



Universidad de Sevilla

Facultad de Medicina

Efecto del tratamiento prolongado con Sorafenib sobre un modelo murino de enfermedad de Alzheimer



Lucía Jiménez Fernández

Grado en Biomedicina Básica y Experimental

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO DE INVESTIGACIÓN

Efecto del tratamiento prolongado con Sorafenib sobre un modelo murino de enfermedad de Alzheimer

Lucía Jiménez Fernández

Tutor: Alberto Pascual Bravo

Cotutor: Ricardo Pardal Redondo

Grado en Biomedicina Básica y Experimental

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

Sevilla, 25 de mayo de 2020

Índice

1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
2.1- Epidemiología	2
2.2- Etiología.....	2
2.3- Patología	3
2.3.1 Placas A β	3
2.3.2 - Ovillos neurofibrilares	4
2.3.3 - Neuroinflamación	4
2.4- Patogénesis.....	5
2.5- Hipótesis vascular	6
2.5.1. Patología vascular.....	6
2.5.2. Papel de la angiogénesis en la EA.....	6
2.5.3. Estudio farmacológico.....	9
3.- Objetivos	10
4.- Materiales y métodos	10
4.1- Modelos animales	10
4.2 - Tratamiento farmacológico	11
4.3 - Inmunohistoquímica	11
4.4 - Microscopía	13
4.5 - Cuantificación.....	13
4.6 - Análisis estadístico	14
5.- Resultados	14
5.1- Efecto del tratamiento con Sorafenib en modelos de EA	14
5.1.1 Tamaño medio de placa A β y anomalía vascular	14
5.1.2 Carga de placas A β y anomalías vasculares	16
5.2 - Fármacos moduladores de la angiogénesis.....	17
5.2.1. Inhibidores de la vía de señalización de VEGF.....	18
5.2.2. Talidomida e IMiDs.....	21
5.2.3. Inhibidores de mTOR	23
6.- Discusión	25
7.- Conclusiones	30
8.- Bibliografía	31
9.- Anexo.....	36

Agradecimientos

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todo el laboratorio por su cercanía y paciencia. Al Dr. Alberto Pascual, por acogerme desde el primer momento; a Alicia y Maribel, por guiarme durante este aprendizaje; y a Almu, Elena y Miguel, por hacerme sentir como en casa. Me habría gustado poder disfrutar de vuestra compañía más tiempo.

A todas mis compañeras de Biomedicina, por haber hecho especiales estos cuatro años de carrera y por haber convertido mi estancia en la universidad en un aprendizaje en todos los sentidos. Os recordaré siempre con cariño. En especial, gracias a las Lucías y a Iria, fieles compañeras de alegrías y penurias.

A Benito Martínez, por hacer el trabajo y la cuarentena más amenos.

A Roberto y a Curro, por haberme ayudado siempre en todo lo que he necesitado. Me siento muy afortunada de teneros a mi lado.

A Juan, por haber sido el pilar más fundamental de mi vida durante estos cuatro años. Gracias por tu lealtad, tu cariño y tu sabiduría.

Por último, a mis padres y a mi hermana, gracias por apoyarme incondicionalmente y creer siempre en mí.

1. Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por el deterioro progresivo de las capacidades cognitivas. Los principales hallazgos histológicos propios de esta patología son acúmulos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) y agregados intracelulares de la proteína Tau hiperfosforilada.

En nuestro laboratorio se ha caracterizado la presencia de anomalías vasculares (AVs) asociadas a las placas $A\beta$, las cuales se producen como consecuencia de un proceso denominado angiogénesis no productiva. Con el fin de estudiar estas AVs y su papel en la EA se plantea la realización de un ensayo con Sorafenib, un inhibidor de la angiogénesis.

En el presente trabajo se llevó a cabo un tratamiento de cuatro semanas con Sorafenib en modelos *APP₇₅₁-SL/+*. Para la evaluación de su efecto se desarrollaron ensayos inmunohistoquímicos sobre los que se realizó una cuantificación de las placas $A\beta$ y las AVs asociadas, con el objetivo de establecer si existen diferencias entre el grupo de ratones expuesto al tratamiento y el grupo control.

Los resultados obtenidos en el trabajo indican que no existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con Sorafenib. Estos resultados no concuerdan con los de numerosos estudios en los que se asocia la inhibición de la angiogénesis con una reducción de las placas $A\beta$ y una mejora en las funciones cognitivas.

2. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, crónica, irreversible y multifactorial. Se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas y se clasifica dentro del grupo de las demencias, constituyendo alrededor de un 60% de los casos⁽¹⁾. Se trata de una enfermedad incapacitante que conlleva una importante carga emocional y de cuidados para los familiares y allegados de los pacientes.

El diagnóstico de la EA es esencialmente clínico y se basa en los criterios de demencia, que se corresponden con las principales manifestaciones clínicas de esta patología. Dichas manifestaciones son: amnesia, alteraciones cognitivas (afasia, apraxia, agnosia y/o alteración de la función ejecutiva) y declive de la funcionalidad del paciente⁽²⁾. En la actualidad se están estudiando otros posibles métodos de diagnóstico, entre los que se encuentran las técnicas de imagen.

