figura 38. Supervivencia y peso de los ratones del segundo ensayo de eficacia.

En cuanto a la expresión génica en el cuerpo estriado (figura 39), por un lado, el 4QMn incrementó significativamente la expresión de *Darpp32* en machos respecto al grupo control sin tratar ( $0,6735 \pm 0,1354$ ;  $p > 0,005$ ). Por otro lado, el 4QMn disminuyó la expresión de *Nefl* en machos respecto al grupo control ( $-0,6318 \pm 0,1623$ ;  $p < 0,005$ ), y no se encontraron diferencias significativas en la expresión del resto de marcadores (*Mlh1* y *Fan1*).

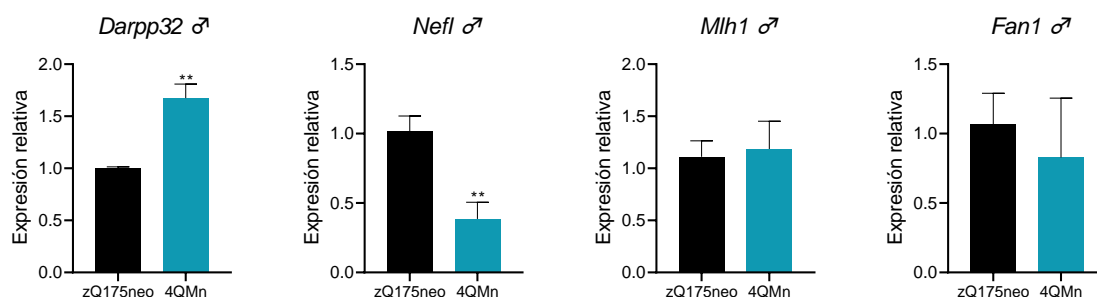


Figura 39. Expresión relativa de *Darpp32*, *Nefl*, *Mlh1* y *Fan1* en el cerebro.

Por último, se analizó el efecto del 4QMn sobre la Huntingtina en el cerebro, hígado, corazón, bazo, páncreas, riñón y músculo de ratones macho zQ175neo heterocigotos de 72 semanas de vida por Western Blot. Como resultado, solo se detectó Huntingtina de longitud completa, además de diferentes fragmentos de la proteína, en el cerebro de los cuatro ratones zQ175neo. Sin embargo, por un lado, en el hígado se detectaron múltiples fragmentos siendo el predominante de alrededor de 82 kDa, también detectado de forma exclusiva en el corazón de los animales (figura 40). Los resultados de la cuantificación relativa de las bandas de Htt en los ratones zQ175neo tratados y sin tratar se analizó estadísticamente mediante la prueba t-student para muestras no pareadas sin dar lugar a diferencias significativas en el cerebro, hígado ni corazón de los ratones tratados respecto a los controles. Por otro lado, no se detectaron fragmentos de Huntingtina en el bazo, el páncreas, el riñón ni el músculo de los ratones que formaron parte de este estudio.

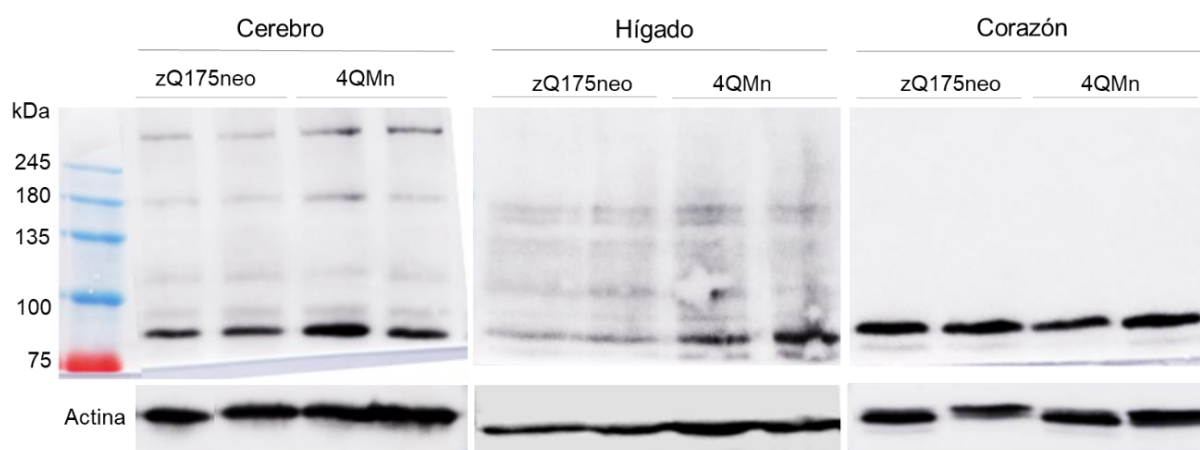


Figura 40. Evaluación de la Huntingtina en el cerebro, hígado y corazón de ratones macho zQ175neo heterocigotos.



## 6. Estudio del mecanismo de acción del 4QMn en *C. elegans*.

En colaboración con CIPF, se realizaron estudios en líneas celulares humanas con distintas deficiencias en la autofagia por Western Blot para analizar la expresión o modificación de distintas kinasas implicadas en la ruta de la autofagia, particularmente de mTOR y MAPK. Los resultados sugirieron que la activación de la autofagia por 4QMn podría estar mediada por la ruta de AMPK (datos no publicados). En base a estos resultados, se hipotetizó que la activación de la autofagia por 4QMn podría estar mediada también por la ruta de AMPK en células que sobreexpresasen Huntingtina. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron dos experimentos con diferentes cepas de *C. elegans*.

### 6.1 Mecanismo de acción relacionado directamente con AMPK.

La evaluación de los gránulos de Huntingtina en *C. elegans* indicó, como era de esperar, que el 4QMn redujo el número de acúmulos en animales con 40Q ( $-4,667 \pm 1,558$ ;  $p > 0,005$ ). Sin embargo, en animales deficientes en *aak-2* y transgénicos para 40Q se seguía inhibiendo la acumulación de depósitos de 40Q ( $-9,267 \pm 2,163$ ;  $p > 0,005$ ) (figura 41). Estos resultados indicaron que la falta de AMPK no impide la función de 4QMn y sugirieron que la activación de la autofagia por 4QMn en células que sobreexpresan Huntingtina no está mediada por AMPK.

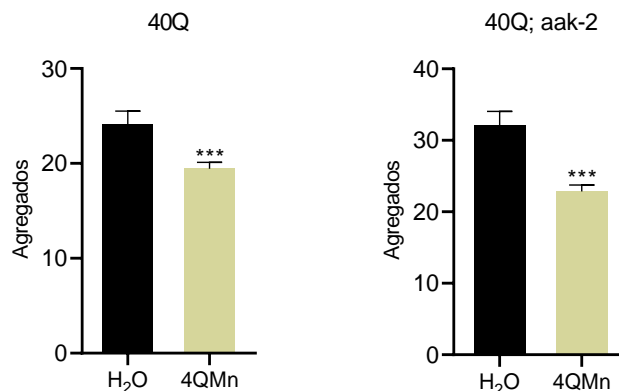


Figura 41. Agregados en *C. elegans* tras el tratamiento con 4QMn.

### 6.2 Mecanismo de acción relacionado con *Lgg-1* y *Bec-1*.

El número de agregados presente en el organismo disminuye con el tratamiento con metformina y 4QMn respecto al control (sin tratamiento) de forma significativa tanto en los animales con silenciamiento de *Lgg-1* como de *Bec-1* (figura 42). Pese a que el tratamiento reduce de forma significativa el número de agregados en *C. elegans* con 40Q, estos resultados sugieren que el silenciamiento no ha funcionado correctamente puesto que la metformina (control positivo)

reduce los agregados de poliglutamina y restaura la función neuronal a través de mecanismos que involucran la proteína quinasa activada por AMP y la función lisosomal (Sanchis et al., 2019).