Aparte de encontrar métodos de diagnóstico más efectivos, probablemente el principal reto relacionado con el estudio de la EA es la búsqueda de un tratamiento eficaz, ya que los únicos fármacos aprobados a día de hoy no revierten ni frenan el progreso de la enfermedad, simplemente contribuyen a paliar los síntomas. La dificultad de encontrar un tratamiento eficaz se debe a que todavía se desconoce el mecanismo molecular que lleva al deterioro cognitivo.

2.1. Epidemiología

La prevalencia de la EA ha aumentado drásticamente en los últimos años, debido esencialmente al incremento de la esperanza de vida y a la falta de fármacos capaces de curar o revertir la progresión de la enfermedad.

Se estima que la demencia afecta a unas 50 millones de personas y cada año se registran cerca de 10 millones de casos nuevos. Se prevé que el número total de personas con demencia alcance los 82 millones en 2030 y los 152 millones en 2050⁽²⁾.

2.2. Etiología

La EA puede clasificarse desde un punto de vista etiológico en Alzheimer familiar o esporádico. En el primero, los síntomas se producen antes que en el Alzheimer esporádico, comenzando generalmente entre los 30 y los 50 años. Mutaciones en tres

genes (*APP*, *PSEN1* y *PSEN2*) son responsables de estos infrecuentes casos, que agrupan a menos de un 0,5% de los pacientes⁽³⁾.

Las mutaciones mencionadas son autosómicas dominantes y se encuentran en el gen que codifica para la proteína precursora amiloide (*APP*) y en los genes que codifican para el núcleo catalítico de la γ -secretasa, (presenilina 1 o *PSEN1* y presenilina 2 o *PSEN2*)⁽³⁾.

Por otro lado, existen tanto factores de riesgo como factores protectores que influyen en la probabilidad de desarrollar Alzheimer esporádico. La EA es más prevalente en mujeres⁽⁴⁾, aunque los hombres tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, que a su vez se pueden relacionar con la EA. En cuanto a factores genéticos, el alelo *APOE* ϵ 4 se considera un factor de riesgo, mientras que el alelo *APOE* ϵ 2 constituye un factor protector⁽⁵⁾. Además, se ha encontrado una relación entre la EA esporádica y la presencia de determinadas variantes de *TREM2*, un receptor de membrana de las células de la microglía que interviene en la activación de las mismas⁽⁶⁾. Otros factores de riesgo destacables son la hipertensión, la obesidad, la diabetes, la depresión y el tabaquismo⁽⁴⁾. Por otra parte, diversos estudios epidemiológicos apuntan a que realizar ejercicio físico y tener estudios superiores pueden ser factores protectores⁽⁷⁾, probablemente porque conllevan mantener el cuerpo y la mente activa, respectivamente.

2.3. Patología

La EA se caracteriza por los siguientes hallazgos patológicos: placas β -amiloide ($A\beta$), ovillos neurofibrilares, daño vascular y pérdida de neuronas⁽⁸⁾. A dichas características distintivas habría que añadir la presencia de neuroinflamación, otro de los rasgos propios de esta patología.

2.3.1. Placas $A\beta$

Las placas $A\beta$ son agregados extracelulares compuestos esencialmente por péptidos $A\beta$ mal plegados de 40 o 42 aminoácidos ($A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$)⁽¹⁾. Dichas placas se desarrollan en primer lugar en el isocórtex y posteriormente afectan a las estructuras subcorticales⁽⁹⁾. Los péptidos $A\beta$ son generados en el procesamiento proteolítico de la proteína *APP*, el cual puede llevarse a cabo mediante dos rutas: la ruta no amiloidogénica y la ruta amiloidogénica. En la primera vía el *APP* es procesado por la α -secretasa y posteriormente por la γ -secretasa, mientras que en la segunda ruta intervienen secuencialmente la β -secretasa y la γ -secretasa⁽¹⁰⁾. La γ -secretasa es una proteasa de

membrana cuyo componente catalítico es la presinilina (PSEN). Debido a la capacidad de esta enzima de cortar la proteína en diversas zonas, la longitud del péptido resultante puede variar. Los más comunes son A β ₄₀ y A β ₄₂, siendo el último el que posee mayor capacidad de agregación⁽¹¹⁾.

Aparte de la producción de los péptidos, es necesario tener en cuenta la eliminación de los mismos, ya que la acumulación de A β tiene lugar cuando se produce un desequilibrio entre ambos procesos. Existen varios mecanismos implicados en la eliminación de A β en el parénquima, entre los que se encuentran la autofagia, el transporte mediante la barrera hematoencefálica y la degradación mediada por proteasas, microglía y astrocitos^(12,13).

2.3.2. Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares están compuestos esencialmente por filamentos de proteína Tau hiperfosforilada. Esta patología generalmente comienza en el lóbulo medial temporal, en concreto en la corteza entorrinal e hipocampo, y posteriormente se expande hacia el isocórtex asociativo. La pérdida de neuronas y sinapsis tiene una progresión similar a la de la formación de los ovillos.