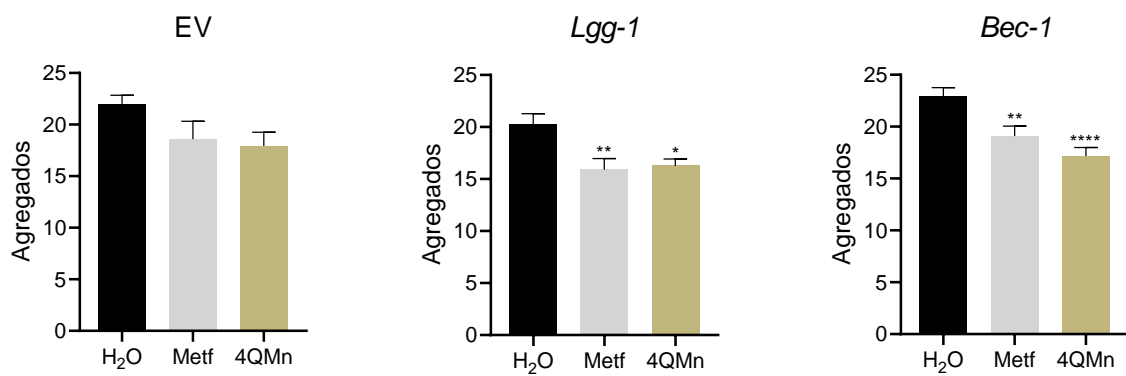


Figura 42. Agregados en *C. elegans* tras el tratamiento con metformina y 4QMn.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- I. Los estudios de toxicidad aguda y crónica revelaron que el 4QMn presenta un bajo perfil de toxicidad en ratones *wild type*.
- II. El 4QMn es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en ratones *wild type*.
- III. El tratamiento con 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* durante 42 semanas podría retrasar el fenotipo severo de equilibrio en hembras y el fenotipo severo de la fuerza en machos respecto a los animales sin tratar en ratones zQ175neo de un año. No se aprecia efecto en el resto de las pruebas motoras.
- IV. El 4QMn actúa sobre la expresión génica en el cuerpo estriado (cerebro) y podría aumentar la expresión de *Darpp32* en el cuerpo estriado de los machos tratados con 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* durante 42 semanas, revirtiéndose así a niveles *wild type*. No se observa efecto significativo sobre la expresión del resto de marcadores en ambos sexos.
- V. El tratamiento con 4QMn podría reducir el número de gránulos en núcleos en machos, pero no influiría en el área de gránulos.
- VI. El 4QMn tiende a reducir el nivel de Huntingtina en el cuerpo estriado de los machos tratados con 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* durante 42 semanas.
- VII. La activación de la autofagia por 4QMn en células que sobreexpresan Huntingtina no está mediada por AMPK.

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

La presente tesis forma parte del proyecto IMAPEA/2016/43, “New drug based on SOD-enzymes for treatment of neurodegenerative diseases”, que tiene como objetivo desarrollar un fármaco eficaz para la contención de enfermedades neurodegenerativas que impliquen degeneración celular y depósitos de proteínas, centrándose en primer lugar, en la Enfermedad de Huntington. La EH es considerada una Enfermedad Rara con muy baja prevalencia, estimada a nivel mundial en 2,7 por 100.000 habitantes, con diferencias entre regiones del mundo (2,1 a 10 por 100.000 mil habitantes), cifra que asciende anualmente. La enfermedad está originada por una mutación autosómica dominante en cualquiera de las dos copias del gen *HTT* de un individuo. Como resultado, la mHTT se acumula dando lugar a los síntomas característicos de la enfermedad, como problemas sutiles en el estado de ánimo o las habilidades mentales, falta general de coordinación o movimientos corporales desiguales, así como pérdida de habilidades físicas y demencia, dando lugar al fallecimiento de los individuos afectados entre 10 y 20 años después de su diagnóstico (Gil & Rego, 2008; Kay et al., 2017; Reiner et al., 2011; Ross & Tabrizi, 2011). Actualmente, no hay cura para la EH, y los tratamientos disponibles sólo pueden aliviar algunos síntomas para mejorar la calidad de vida de los pacientes. La mejor evidencia para el tratamiento sintomático de trastornos del movimiento hiperkinético es con tetrabenazina, que fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos en 2008 (Jimenez-Shahed & Jankovic, 2013; Miguel et al., 2017). Sin embargo, otros intentos de desarrollar mejores compuestos han resultado hasta ahora infructuosos.

Bionos Biotech SL es el licenciatario exclusivo de una patente para la síntesis y el uso de compuestos escorpianos y el titular de una segunda patente sobre el uso del compuesto 4QMn como activador de la autofagia y la actividad del proteasoma para tratar enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la formación de agregados proteicos. La principal innovación de este proyecto radica en el uso de una innovadora familia de complejos metálicos de macroazapiridinofanos y composiciones de estos para tratar estas enfermedades. Durante los últimos años, se ha estudiado particularmente el compuesto 4QMn como posible tratamiento de la EH razonando que podría proteger las neuronas de una manera bidireccional, mediante la eliminación de los radicales de superóxido como catalizador SOD y mediante la eliminación de depósitos de proteínas activando la autofagia y la actividad del proteasoma. En este contexto, el complejo metálico 4QMn estudiado en este trabajo podría reducir los síntomas de la enfermedad anteriormente descritos.

Un aspecto clave e indispensable en el desarrollo de fármacos son los estudios preclínicos, en los que se evalúa la toxicidad y eficacia *in vivo* del compuesto de interés. En la presente tesis se

han realizado los primeros estudios preclínicos del 4QMn en ratones para comprobar que el tratamiento es seguro y eficaz. En cada uno de los estudios realizados en este trabajo nos hemos encontrado con limitaciones que han dificultado el desarrollo del proyecto. Fundamentalmente, los mayores impedimentos fueron, en primer lugar, dificultades en la obtención de nuevas camadas, posiblemente debido a la endogamia. Dicho fenómeno ha sido investigado durante años, de forma que los estudios muestran que el aumento sistemático de los niveles de endogamia en los ratones de laboratorio tiene un efecto sobre el crecimiento y la capacidad materna posnatal (White, 1972), lo que explicaría nuestro problema, el cual fue resuelto incorporando nuevas hembras WT para la realización de los cruces. En segundo lugar, el fenotipo no fue lesivo en los ratones menores de un año como cabría esperar según se describe en bibliografía (Menalled et al., 2012; Peng et al., 2016). Sin embargo, este fenotipo apareció finalmente en ratones adultos de avanzada edad con los cuales se realizaron los estudios de eficacia del 4QMn. Por último, la variabilidad que presenta el modelo murino de EH zQ175neo adicional a la inherente al trabajo con roedores también fue una limitación. La elección del modelo murino tiene un gran impacto en la variabilidad de las lecturas preclínicas estándar asociadas con la investigación. Sin embargo, la variabilidad presente en las colonias de ratones es útil y necesaria para estudios de fármacos, que necesitan ser probados en un modelo que simule la diversidad genética de la población humana (Zuberi & Lutz, 2016).

Por un lado, nuestros resultados preliminares respecto a la seguridad muestran un perfil bajo de toxicidad. La administración del 4QMn no ha dado lugar a cambios en el peso corporal de los animales, así como tampoco en su relación con el peso de su hígado que impliquen toxicidad o malestar. Así mismo, la evaluación del daño hepático no reveló altos niveles de actividad ALT ni inflamación en la mayoría de dosis estudiadas. Es más, algunos animales sin tratar también murieron durante ciertos ensayos de toxicidad, lo que sugirió que nuestro compuesto no incrementó la mortalidad de los animales. Hecho que se traduce en un bajo perfil de toxicidad del 4QMn, como se ha comentado anteriormente. No obstante, sería necesaria la realización de nuevos estudios para determinar otros posibles efectos tóxicos del compuesto en roedores

Por otro lado, la barrera hematoencefálica es la principal barrera para el transporte de medicamentos en el cerebro, órgano diana en el tratamiento frente a la EH, que actúa también como una barrera inmunológica y metabólica. El transporte de sustancias al cerebro depende de los mecanismos de transporte presentes en la BHE y la difusión de estos compuestos depende también de las características fisicoquímicas de la molécula (Bernacki et al., 2008; Strazielle & Gherzi-Egea, 2013). Hemos demostrado que el 4QMn se detecta en el cerebro. Por tanto, nuestros resultados indican que una forma activa del 4QMn atraviesa la BHE para llegar al cerebro, región de interés donde desarrollar su actividad. Este hecho fue de vital importancia para la continuidad de nuestros estudios.

En cuanto a la evaluación de la eficacia del compuesto 4QMn, nuestros estudios revelan cierto rescate a niveles WT de diferentes parámetros. Respecto al fenotipo motor, por un lado, Guyenet et al. describieron un protocolo para la cuantificación rápida y sensible de la gravedad de enfermedades neurodegenerativas que derivó de evaluaciones fenotípicas previamente publicadas en varios modelos de enfermedades, incluidas la EH, las ataxias espinocerebelosas y la atrofia muscular espinobulbar. Estas medidas incluyeron agarre de las extremidades traseras, prueba de repisa, marcha y cifosis. Los resultados discriminaron efectivamente entre individuos afectados y no afectados, al mismo tiempo que cuantifican la progresión temporal de los fenotipos de enfermedades neurodegenerativas. Siguiendo esas directrices, se observó que nuestros ratones no desarrollaron el fenotipo esperado durante su primer año de vida, por lo que los estudios de eficacia se desarrollaron con ratones de edad más avanzada. Por tanto, la evaluación del fenotipo de los ratones a lo largo del primer estudio de eficacia, que se inició con ratones de 55 semanas, se realizó siguiendo el protocolo rápido y sensible descrito por Guyenet et al. Hay que tener en cuenta, por una parte, el régimen de administración del fármaco *ad libitum* y, por otra parte, que los ratones heterocigóticos desarrollaron la enfermedad de manera mucho menos aguda que como está descrito en la literatura. Este hecho provocó que el rescate de unos fenotipos, que ya de por sí son difíciles de evaluar y cuantificar en enfermedades neurodegenerativas, fuese poco significativo. En particular, los resultados del tratamiento con 4QMn durante 42 semanas en animales heterocigóticos zQ175neo de un año retrasó la progresión de la pérdida de equilibrio característica de la enfermedad en hembras. De la misma forma, los resultados obtenidos en la prueba de fuerza en machos postergaron la pérdida de fuerza en aquellos machos que han sido tratados con 4QMn con respecto a los controles. La EH se caracteriza por la presencia de alteraciones motoras, cognitivas y psiquiátricas de curso progresivo en sujetos portadores de la mutación (Ross & Tabrizi, 2011). El enlentecimiento de la pérdida de fuerza y equilibrio en los pacientes tratados con 4QMn se traduciría en una mayor independencia física de dichas personas, otorgando así mayor seguridad y estabilidad emocional, lo que mejoraría la calidad de vida de las personas afectadas. Cabe destacar que en este tipo de estudios, el efecto del compuesto está comprometido por el aprendizaje de las pruebas y la memoria a lo largo del tiempo por parte de los ratones (Vorhees & Williams, 2014). Por último, es necesario señalar que las valoraciones locomotoras están condicionadas también por un componente motivacional por parte de los animales que interfiere en los resultados. Se ha intentado disminuir realizando las grabaciones por la noche, puesto que los ratones son animales nocturnos, pero no se ha demostrado que las pruebas durante la fase oscura o clara del ciclo diario afecten el rendimiento de los animales zQ175neo en pruebas fenotípicas (Menalled et al., 2012b). De tal manera que las valoraciones durante la fase nocturna no fueron distintas a las valoraciones de grabaciones diurnas.



Por otro lado, se analizó la expresión de varios genes relacionados con la EH en el cuerpo estriado murino para determinar posibles biomarcadores en los ratones zQ175neo heterocigotos. Estudios con microarrays, (no confirmados por PCR) indicaron que la expresión de los genes *Cnr1* y *Nefl* en pacientes se encuentra disminuida respecto a la de individuos sanos (Hodges et al., 2006), también en modelos murinos de la EH (Kuhn et al., 2007). De igual forma que la expresión de los genes *Bdnf*, *Darpp32*, *Drd2* y *Pde10a* en pacientes y modelos animales de la EH (Ehrlich, 2012; Kuhn et al., 2007; Niccolini et al., 2015). Otros estudios describieron que un incremento de expresión de *Fan1* está significativamente asociado a un inicio de enfermedad tardío, mientras que su disminución supone un inicio temprano y una progresión de es la enfermedad más rápida (Goold et al., 2019). Además, se ha descrito una expresión reducida del gen *Mlh1* en diferentes modelos murinos de EH (Pinto et al., 2013).

En primer lugar, nuestros resultados mostraron una inhibición de la expresión de forma significativa de los genes *Darpp32*, *Fan1*, *Mlh1* y *Nefl* en los ratones zQ175neo respecto los WT de dos años, que coincidió con los resultados esperados anteriormente descritos. Por tanto, fueron clasificados como biomarcadores de expresión en nuestro modelo de EH. La implicación de las proteínas que codifican estos genes está estrechamente relacionada con la EH. *Darpp32* (Dopamine- and cAMP- regulated phosphoprotein) es una proteína reguladora de la señalización del receptor de dopamina, cuyo descenso en su expresión sugiere que está relacionada con la sobreexpresión de poliglutaminas en las neuronas espinales del cuerpo estriado durante la patogénesis de la EH (Van Dellen et al., 2000). *Fan1* (Fanconi associated nuclease 1) es una nucleasa involucrada en la reparación de las cadenas de ADN, y *Mlh1* (MutL homolog 1) es un biomarcador conocido por su participación en la reparación de errores de apareamiento del ADN. Estudios recientes han descrito que *Fan1* controla el ensamblaje del complejo de reparación de desajustes a través de la retención de *Mlh1*, para estabilizar la expansión de la repetición CAG en la EH, red que modula su patogénesis (Goold et al., 2021). Por último, *Nefl* (Neurofilament light chain) es un componente esencial del citoesqueleto neuronal (Byrne et al., 2018) y biomarcador de varias enfermedades neurodegenerativas que proporciona una medida sensible del daño axonal de las neuronas (Bäckström et al., 2020).

En segundo lugar, nuestro primer estudio piloto mostró que el tratamiento con 4QMn indujo cambios en la expresión de diferentes genes del cuerpo estriado de ratones zQ175neo heterocigotos de un año. Además, nuestro primer ensayo de eficacia demostró que la administración de 5 mg/kg de 4QMn *ad libitum* recuperó parcialmente de forma significativa la expresión de *Darpp32* en el cuerpo estriado de los machos, revirtiéndose así a niveles WT. De forma que un aumento de los niveles de *Darpp32* implicaría una reducción de los déficits en las respuestas electrofisiológicas y bioquímicas que se ven gravemente deterioradas como consecuencia del daño en la señalización dopaminérgica, que precede incluso a la aparición de

cambios histopatológicos y de comportamiento (Bibb et al., 2000). Nuestros resultados también sugirieron una tendencia por parte del tratamiento a incrementar el nivel de la proteína Darpp32 en el cuerpo estriado, pero las diferencias no fueron significativas.

Por otro lado, el tratamiento con 4QMn redujo el número de gránulos de mHtt en los núcleos de las neuronas del cuerpo estriado en machos, pero no influyó en su área, aunque en las hembras no se observó tal efecto. Como se ha comentado en la introducción, la translocación nuclear de la proteína mutante incrementa los efectos tóxicos, produciendo finalmente un bloqueo de las rutas metabólicas (Ross & Tabrizi, 2011). Por tanto, la reducción del número de agregados nucleares por parte del 4QMn se podría traducir en una disminución de la toxicidad celular causada por la propia enfermedad. Nuestros resultados también sugirieron que el tratamiento con 4QMn tiende a disminuir los niveles de Htt de los machos tratados durante 42 semanas, pero las diferencias no fueron significativas.

La evaluación de diferentes marcadores, así como el resultado de los experimentos de eficacia del compuesto fue variable en función del sexo de los ratones. Hecho que pudiera indicar una diferenciación entre sexos tanto a nivel molecular como a nivel fenotípico que podría depender de varios factores internos y/o externos relacionados con la enfermedad o no. Estudios previos defienden que la progresión y severidad del fenotipo de la EH, entre otras enfermedades neurodegenerativas, es diferencial entre machos y hembras (Ullah et al., 2019). En general, existe información contradictoria en cuanto a la edad de inicio y la progresión de la enfermedad entre machos y hembras, ya que hay estudios que sugieren que la sintomatología en el sexo femenino es más perjudicial, mientras que otros sugieren que es menos severa por el efecto neuroprotector de algunas hormonas sexuales femeninas (Smith & Dahodwala, 2014). Sin embargo, hay evidencias de que los estrógenos tienen efecto neuroprotector sobre los mecanismos subyacentes de la EH, concretamente sobre el estrés oxidativo y la excitotoxicidad del glutamato (Van Dyck et al., 1995). La mayoría sugieren que la edad de inicio de la EH es mayor y la evolución de la enfermedad es más moderada en hembras que en machos (Bode et al., 2008). De tal forma que, en nuestros ratones, determinar la eficacia del 4QMn en hembras supondría una mayor dificultad.