2.3.3. Neuroinflamación

La microglía constituye la base del sistema inmunitario del sistema nervioso. En la EA encontramos microglía en diversos estados. En uno de ellos, la microglía tiene una acción proinflamatoria, de manera que libera citoquinas y radicales libres que pueden causar estrés oxidativo y dañar a las células. Por otro lado, la microglía tiene capacidad para fagocitar los desechos celulares, entre los que se encuentra el péptido A β , lo cual previene la acumulación del mismo. La expresión del gen *CD33* promueve el estado proinflamatorio, mientras que *TREM2* lo desactiva⁽¹⁴⁾. Como se ha mencionado previamente, determinadas variantes de *TREM2* se consideran factores de riesgo de la EA, lo que indica que la microglía juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

La microglía proinflamatoria puede causar daño neuronal mediante la liberación de mediadores inflamatorios. Los agregados A β estimulan TLRs y el inflamasoma NRLP3⁽¹⁵⁾, lo que tiene como consecuencia la producción de TNF- α , IL-1 β y otras citoquinas proinflamatorias. Estas citoquinas agravan a su vez la patología, ya que se ha demostrado que la inhibición de su producción retrasa la deposición de A β y la

aparición de déficits cognitivos en modelos de amiloidosis⁽¹⁶⁾. Por tanto, esto apoya la hipótesis de que la microglía contribuye a la patogénesis de la enfermedad.

Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que la microglía posee también un papel protector en la enfermedad, ya que los alelos de riesgo para Alzheimer de genes expresados por la microglía son pérdida de función y los modelos animales indican que la pérdida de la actividad de la microglía aumenta la patología local y la progresión de la patología⁽¹⁷⁾.

2.4. Patogénesis

A pesar de que las principales características neuropatológicas de la EA fueron descritas hace décadas, aún se desconoce el mecanismo por el cual se produce el deterioro sináptico y cognitivo, lo que lleva al planteamiento de varias hipótesis que tratan de explicar el procedimiento mediante el cual se origina esta patología.

La primera hipótesis que se barajó fue la hipótesis de la cascada amiloide. Propuesta en 1992 por Hardy y Higgins, esta explicación se centra en la formación de las placas $A\beta$ y en su posible papel en la neurodegeneración. En concreto, establece que los depósitos de $A\beta_{42}$ son los causantes de la patología de la EA y que los ovillos neurofibrilares, la pérdida celular, el daño vascular y la demencia son consecuencias de la formación de dichos depósitos⁽⁸⁾.

El hecho de que las placas estén compuestas esencialmente por $A\beta$ y la presencia de mutaciones que aumentan la agregación del péptido en personas con EA familiar, parecen indicar que $A\beta$ es el causante de la EA⁽¹⁴⁾. Además diversos estudios sugieren que los oligómeros solubles de $A\beta$ podrían ser responsables de la disfunción sináptica en el cerebro de pacientes con EA y en los modelos animales⁽¹⁸⁾. Estos factores constituyen las bases fundamentales de la hipótesis amiloide.

Sin embargo, esta hipótesis ha perdido peso con el paso de los años, debido sobre todo a los continuos fracasos de los ensayos clínicos que tomaban como punto de partida dicha hipótesis. Algunos científicos defienden que ninguno de estos ensayos ha tenido éxito porque los fármacos se han administrado demasiado tarde como para revertir el daño cerebral de los participantes, ya que las placas comienzan a formarse años antes de que los pacientes desarrollen síntomas. Actualmente se están realizando ensayos clínicos en individuos que tienen riesgo que desarrollar la EA pero aún no experimentan

síntomas⁽¹⁴⁾, y sus resultados podrían resolver las dudas planteadas sobre la hipótesis amiloide.

Otra de las principales críticas a dicha hipótesis es el hecho de que el número de depósitos A β en el cerebro no correlaciona con el grado de disfunción cognitiva del paciente. De hecho, algunos individuos sanos poseen placas A β ⁽¹⁸⁾, y el deterioro neuronal y la progresión de los síntomas de la EA es contraria a la formación de placas A β . Sin embargo, parece ser que la concentración de A β soluble sí correlaciona con la disfunción cognitiva⁽¹⁸⁾.

El conjunto de contradicciones e incógnitas que rodean la hipótesis A β después de muchos años de investigación ha llevado a que numerosos estudios se centren en otros aspectos interesantes de la EA, tales como el papel de la microglía o el componente vascular.

2.5. Hipótesis vascular

Tradicionalmente la investigación en la EA se ha centrado en la disfunción neuronal y glial. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que los factores vasculares son importantes en la patogénesis de la enfermedad.

2.5.1. Patología vascular

Recientes estudios epidemiológicos, clínicos, patológicos y experimentales indican que la EA se asocia a disfunción neurovascular temprana, la cual contribuye a la patogénesis de la enfermedad⁽¹⁹⁾. Se ha encontrado relación entre dicha disfunción vascular y diferentes parámetros relacionados con la EA, entre los que se encuentran: citotoxicidad por A β , déficits en la eliminación de A β , debilidad de la barrera hematoencefálica y alteración del reclutamiento de células inmunes.