Finalmente, se estudió la Htt en diferentes órganos de ratones zQ175neo heterocigotos macho de 72 semanas. Solo se detectó Htt de longitud completa por Western Blot en el cerebro de los animales, en cambio, en diferentes órganos se detectaron diferentes fragmentos de la proteína (cerebro, hígado y corazón). Estos fragmentos corresponden al resultado de modificaciones postraduccionales que sufre la Htt de longitud completa por parte de caspasas, calpaínas y endopeptidasas proporcionando variedad de fragmentos N-terminales (Gatto et al., 2020; Schut et al., 2017). No se encontraron diferencias significativas con el tratamiento con 4QMn sobre

estos fragmentos en el cerebro, hígado ni corazón, pero en cambio, estos fragmentos no fueron detectados en el bazo, el páncreas, el riñón ni el músculo de los ratones del estudio. Esto podría explicarse debido a que diferentes estudios mostraron que la Htt se expresa ampliamente, con niveles más altos de expresión en el cerebro, pero también con niveles moderados en testículos, ovario, pulmón y bajos en hígado, corazón, riñón e intestino delgado de ratas y humanos (Ernfors et al., 1990; Li et al., 1993). Así mismo, otros estudios en ratones B6.HttQ111/+ como modelo murino de la EH indicaron que la sobreexpresión de Huntingtina conduce a aumentos importantes tanto en el peso corporal como en el tamaño de varios órganos, incluidos el corazón, el hígado, los riñones y el bazo (Coffey et al., 2017). El hecho de que nuestros ratones presenten un reducido peso corporal en comparación con ratones WT podría explicar los reducidos niveles de Htt y fragmentos de la proteína en los tejidos de nuestros ratones zQ175neo. Esto sugiere que los niveles de Htt en los tejidos periféricos pueden tener importantes impactos fisiológicos que merecen una investigación continua.

Por fines empresariales, se ha priorizado la evaluación del fenotipo para determinar la eficacia del compuesto como tratamiento para la EH. Como consecuencia, se han visto diferencias significativas en los primeros meses de tratamiento, pero como muestran los resultados, las valoraciones convergen en el punto final (figura 33). Esto podría deberse a que, llegados a ese punto, la toxicidad celular ocasionada por los acúmulos de mHtt característicos de la EH se encuentra en un estado tan avanzado que dificulta diferenciar fenotípicamente los ratones controles de los tratados. De igual forma, en este punto, es complicado observar un patrón de expresión génica diferencial entre ambos grupos, así como diferencias en cuanto al tamaño y cantidad de cúmulos de mHtt. Pese a ello, a término del ensayo de eficacia, se ha visto efecto por el tratamiento en cuanto al incremento de la expresión de *Darpp32* y la disminución del número de agregados en el núcleo de las neuronas del cuerpo estriado de ratones macho.

Por tanto, con estos resultados hemos obtenido una aproximación a partir de la que se pueden obtener resultados prometedores en el futuro, especialmente en machos. Una de las principales consideraciones para tener en cuenta en el diseño de futuros experimentos o ensayos dirigidos a evaluar la eficacia del 4QMn en modelos murinos, es el incremento de la N. De tal manera que, por un lado, se va a iniciar un nuevo ensayo para determinar el rescate locomotor utilizando un mayor grupo de ratones, así como para evaluar los depósitos de mHtt en el cuerpo estriado. Por otro lado, se van a validar los resultados de qPCR con más ratones. En ambos casos, el punto final del ensayo será anterior al tomado en los ensayos de eficacia realizados hasta el momento con el objetivo de evaluar dichos parámetros en el momento en el que se ha enlentecido la pérdida de fuerza y equilibrio en machos y hembras respectivamente. Esto sería tras un periodo de tratamiento de ratones de un año de alrededor de 4 meses.

Finalmente, en referencia al mecanismo de acción, previamente se llevaron a cabo estudios por Western Blot en colaboración con el CIPF para analizar la expresión o modificación de distintas kinasas implicadas en la ruta de la autofagia, particularmente de mTOR y MAPK, en líneas celulares humanas con distintas deficiencias en la autofagia. Los resultados sugirieron que la activación de la autofagia por 4QMn podría estar mediada por la ruta de AMPK (datos no publicados). AMPK es una serina/treonina-proteína quinasa conservada evolutivamente que actúa como un sensor de energía en las células y juega un papel clave en la regulación positiva del catabolismo y la inactivación del anabolismo (Mihaylova & Shaw, 2011). En diversas condiciones fisiológicas y patológicas, AMPK puede fosforilarse y unirse a AMP o ADP en lugar de ATP, lo que lleva a su activación (Li & Chen, 2019). La AMPK activada regula una variedad de procesos metabólicos, incluida la autofagia. AMPK promueve la autofagia directamente mediante la fosforilación de proteínas relacionadas con la autofagia o indirectamente mediante la regulación de la expresión de genes relacionados con la autofagia (Tamargo-Gómez & Mariño, 2018). Nuestros resultados en *C. elegans*, sin embargo, sugieren que en células que sobreexpresan mHtt, el 4QMn no actúa a través de AMPK. En mamíferos, existen otras rutas que intervienen en la iniciación de la autofagia. La generación de regiones ricas en fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P) del retículo endoplásmico que forman fagóforos inicia la autofagia. La PI(3)P es generada por hVps34, la subunidad catalítica del complejo Beclin-1, y es necesaria para el reclutamiento de componentes de autofagia posteriores, como WIPI1 / 2 y DFCP1 (Jia et al., 2017; Wang et al., 2010). El complejo de quinasa ULK1 / 2, que incluye ULK1, ULK2, ATG13 y RB1CC1, también es necesario para el inicio de la autofagia. Regula positivamente el complejo Beclin-1 indirectamente al promover su liberación de los microtúbulos y posiblemente directamente al fosforilar Beclin1 y estimular la actividad de hVps34 (Tan et al., 2021; Zachari & Ganley, 2017). Uno de nuestros futuros objetivos es tratar con 4QMn otros mutantes relacionados con estas rutas para intentar esclarecer es el mecanismo de activación de la autofagia por 4QMn.

Este proyecto presenta otra parte *in vitro* en la que se estudia el mecanismo de acción del 4QMn en modelos celulares. Ambos trabajos se complementan entre sí para validar de forma combinada la acción del 4QMn. Además, dicho compuesto se ha probado en diferentes modelos de enfermedades, incluyendo Lafora y degeneración retiniana, y se plantean otros modelos para ampliar su espectro de acción con el objetivo de, más adelante, extender los ensayos a otras enfermedades basadas en alteraciones similares para mejorar la calidad de vida de las personas.

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1804, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>
- Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado, O., Vernia, S., Boya, P., Sanz, P., de Córdoba, S. R., Knecht, E., & Rubinsztein, D. C. (2010). Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Human Molecular Genetics*, *19*(14). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq190>
- Bäckström, D., Linder, J., Jakobson Mo, S., Riklund, K., Zetterberg, H., Blennow, K., Forsgren, L., & Lenfeldt, N. (2020). NfL as a biomarker for neurodegeneration and survival in Parkinson disease. *Neurology*, *95*(7), e827–e838. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010084>
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nerwińska, K., & Małeck, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. In *Pharmacological Reports* (Vol. 60, Issue 5).
- Bibb, J. A., Yan, Z., Svenningsson, P., Snyder, G. L., Pieribone, V. A., Horiuchi, A., Nairn, A. C., Messer, A., & Greengard, P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.120166397>
- Bode, F. J., Stephan, M., Suhling, H., Pabst, R., Straub, R. H., Raber, K. A., Bonin, M., Nguyen, H. P., Riess, O., Bauer, A., Sjöberg, C., Petersén, Å., & von Hörsten, S. (2008). Sex differences in a transgenic rat model of Huntington's disease: decreased 17 $\beta$ -estradiol levels correlate with reduced numbers of DARPP32+ neurons in males. *Human Molecular Genetics*, *17*(17), 2595–2609. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn159>
- Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri Medicine*, *110*(3).
- Buckup, S. (2008). Global public-private partnerships against neglected diseases: Building governance structures for effective outcomes. *Health Economics, Policy and Law*, *3*(1). <https://doi.org/10.1017/S1744133107004392>
- Byrne, L. M., Rodrigues, F. B., Johnson, E. B., Wijeratne, P. A., De Vita, E., Alexander, D. C., Palermo, G., Czech, C., Schobel, S., Scahill, R. I., Heslegrave, A., Zetterberg, H., & Wild, E. J. (2018). Evaluation of mutant huntingtin and neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease. *Science Translational Medicine*, *10*(458). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat7108>
- Canet, M. J., Hardwick, R. N., Lake, A. D., Kopplin, M. J., Scheffer, G. L., Klimecki, W. T., Gandolfi, A. J., & Cherrington, N. J. (2012). Altered arsenic disposition in experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metabolism and Disposition*, *40*(9). <https://doi.org/10.1124/dmd.112.046177>
- Cattaneo, E., Zuccato, C., & Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: An alternative approach to Huntington's disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 6, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/nrn1806>
- Chang, R., Liu, X., Li, S., & Li, X. J. (2015). Transgenic animal models for study of the pathogenesis of huntington's disease and therapy. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 9). <https://doi.org/10.2147/DDDT.S58470>

- Cisbani, G., & Cicchetti, F. (2012). An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. In *Cell Death and Disease* (Vol. 3, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.121>
- Clares, M. P., Serena, C., Blasco, S., Nebot, A., Del Castillo, L., Soriano, C., Domènech, A., Sánchez-Sánchez, A. V., Soler-Calero, L., Mullor, J. L., García-España, A., & García-España, E. (2015). Mn(II) complexes of scoriand-like ligands. A model for the MnSOD active centre with high in vitro and in vivo activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.11.001>
- Coffey, S. R., Bragg, R. M., Minnig, S., Ament, S. A., Cattle, J. P., Glickenhau, A., Shelnut, D., Carrillo, J. M., Shuttleworth, D. D., Rodier, J. A., Noguchi, K., Bennett, C. F., Price, N. D., Kordasiewicz, H. B., & Carroll, J. B. (2017). Peripheral huntingtin silencing does not ameliorate central signs of disease in the B6.HttQ111/+ mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175968>
- Colvin, M., & Maravelias, C. T. (2008). A stochastic programming approach for clinical trial planning in new drug development. *Computers and Chemical Engineering*, 32(11). <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2007.11.010>
- Cowan, C. M., & Raymond, L. A. (2006). Selective Neuronal Degeneration in Huntington's Disease. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 75). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)75002-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)75002-5)
- Crook, Z. R., & Housman, D. (2011). Huntington's Disease: Can Mice Lead the Way to Treatment? In *Neuron* (Vol. 69, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.035>
- Crusio, W. E. [Ed], Sluyter, F. [Ed], Gerlai, R. T. [Ed], & Pietropaolo, S. [Ed]. (2013). Behavioral genetics of the mouse, Vol. 1: Genetics of behavioral phenotypes. In *Behavioral genetics of the mouse, Vol. 1: Genetics of behavioral phenotypes*.
- Dorner, J. L., Miller, B. R., Barton, S. J., Brock, T. J., & Rebec, G. V. (2007). Sex differences in behavior and striatal ascorbate release in the 140 CAG knock-in mouse model of Huntington's disease. *Behavioural Brain Research*, 178(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.12.004>
- Drug Development & Delivery. (s.f.). Disease-Modifying Drugs Will Propel Huntington's Disease Market to \$2.6 Billion. Recuperado el 9 de febrero del 2021, de <https://drug-dev.com/disease-modifying-drugs-will-propel-huntingtons-disease-market-to-2-6-billion/#:~:text=to%20%242.6%20Billion-,Disease%20Modifying%20Drugs%20Will%20Propel%20Huntington's%20Disease%20Market%20to%20%242.6,research%20and%20consulting%20firm%20GlobalData>.
- Ehrlich, M. E. (2012). Huntington's Disease and the Striatal Medium Spiny Neuron: Cell-Autonomous and Non-Cell-Autonomous Mechanisms of Disease. In *Neurotherapeutics* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0112-2>
- Engber, D. (2011). The Trouble With Black-6: A Tiny Alcoholic Takes Over the Lab. *Slate*.
- Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., & Persson, H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, 5(4). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90090-3)
- EvaluatePharma®. (2018). Orphan Drug Report 2018. *EvaluatePharma®*, May.

- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjostedt, E., Lundberg, E., Szgyarto, C. A. K., Skogs, M., Ottosson Takanen, J., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., ... Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(2). <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Franco-Iborra, S., Plaza-Zabala, A., Montpeyo, M., Sebastian, D., Vila, M., & Martinez-Vicente, M. (2021). Mutant HTT (huntingtin) impairs mitophagy in a cellular model of Huntington disease. *Autophagy*, 17(3). <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1728096>
- Fridavich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 64). <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Gao, C., Fang, L., Zhang, H., Zhang, W. S., Li, X. O., & Du, S. Y. (2020). Metformin induces autophagy via the ampk-mtor signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Management and Research*, 12. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S257966>
- Gatto, E. M., Rojas, N. G., Persi, G., Etcheverry, J. L., Cesarini, M. E., & Perandones, C. (2020). Huntington disease: Advances in the understanding of its mechanisms. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.prdoa.2020.100056>
- Gibson, J. S., & Claassen, D. O. (2021). State-of-the-art pharmacological approaches to reduce chorea in Huntington's disease. In *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (Vol. 22, Issue 8). <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1876666>
- Gil, J. M., & Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 27, Issue 11). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06310.x>
- Gil, J. M., & Rego, A. C. (2009). The R6 lines of transgenic mice: A model for screening new therapies for Huntington's disease. In *Brain Research Reviews* (Vol. 59, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.001>
- Goold, R., Flower, M., Moss, D. H., Medway, C., Wood-Kaczmar, A., Andre, R., Farshim, P., Bates, G. P., Holmans, P., Jones, L., & Tabrizi, S. J. (2019). FAN1 modifies Huntington's disease progression by stabilizing the expanded HTT CAG repeat. *Human Molecular Genetics*, 28(4), 650–661. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy375>
- Goold, R., Hamilton, J., Menneteau, T., Flower, M., Bunting, E. L., Aldous, S. G., Porro, A., Vicente, J. R., Allen, N. D., Wilkinson, H., Bates, G. P., Sartori, A. A., Thalassinou, K., Balmus, G., & Tabrizi, S. J. (2021). FAN1 controls mismatch repair complex assembly via MLH1 retention to stabilize CAG repeat expansion in Huntington's disease. *Cell Reports*, 36(9). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109649>
- Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., André, V. M., Wilburn, B., Lu, X. H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S. H., Sun, Y. E., Li, X. J., Levine, M. S., & Yang, X. W. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *Journal of Neuroscience*, 28(24). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0857-08.2008>
- Gutiérrez-Hernández, P., & Abásolo-Alessón, I. (2021). The health care sector in the economies of the European Union: an overview using an input–output framework. *Cost Effectiveness and Resource Allocation*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12962-021-00258-8>



- Guyenet, S. J., Furrer, S. A., Damian, V. M., Baughan, T. D., la Spada, A. R., & Garden, G. A. (2010). A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *Journal of Visualized Experiments*, 39. <https://doi.org/10.3791/1787>
- Heikkinen, T., Lehtimäki, K., Vartiainen, N., Puoliväli, J., Hendricks, S. J., Glaser, J. R., Bradaia, A., Wadel, K., Touller, C., Kontkanen, O., Yrjänheikki, J. M., Buisson, B., Howland, D., Beaumont, V., Munoz-Sanjuan, I., & Park, L. C. (2012). Characterization of Neurophysiological and Behavioral Changes, MRI Brain Volumetry and 1H MRS in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050717>
- Heng, M. Y., Detloff, P. J., & Albin, R. L. (2008). Rodent genetic models of Huntington disease. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 32, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.06.005>
- Hockly, E., Cordery, P. M., Woodman, B., Mahal, A., Van Dellen, A., Blakemore, C., Lewis, C. M., Hannan, A. J., & Bates, G. P. (2002). Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice. *Annals of Neurology*, 51(2). <https://doi.org/10.1002/ana.10094>
- Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L. A., Hartog, C., Goldstein, D. R., Thu, D., Hollingsworth, Z. R., Collin, F., Synek, B., Holmans, P. A., Young, A. B., Wexler, N. S., Delorenzi, M., Kooperberg, C., Augood, S. J., ... Luthi-Carter, R. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human Molecular Genetics*, 15(6). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl013>
- Hossainy, N. M. (2009). Late diagnosis of a rare disease. *BMJ Case Reports*. <https://doi.org/10.1136/bcr.07.2008.0386>
- Huntington's Disease Society of America. (s.f.). Therapies in pipeline. Recuperado el 16 de julio del 2021, de <https://hdsa.org/hd-research/therapies-in-pipeline/>
- Illarioshkin, S. N., Klyushnikov, S. A., Vigont, V. A., Seliverstov, Y. A., & Kaznacheyeva, E. V. (2018). Molecular Pathogenesis in Huntington's Disease. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 83, Issue 9). <https://doi.org/10.1134/S0006297918090043>
- Isaacson, J. (2016). Analysis of Orphan Drug Market. *Life Sci Capital*.
- Jia, H., Liang, Z., Zhang, X., Wang, J., Xu, W., & Qian, H. (2017). 14-3-3 proteins: An important regulator of autophagy in diseases. In *American Journal of Translational Research* (Vol. 9, Issue 11).
- Jimenez-Shahed, J., & Jankovic, J. (2013). Tetrabenazine for treatment of chorea associated with Huntington's disease and other potential indications. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 1(5). <https://doi.org/10.1517/21678707.2013.787358>
- Kay, C., Hayden, M. R., & Leavitt, B. R. (2017). Epidemiology of Huntington disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 144). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801893-4.00003-1>
- Kuhn, A., Goldstein, D. R., Hodges, A., Strand, A. D., Sengstag, T., Kooperberg, C., Becanovic, K., Pouladi, M. A., Sathasivam, K., Cha, J. H. J., Hannan, A. J., Hayden, M. R., Leavitt, B. R., Dunnett, S. B., Ferrante, R. J., Albin, R., Shelbourne, P., Delorenzi, M., Augood, S. J., Luthi-Carter, R. (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human Molecular Genetics*, 16(15). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm133>
- Lee, A. L., Ung, H. M., Sands, L. P., & Kikis, E. A. (2017). A new *Caenorhabditis elegans* model of human huntingtin 513 aggregation and toxicity in body wall muscles. *PLoS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173644>