2.5.2. Papel de la angiogénesis en la EA

A pesar de que en la EA se produce un descenso de la densidad vascular en la corteza, el hipocampo y el prosencéfalo, hay evidencias que indican que existe un aumento de la angiogénesis. Estos hallazgos aparentemente contradictorios sugieren el desarrollo de un proceso de remodelación que tiene lugar en la red vascular del cerebro en la EA. Además, en modelos de EA se ha descrito una ausencia de perfusión en zonas adyacentes a las placas, así como la presencia de una red vascular más densa en un anillo más alejado alrededor de las placas⁽²⁰⁾. Todo ello sugiere una asociación entre los depósitos de A β y la alteración de los vasos sanguíneos. De hecho, tanto en modelos murinos de EA como en pacientes se han encontrado vasos aberrantes que se

caracterizan por poseer células y ramificaciones con una morfología anormal⁽²¹⁾. Se ha hipotetizado sobre la posibilidad de que dichos vasos sean consecuencia de un proceso de angiogénesis aberrante⁽²²⁾.

Debido a que se ha planteado la posibilidad de que las alteraciones estructurales de los vasos en la EA se deban a alteraciones en el proceso de angiogénesis, es importante el estudio del mismo. La angiogénesis es un proceso fisiológico que tiene lugar cuando es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos para asegurar el abastecimiento de los tejidos en términos de nutrientes y oxígeno (O₂). La angiogénesis se produce como respuesta a situaciones de hipoxia e inflamación y comienza mediante la liberación del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Cuando los niveles de O₂ disminuyen se estabiliza HIF (factor inducible por hipoxia), lo cual desencadena la liberación de VEGF y la unión a su receptor, VEGFR, localizado en las células endoteliales⁽²³⁾.

En el proceso de angiogénesis las células endoteliales sufren una transformación, de manera que pueden dar lugar a células tip, responsables de guiar la formación del nuevo vaso; células stalk, causantes de la elongación del mismo; y células phalanx, que mantienen la quiescencia y perfusión de los nuevos vasos⁽²³⁾. Por tanto, en función de las señales que reciban las células endoteliales, se transformarán en un tipo celular u otro. En concreto, la interacción entre VEGF y su receptor induce la expresión de genes propios de células tip. Estas células se caracterizan por la proyección de filopodios y por la expresión de Dll4, ligando de Notch.

Por otro lado, las células stalk no proyectan filopodios y son proliferativas, de manera que forman el lumen y permiten la elongación del vaso. La señalización entre las células tip y las células endoteliales adyacentes es la responsable de la diferenciación de estas últimas a células stalk. La unión de Dll4, localizado en las células tip, y Notch, expresado en las células endoteliales adyacentes, induce la proteólisis de un dominio de Notch, lo que lleva a la liberación de dicho dominio al interior de la célula⁽²⁴⁾. Como consecuencia, se promueve la diferenciación de las células endoteliales adyacentes a células stalk y se inhibe la expresión de genes propios de células tip y la proyección de filopodios. Este proceso se denomina inhibición lateral y es esencial para la correcta formación del nuevo vaso, ya que, si todas las células endoteliales se diferenciaron a células tip, la construcción del vaso fracasaría.

Se ha especulado sobre la posibilidad de que el origen de las alteraciones estructurales que se observan en la EA sea una angiogénesis aberrante. Nuestro laboratorio plantea que una posible causa de la alteración de la angiogénesis sea la modificación de la

actividad de la γ -secretasa, debido a que esta enzima lleva a cabo la proteólisis de Notch⁽²⁵⁾ y está implicada en la producción de A β . Por tanto, la alteración de la actividad de dicha enzima podría tener repercusión sobre la proteólisis de Notch, lo cual impediría que se produjera la inhibición lateral.

En ausencia de inhibición lateral las células adyacentes a la célula tip original darían lugar a más células tip, de forma que no se podría producir la correcta construcción del vaso. En definitiva, se produciría una angiogénesis no productiva.