- Levine, M. S., Klapstein, G. J., Koppel, A., Gruen, E., Cepeda, C., Vargas, M. E., Jokel, E. S., Carpenter, E. M., Zanjani, H., Hurst, R. S., Efstratiadis, A., Zeitlin, S., & Chesselet, M. F. (1999). Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *58*(4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19991115\)58:4<515::AID-JNR5>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19991115)58:4<515::AID-JNR5>3.0.CO;2-F)
- Li, H., Li, S. H., Johnston, H., Shelbourne, P. F., & Li, X. J. (2000). Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nature Genetics*, *25*(4). <https://doi.org/10.1038/78054>
- Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., Li, X., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L., Ranen, N. G., Folstein, S. E., Hedreen, J. C., & Ross, C. A. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, *11*(5). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90127-D](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90127-D)
- Li, Y., & Chen, Y. (2019). AMPK and Autophagy. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1206). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_4)
- Lin, C. H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W. M., Cearley, J. A., Jackson, W. S., Crouse, A. B., Ren, S., Li, X. J., Albin, R. L., & Detloff, P. J. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *10*(2). <https://doi.org/10.1093/hmg/10.2.137>
- Maier, C. M., & Chan, P. H. (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. In *Neuroscientist* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.1177/107385840200800408>
- Martinez-Horta, S., Perez-Perez, J., van Duijn, E., Fernandez-Bobadilla, R., Carceller, M., Pagonabarraga, J., Pascual-Sedano, B., Campolongo, A., Ruiz-Idiago, J., Sampedro, F., Landwehrmeyer, G. B., & Kulisevsky, J. (2016). Neuropsychiatric symptoms are very common in premanifest and early stage Huntington's Disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, *25*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.02.008>
- Menalled, L. B. (2005). Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx*, *2*(3). <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.465>
- Menalled, L. B., Kudwa, A. E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., Ruiz, M., Mushlin, R., Alosio, W., McConnell, K., Connor, D., Murphy, C., Oakeshott, S., Kwan, M., Beltran, J., Ghavami, A., Brunner, D., Park, L. C., Ramboz, S., & Howland, D. (2012). Comprehensive Behavioral and Molecular Characterization of a New Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease: ZQ175. *PLoS ONE*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049838>
- Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Chesselet, M. F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *Journal of Comparative Neurology*, *465*(1). <https://doi.org/10.1002/cne.10776>
- Menalled, L. B., Sison, J. D., Wu, Y., Olivieri, M., Li, X. J., Li, H., Zeitlin, S., & Chesselet, M. F. (2002). Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *Journal of Neuroscience*, *22*(18). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-18-08266.2002>
- Menalled, L. B., El-Khodor, B. F., Patry, M., Suárez-Fariñas, M., Orenstein, S. J., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X. W., MacDonald, M., Morton, A. J., Bates, G., Leeds, J., Park, L., Howland, D., Signer, E., Tobin, A., & Brunner, D. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiology of Disease*, *35*(3). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.007>

- Miguel, R., Mendonça, M. D., Barbosa, R., Ladeira, F., Lampreia, T., Vale, J., & Bugalho, P. (2017). Tetrabenazine in treatment of hyperkinetic movement disorders: An observational study. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 10(2). <https://doi.org/10.1177/1756285616677004>
- Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. In *Nature Cell Biology* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/ncb2329>
- Mikami, K. (2019). Orphans in the Market: The History of Orphan Drug Policy. In *Social History of Medicine* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/shm/hkx098>
- Mikami, K., & Sturdy, S. (2017). Patient organization involvement and the challenge of securing access to treatments for rare diseases: Report of a policy engagement workshop. In *Research Involvement and Engagement* (Vol. 3, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40900-017-0065-z>
- Munoz-Sanjuan, I., & Bates, G. P. (2011). The importance of integrating basic and clinical research toward the development of new therapies for Huntington disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 121, Issue 2). <https://doi.org/10.1172/JCI45364>
- Nance, M. A. (2017). Genetics of Huntington disease. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 144). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801893-4.00001-8>
- Nguyen, H. H. P., & Weydt, P. (2018). Huntington disease. In *Medizinische Genetik* (Vol. 30, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0190-6>
- Nicolini, F., Haider, S., Reis Marques, T., Muhlert, N., Tziortzi, A. C., Searle, G. E., Natesan, S., Piccini, P., Kapur, S., Rabiner, E. A., Gunn, R. N., Tabrizi, S. J., & Politis, M. (2015). Altered PDE10A expression detectable early before symptomatic onset in Huntington's disease. *Brain*, 138(10). <https://doi.org/10.1093/brain/awv214>
- Nopoulos, P. C. (2016). Huntington disease: A single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1). <https://doi.org/10.31887/dcons.2016.18.1/pnopoulos>
- Orth, M., Handley, O. J., Schwenke, C., Dunnett, S. B., Craufurd, D., Ho, A. K., Wild, E., Tabrizi, S. J., & Landwehrmeyer, G. B. (2010). Observing Huntington's disease: The European Huntington's disease network's registry. *PLoS Currents*, SEP. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1184>
- Orth, M., Handley, O. J., Schwenke, C., Dunnett, S., Wild, E. J., Tabrizi, S. J., & Landwehrmeyer, G. B. (2011). Observing Huntington's disease: The European Huntington's Disease Network's REGISTRY. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (Vol. 82, Issue 12). <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.209668>
- Paulsen, J. S., Langbehn, D. R., Stout, J. C., Aylward, E., Ross, C. A., Nance, M., Guttman, M., Johnson, S., MacDonald, M., Beglinger, L. J., Duff, K., Kayson, E., Biglan, K., Shoulson, I., Oakes, D., & Hayden, M. (2008). Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: The Predict-HD study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(8). <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.128728>
- Paulsen, J. S., Miller, A. C., Hayes, T., & Shaw, E. (2017). Cognitive and behavioral changes in Huntington disease before diagnosis. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 144). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801893-4.00006-7>
- Peng, Q., Wu, B., Jiang, M., Jin, J., Hou, Z., Zheng, J., Zhang, J., & Duan, W. (2016). Characterization of behavioral, neuropathological, brain metabolic and key molecular changes in zQ175 knock-in mouse model of huntington's disease. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148839>

- Pinto, R. M., Dragileva, E., Kirby, A., Lloret, A., Lopez, E., St. Claire, J., Panigrahi, G. B., Hou, C., Holloway, K., Gillis, T., Guide, J. R., Cohen, P. E., Li, G. M., Pearson, C. E., Daly, M. J., & Wheeler, V. C. (2013). Mismatch Repair Genes Mlh1 and Mlh3 Modify CAG Instability in Huntington's Disease Mice: Genome-Wide and Candidate Approaches. *PLoS Genetics*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003930>
- Podvin, S., Reardon, H. T., Yin, K., Mosier, C., & Hook, V. (2019). Multiple clinical features of Huntington's disease correlate with mutant HTT gene CAG repeat lengths and neurodegeneration. In *Journal of Neurology* (Vol. 266, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8940-6>
- Post, A. E. M., Klockgether, T., Landwehrmeyer, G. B., Pandolfo, M., Arnesen, A., Reinhard, C., & Graessner, H. (2021). Research priorities for rare neurological diseases: a representative view of patient representatives and healthcare professionals from the European Reference Network for Rare Neurological Diseases. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01641-z>
- Pouladi, M. A., Morton, A. J., & Hayden, M. R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrn3570>
- Reiner, A., Dragatsis, I., & Dietrich, P. (2011). Genetics and neuropathology of huntington's disease. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381328-2.00014-6>
- Rising, A. C., Xu, J., Carlson, A., Napoli, V. V., Denovan-Wright, E. M., & Mandel, R. J. (2011). Longitudinal behavioral, cross-sectional transcriptional and histopathological characterization of a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *Experimental Neurology*, 228(2). <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.12.017>
- Rodwell, C., & Aymé, S. (2015). Rare disease policies to improve care for patients in Europe. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.02.008>
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. In *The Lancet Neurology* (Vol. 10, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)
- Saavedra, A., García-Díaz Barriga, G., Pérez-Navarro, E., & Alberch, J. (2018). Huntington's disease: novel therapeutic perspectives hanging in the balance. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 22, Issue 5). <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1465930>
- Sadri-Vakili, G., & Cha, J. H. J. (2006). Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington's disease. In *Nature Clinical Practice Neurology* (Vol. 2, Issue 6). <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0199>
- Sanchis, A., García-Gimeno, M. A., Cañada-Martínez, A. J., Sequedo, M. D., Millán, J. M., Sanz, P., & Vázquez-Manrique, R. P. (2019). Metformin treatment reduces motor and neuropsychiatric phenotypes in the zQ175 mouse model of Huntington disease. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(6). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0264-9>
- Sassone, J., Colciago, C., Cislighi, G., Silani, V., & Ciammola, A. (2009). Huntington's disease: The current state of research with peripheral tissues. In *Experimental Neurology* (Vol. 219, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.012>

- Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T. A., Landles, C., Benjamin, A. C., Bondulich, M. K., Smith, D. L., Faull, R. L. M., Roos, R. A. C., Howland, D., Detloff, P. J., Housman, D. E., & Bates, G. P. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1221891110>
- Schiermeier, Q. (2020). Horizon 2020 by the numbers: how €60 billion was divided up among Europe's scientists. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-03598-2>
- Schut, M. H., Patassini, S., Kim, E. H., Bullock, J., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Pepers, B. A., Den Dunnen, J. T., Van Ommen, G. J. B., & Van Roon-Mom, W. M. C. (2017). Effect of post-mortem delay on N-terminal huntingtin protein fragments in human control and Huntington disease brain lysates. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178556>
- Serena, C., Calvo, E., Clares, M. P., Diaz, M. L., Chicote, J. U., Beltrán-Debon, R., Fontova, R., Rodriguez, A., García-España, E., & García-España, A. (2015). Significant in vivo anti-inflammatory activity of pyren4Q-Mn  $\alpha$  superoxide dismutase 2 (SOD2) mimetic scorpion-like Mn (II) complex. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119102>
- Shao, J., & Diamond, M. I. (2007). Polyglutamine diseases: Emerging concepts in pathogenesis and therapy. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 16, Issue R2). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm213>
- Siebzehnrübl, F. A., Raber, K. A., Urbach, Y. K., Schulze-Krebs, A., Canneva, F., Mocerri, S., Habermeyer, J., Achoui, D., Gupta, B., Steindler, D. A., Stephan, M., Nguyen, H. P., Bonin, M., Riess, O., Bauer, A., Aigner, L., Couillard-Despres, S., Paucar, M. A., Svenningsson, P., ... Von Hörsten, S. (2018). Early postnatal behavioral, cellular, and molecular changes in models of Huntington disease are reversible by HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(37). <https://doi.org/10.1073/pnas.1807962115>
- Skillsings, E. A., Wood, N. I., & Morton, A. J. (2014). Beneficial effects of environmental enrichment and food entrainment in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain and Behavior*, 4(5). <https://doi.org/10.1002/brb3.235>
- Slow, E. J., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S. H., Graham, R. K., Deng, Y., Oh, R., Bissada, N., Hossain, S. M., Yang, Y. Z., Li, X. J., Simpson, E. M., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., & Hayden, M. R. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 12, Issue 13). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg169>
- Smith, K. M., & Dahodwala, N. (2014). Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Experimental Neurology*, 259, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.010>
- Smith, M. A., Brandt, J., & Shadmehr, R. (2000). Motor disorder in Huntington's disease begins as a dysfunction in error feedback control. *Nature*, 403(6769). <https://doi.org/10.1038/35000576>
- Strazielle, N., & Ghersi-Egea, J. F. (2013). Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. In *Molecular Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 5). <https://doi.org/10.1021/mp300518e>
- Szlachcic, W. J., Wiatr, K., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., & Figiel, M. (2017). The generation of mouse and human huntington disease iPS cells suitable for In vitro studies on huntingtin function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00253>

- Tabrizi, S. J., Langbehn, D. R., Leavitt, B. R., Roos, R. A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., Hicks, S. L., Fox, N. C., Scahill, R. I., Borowsky, B., Tobin, A. J., Rosas, H. D., Johnson, H., Reilmann, R., Landwehrmeyer, B., & Stout, J. C. (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *The Lancet Neurology*, 8(9). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70170-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70170-X)
- Tamargo-Gómez, I., & Mariño, G. (2018). AMPK: Regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123812>
- Tan, L., Tan, Y., & Liu, D. (2021). Functions of ULK1 in autophagy and non-autophagy pathways and its implications in human physiology and disease. *Biocell*, 44(4). <https://doi.org/10.32604/BIOCELL.2020.09171>
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 36, Issue 12). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
- Tobin, A. J., & Signer, E. R. (2000). Huntington's disease: The challenge for cell biologists. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 10, Issue 12). [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01853-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01853-5)
- Ullah, M. F., Ahmad, A., Bhat, S. H., Abu-Duhier, F. M., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019). Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 102(April), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.003>
- Van Dellen, A., Welch, J., Dixon, R. M., Cordery, P., York, D., Styles, P., Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2000). N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *NeuroReport*, 11(17). <https://doi.org/10.1097/00001756-200011270-00032>
- Van Dyck, C. H., Seibyl, J. P., Malison, R. T., Laruelle, M., Wallace, E., Zoghbi, S. S., Zea-Ponce, Y., Baldwin, R. M., Charney, D. S., Hoffer, P. B., & Innis, R. B. (1995). Age-related decline in striatal dopamine transporter binding with iodine- 123-β-CIT SPECT. *Journal of Nuclear Medicine*, 36(7), 1175–1181.
- Van Raamsdonk, J. M., Pearson, J., Slow, E. J., Hossain, S. M., Leavitt, B. R., & Hayden, M. R. (2005). Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 25(16). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0590-05.2005>
- Voisine, C., Varma, H., Walker, N., Bates, E. A., Stockwell, B. R., & Hart, A. C. (2007). Identification of Potential Therapeutic Drugs for Huntington's Disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 2(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000504>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR Journal*, 55(2). <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu013>
- Wang, B., Ling, S., & Lin, W.-C. (2010). 14-3-3 $\tau$  Regulates Beclin 1 and Is Required for Autophagy. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010409>
- Wang, C. E., Tydlacka, S., Orr, A. L., Yang, S. H., Graham, R. K., Hayden, M. R., Li, S., Chan, A. W. S., & Li, X. J. (2008). Accumulation of N-terminal mutant huntingtin in mouse and monkey models implicated as a pathogenic mechanism in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 17(17). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn175>