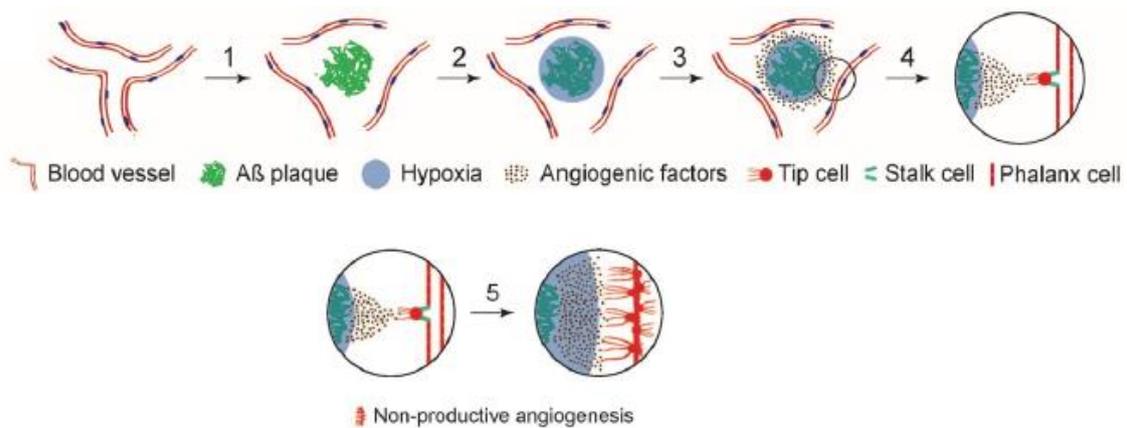


Figura 1. Angiogénesis. Arriba: proceso normal de inducción de la angiogénesis. Abajo: mecanismo de angiogénesis no productiva. En ausencia de inhibición lateral, las células endoteliales se diferencian a células tip, lo cual imposibilita la correcta formación del vaso. Extraído de Rosales-Nieves *et. al*⁽²⁶⁾.

Debido a que alrededor de las placas A β se observan alteraciones estructurales de los vasos, se plantea que el entorno hipóxico de la placa sea el promotor de la angiogénesis. De esta forma, las condiciones de hipoxia de la placa inducirían la liberación de HIF, lo cual iniciaría el proceso de angiogénesis, pero en ausencia de inhibición lateral, se produciría una angiogénesis no productiva que daría lugar a la alteración de los vasos sanguíneos. Dichas alteraciones localizadas alrededor de las placas A β se denominan anomalías vasculares (AVs)⁽²⁶⁾.

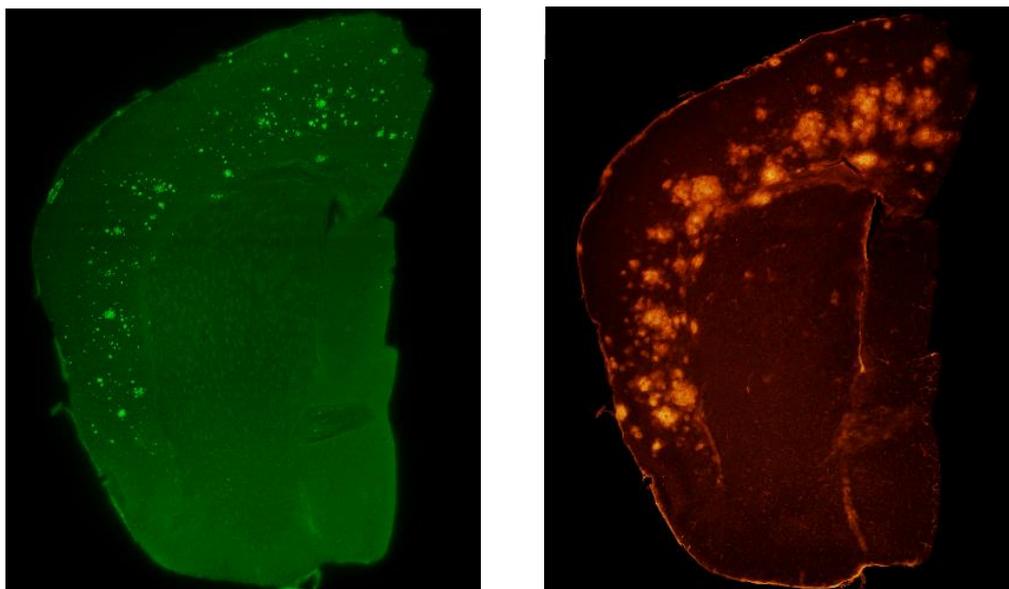


Figura 2. *Izquierda:* placas A β marcadas con tioflavina. *Derecha:* anomalías vasculares marcadas con IB4⁽²⁶⁾.

Se ha encontrado una relación entre las placas A β , las AVs y la microglía, ya que parece ser que las alteraciones vasculares inducen la fagocitosis de las células endoteliales por parte de la microglía⁽²⁶⁾, lo cual contribuye a la extensión del daño celular local. Además, la presencia de AVs afecta a la eliminación de A β , ya que altera la barrera hematoencefálica, implicada en la degradación de A β . Por tanto, la alteración estructural de los vasos facilita la acumulación de A β .

2.5.3. Estudio farmacológico

Con el objetivo de estudiar la angiogénesis no productiva y su relación con la patogénesis de la EA, se plantea utilizar fármacos inhibidores de la angiogénesis en modelos de EA. En concreto, en este estudio se emplea Sorafenib, un inhibidor de receptores tirosina quinasas. Es el fármaco escogido para este proceso experimental debido a que posee un amplio espectro, por lo que es capaz de inhibir varias moléculas implicadas en la angiogénesis, como VEGFR y los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)⁽²⁷⁾.

En ensayos previos se ha observado una disminución en la carga de A β en modelos de EA tratados con Sorafenib, lo cual sugiere que al inhibir la angiogénesis no productiva se consigue un aumento de la eliminación del péptido causado por la normalización de la vasculatura.

3. Objetivos

En el presente trabajo se establecen dos objetivos principales. En primer lugar, se plantea la evaluación del efecto de un tratamiento de un mes con Sorafenib en modelos *APP₇₅₁-SL/+*. En concreto, se estudiará el efecto de dicho fármaco en las AVs y las placas A β .

Para ello se realizarán ensayos inmunohistoquímicos con distintos marcadores con el fin de llevar a cabo una cuantificación de las placas A β y las AVs. Este procedimiento permitirá establecer si existen diferencias entre las placas A β y las AVs de animales sometidos al tratamiento farmacológico y los animales control.

El segundo objetivo consiste en realizar una revisión bibliográfica de fármacos moduladores de la angiogénesis que podrían ser candidatos para regular la angiogénesis no productiva en EA, de manera que se podrían valorar como alternativas terapéuticas en un futuro. Para ello se llevará a cabo un estudio bibliográfico empleando la base de datos PubMed para la búsqueda de información.

4. Materiales y métodos

4.1. Modelos animales

La manipulación de los animales de experimentación se rigió según el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

Se emplearon ratones *APP₇₅₁-SL/+*, un modelo de EA en el cual la progresión de la enfermedad es muy rápida. Se escogió este modelo principalmente porque no posee mutaciones en *PSEN*, ya que se pretenden estudiar procesos en los que está implicado Notch, uno de los sustratos de la γ -secretasa.

Inicialmente en el estudio se iban a emplear doce ratones, pero dos murieron en el procedimiento: uno antes de llegar al centro de investigación y otro durante el tratamiento. Por tanto, el ensayo se llevó a cabo en diez ratones que se dividieron en dos grupos, control y tratamiento con Sorafenib, cada uno compuesto por tres machos y dos hembras. Todos los ratones tenían siete meses de edad al inicio del tratamiento.

4.2. Tratamiento farmacológico

Los ratones se trataron con S-8502 Sorafenib ('p-Toluenesulfato Salt') de LC Laboratories. Al grupo control se le administró DMSO, vehículo del tratamiento. Durante cuatro semanas se les administró vía intraperitoneal una dosis de 30 mg/kg de tratamiento o vehículo tres días a la semana (lunes, miércoles y viernes).

4.3. Inmunohistoquímica

Para la realización del ensayo de inmunohistoquímico se siguió protocolo Wälchli modificado⁽²⁸⁾, que será explicado a continuación.

En primer lugar, se le inyecta al animal una dosis de 0,5 g/ml de tiobarbital. El tiobarbital es un anestésico que se utiliza en tales cantidades para producir una sobredosis que lleve a la muerte del animal. A continuación, es necesario perfundir el ratón, de forma que la sangre de los vasos sea sustituida por PBS.

El siguiente paso consiste en la extracción del cerebro del ratón. En este caso el cerebro se dividirá en dos, ya que el hemisferio izquierdo se empleará para el estudio inmunohistoquímico, mientras que el hemisferio derecho se diseccionará (separando corteza, hipocampo y estriado) para posteriormente llevar a cabo un análisis bioquímico.

Los cerebros se sumergen en la solución de fijación, la cual se obtiene a partir de paraformaldehído (PFA) y glutaraldehído (GA): 4% PFA + 0.05 % GA, p/v. Los cerebros permanecen en la solución de fijación y a 4°C hasta el día siguiente. Posteriormente se pasan a una solución hipertónica de sacarosa (30% p/v) que permite la salida de agua del tejido. Los cerebros se mantienen a 4°C hasta que floten en la solución de sacarosa, aproximadamente 36 horas después.

El siguiente paso consiste en la criopreservación de los cerebros, los cuales se congelan empleando OCT y pastillas de CO₂. Una vez que los cerebros estén congelados, se procede a cortarlos con el criostato, realizando cortes coronales de 40 µm. En este caso se toman nueve rodajas de cada cerebro.

A continuación, las rodajas se someten al siguiente tratamiento:

1. Sumergir 10 minutos en solución de fijación (PFA + GA al 4%).
2. Incubar en NH₄Cl 50 mM durante 30 minutos en agitación leve.
3. Incubar en solución de glicina 50 mM durante 5 minutos en agitación a 80 °C.
4. Calentar 1,5 min en el microondas a 600 W en el buffer de contención (CaCl₂).

5. Sumergir en solución de permeabilización durante 10 minutos. La solución de permeabilización contiene 0.3% (v/v) Tritón X-100 en 0,1 M TBS (pH 8,0)
6. Preparar la solución de bloqueo, compuesta por suero de cabra, Tritón y buffer CaCl₂.
7. Diluir los anticuerpos en la solución de bloqueo.
8. Incubar las rodajas en las soluciones con los anticuerpos a 4°C en agitación durante 72h.

Se realizan tres ensayos inmunohistoquímicos en cada cerebro. En la primera tinción se utiliza tioflavina-S para teñir las placas A β e IB4 para marcar las células endoteliales. La tioflavina es un compuesto que reacciona con la conformación de la lámina β , lo que permite la visualización de las placas A β . El IB4 es una lectina biotinada que se une a los azúcares de la membrana del endotelio, de manera que marca tanto los vasos sanguíneos como las AVs. En la segunda tinción se emplea tioflavina para las placas e Iba1 para el marcaje de la microglía. En la tercera tinción se utilizan IB4 e Iba1. En los tres casos los núcleos se tiñen con DAPI, de forma que los ensayos son los siguientes:

1. IB4, tioflavina, DAPI: observación AVs y placas A β .
2. Iba1, tioflavina, DAPI: observación de microglía y placas A β .
3. IB4, Iba1, DAPI: observación de AVs y microglía.