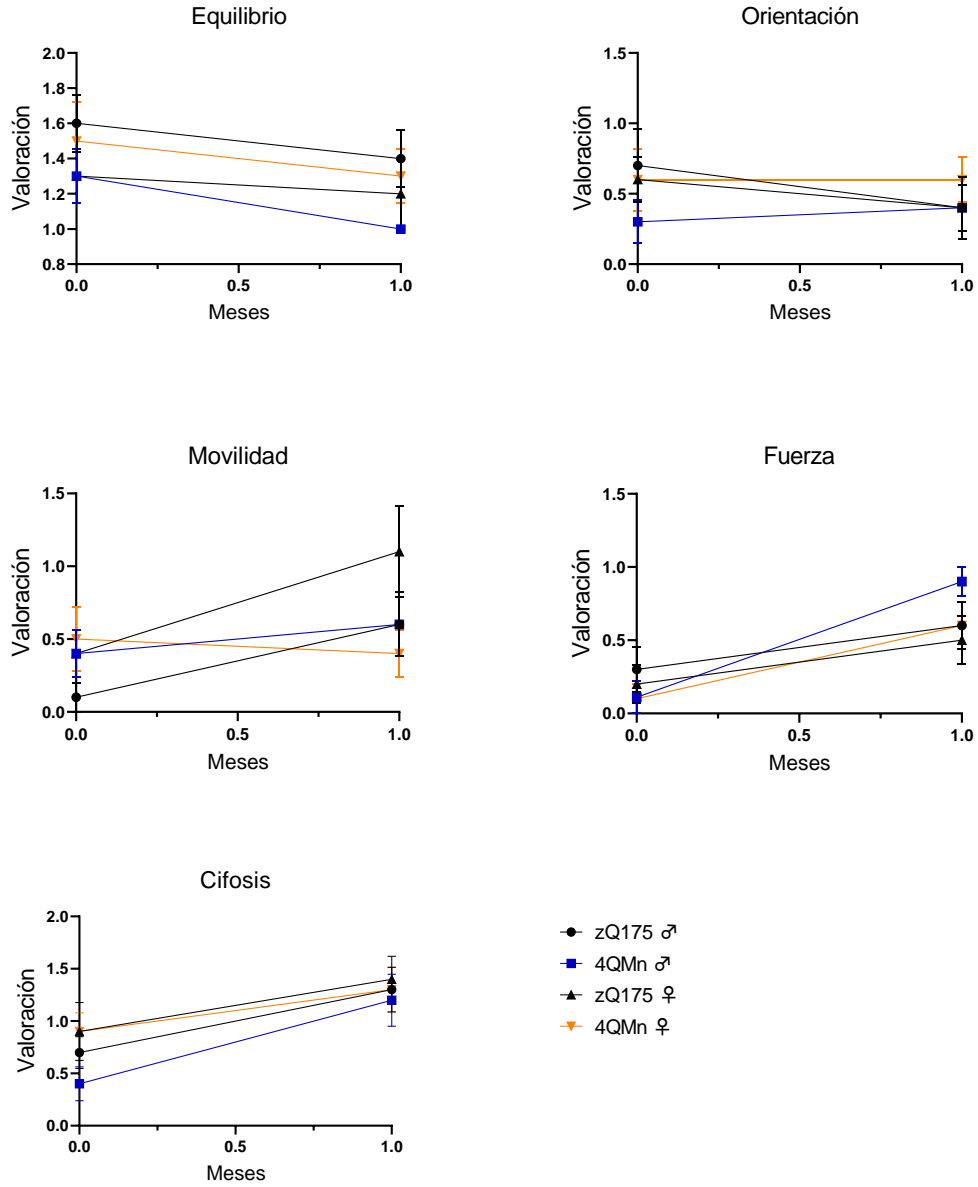
- Wheeler, V. C., Auerbach, W., White, J. K., Srinidhi, J., Auerbach, A., Ryan, A., Duyao, M. P., Vrbnac, V., Weaver, M., Gusella, J. F., Joyner, A. L., & MacDonald, M. E. (1999). Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Human Molecular Genetics*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/hmg/8.1.115>
- White, J. M. (1972). INBREEDING EFFECTS UPON GROWTH AND MATERNAL ABILITY IN LABORATORY MICE. *Genetics*, 70(2). <https://doi.org/10.1093/genetics/70.2.307>
- Williams, P. H. (2011). Policy framework for rare disease health disparities. *Policy, Politics, and Nursing Practice*, 12(2). <https://doi.org/10.1177/1527154411404243>
- Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (2003). Radical-radical reactions of superoxide: A potential route to toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3). [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00810-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00810-6)
- Wright, G., Collins, J., Kay, C., McDonald, C., Dolzhenko, E., Xia, Q., Bečanović, K., Semaka, A., Nguyen, C., Trost, B., Richards, F., Bijlsma, E., Squitieri, F., Scherer, S., Eberle, M., Yuen, R., & Hayden, M. (2019). Length of uninterrupted CAG repeats, independent of polyglutamine size, results in increased somatic instability and hastened age of onset in Huntington disease. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/533414>
- Yang, R. Z., Park, S., Reagan, W. J., Goldstein, R., Zhong, S., Lawton, M., Rajamohan, F., Qian, K., Liu, L., & Gong, D. W. (2009). Alanine aminotransferase isoenzymes: Molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 49(2). <https://doi.org/10.1002/hep.22657>
- Yapjakis, C. (2017). Huntington disease: Genetics, prevention, and therapy approaches. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 987). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57379-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57379-3_6)
- Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 61, Issue 6). <https://doi.org/10.1042/EBC20170021>
- Zheng, Z., & Diamond, M. I. (2012). Huntington disease and the huntingtin protein. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 107). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00010-2>
- Zuberi, A., & Lutz, C. (2016). Mouse models for drug discovery. Can new tools and technology improve translational power? *ILAR Journal*, 57(2). <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw021>

## ANEXOS

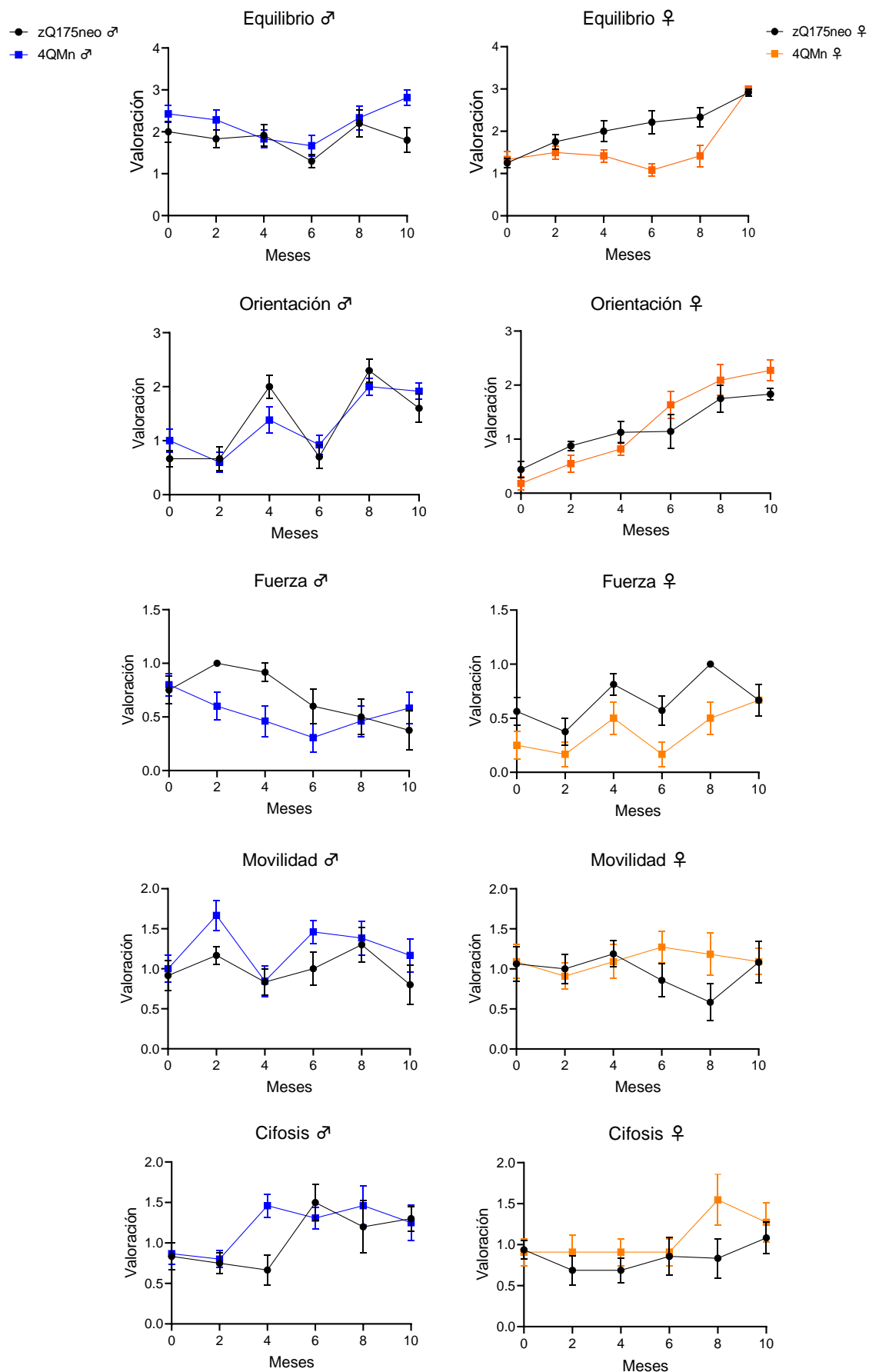


# ANEXOS

## 1. Valoraciones del fenotipo motor del segundo experimento piloto.



## 2. Valoraciones del fenotipo motor del primer ensayo de eficacia



3. Valoraciones del fenotipo motor del segundo ensayo de eficacia.