Tras 72 h de incubación en los anticuerpos primarios, se procede a añadir el anticuerpo secundario. Para ello, antes es necesario realizar previamente tres lavados en PBS 1X. Posteriormente se preparan las soluciones de cada uno de los anticuerpos en la solución de bloqueo.

Para el marcaje de las células endoteliales se utiliza streptavidina-cy3, una proteína que tiene capacidad de unirse a la biotina del IB4. Para Iba1 se utiliza un anticuerpo anti-conejo tipo IgG. Se dejan incubar las rodajas en las soluciones de los anticuerpos a 4°C en agitación durante 24 h.

El último día del protocolo se realizan las tinciones con tioflavina y DAPI y se montan las muestras en los portaobjetos para su posterior visualización al microscopio. Para la tinción con tioflavina se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Lavar dos veces con PBS 1X en agitación durante 10 minutos.
2. Incubar 8 minutos en tioflavina.
3. Realizar tres lavados de 30 segundos en etanol.
4. Realizar tres lavados de 30 segundos en agua.

5. Sumergir en PBS durante 15 minutos.

A continuación, las muestras se incuban en DAPI durante 15 minutos. Por último, las muestras se lavan en PBS durante 15 minutos y se procede al montaje de las mismas.

4.4. Microscopía

Una vez realizadas las inmunohistoquímicas, se procede a la toma de imágenes. Para ello se utilizó el microscopio directo Olympus BX61 con el objetivo 4x. Únicamente se tomaron imágenes de las rodajas marcadas con tioflavina e IB4, ya que en el presente estudio tiene como objetivo estudiar el efecto de Sorafenib sobre las placas A β y las AVs. El tiempo de exposición se mantuvo similar en todas las imágenes de las placas A β y de las AVs con el objetivo de reducir la variabilidad experimental.

4.5. Cuantificación

La cuantificación se llevó a cabo con FIJI/ImageJ^(29,30). Los pasos a seguir en dicho proceso son los siguientes:

1. Convertir la imagen a 8-bit
2. Definir la región correspondiente a la corteza estableciendo el ROI correspondiente a dicha región
3. Invertir la imagen
4. Establecer un umbral adecuado. En este caso se emplea el umbral automático para evitar variaciones entre el tratamiento de las diferentes imágenes.
5. Fijar una escala, para lo que es necesario tener en cuenta tanto el objetivo con el que se han tomado las fotos (4x) como las dimensiones de la imagen (1360x1024). En este caso la escala establecida es de 0,3096 pixel/ μ m.
6. Realizar la cuantificación. Los parámetros obtenidos en este procedimiento son: número de partículas, área total ocupada por dichas partículas, tamaño medio de partícula y porcentaje del área que ocupan las partículas con respecto al área total definida (área del ROI).

En este estudio se emplearon diez ratones, de los cuales cinco pertenecen al grupo control y cinco al grupo tratado con Sorafenib. De cada ratón se extrajeron tres rodajas para el ensayo inmunohistoquímico y la posterior cuantificación de las placas A β y las AVs. Por tanto, en total se analizaron 60 imágenes, 30 para el estudio de las placas A β y 30 para el estudio de las AVs.

Con el fin de automatizar los pasos de la cuantificación de imágenes se elaboró una macro en FIJI que permitió agilizar el proceso. De esta forma, la cuantificación se llevó

a cabo de forma semiautomática, siendo la definición de la corteza el único paso que se realizó manualmente.

4.6. Análisis estadístico

Se empleó el programa R para el análisis estadístico y la elaboración de figuras. En primer lugar, se calculó la media de los datos de cada cerebro, ya que de cada uno se obtuvieron tres imágenes. De esta forma, la muestra quedó reducida a cinco datos para cada grupo. Debido a que se trata de un número pequeño, se asumió que la distribución de los datos era normal y se procedió a la realización del test paramétrico t de Student. Puesto que los datos sobre los que se aplicó esta prueba se correspondían con medias de los datos originales, se empleó la desviación de la media para representar la variabilidad de los datos. Además, previamente se realizó el test de la varianza para determinar si las varianzas eran similares en ambos grupos y poder ajustar el test de t de Student.

5. Resultados

5.1. Efecto del tratamiento con Sorafenib en modelos de EA

Para el análisis de las placas A β y las AVs se tuvieron en cuenta dos parámetros: el tamaño medio y la carga.

Debido a que en estudios previos se observó que los ratones macho tenían una mejor respuesta al tratamiento con Sorafenib, se han analizado también los datos previa división por sexos, con el fin de desglosar y comprender mejor los resultados de este ensayo.

5.1.1. Tamaño medio de placa A β y anomalía vascular

El tamaño medio de placa o anomalía se obtiene dividiendo el área total que ocupan entre el número de partículas. Los resultados obtenidos muestran que las diferencias entre el tamaño medio de las placas del grupo control y del grupo tratado con Sorafenib no son significativas ($p = 0,3673$), si bien existe una pequeña disminución en el tamaño medio de las placas de los animales expuestos al tratamiento. Igualmente, tampoco se encontraron diferencias significativas en el tamaño medio de las anomalías vasculares ($p = 0,8789$), cuyos valores fueron muy similares en ambos grupos.

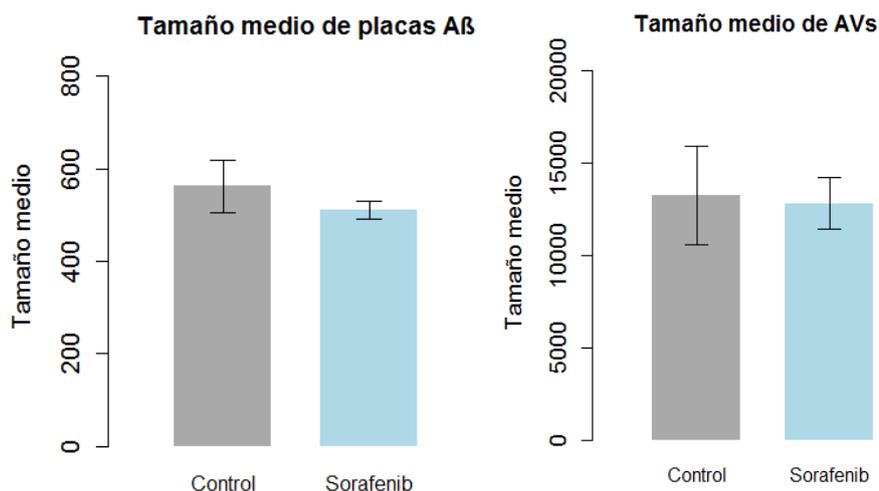


Figura 3. *Izquierda:* tamaño medio de placa Aβ en la corteza cerebral. *Derecha:* tamaño medio de AV en la corteza cerebral.

Al dividir los datos por sexo, en los machos se observa una tendencia de bajada en el tamaño medio de las placas Aβ y de las AVs. A pesar de ello, los resultados obtenidos tampoco fueron significativos ($p = 0.1788$ y $p = 0.5207$ respectivamente). En las hembras el tamaño medio de placa y AV fue superior en el grupo tratado con Sorafenib. Estas diferencias no fueron significativas ($p = 0.573$ y $p = 0.3453$ respectivamente).

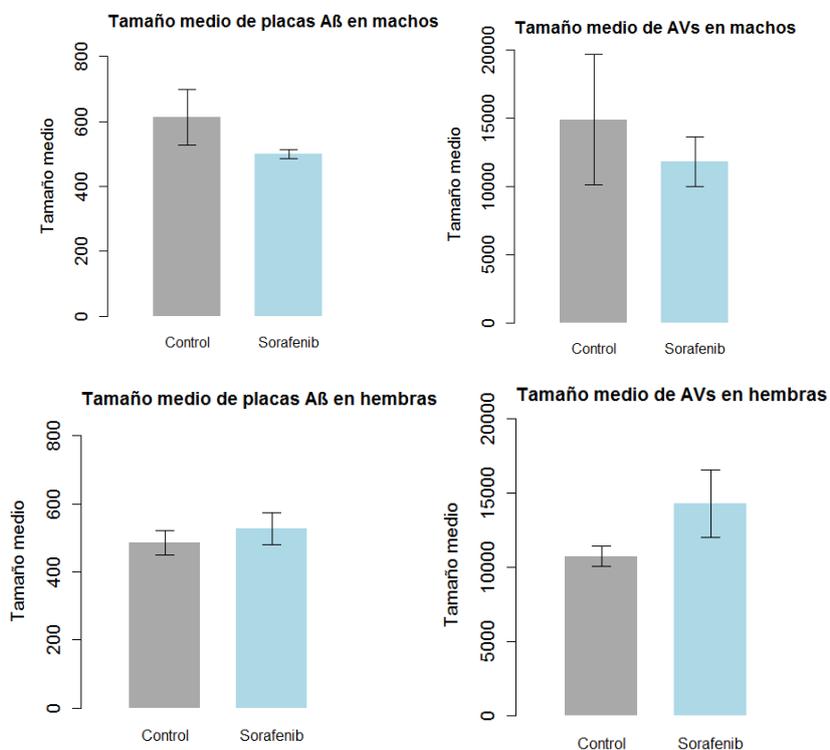


Figura 4. *Arriba:* tamaño medio de las placas Aβ y de las AVs en machos. *Abajo:* tamaño medio de las placas Aβ y las AVs en hembras.

5.1.2. Carga de placa A β y anomalía vascular

La carga de placa o anomalía se corresponde con el porcentaje del área que ocupan las partículas con respecto al área total de la corteza. No se encontraron diferencias significativas entre la carga de placas A β de ambos grupos ($p = 0,7998$). En relación a las AVs, se observa un aumento de la carga de Sorafenib contrario al esperado. No obstante, estas diferencias tampoco resultaron significativas ($p = 0,5677$).

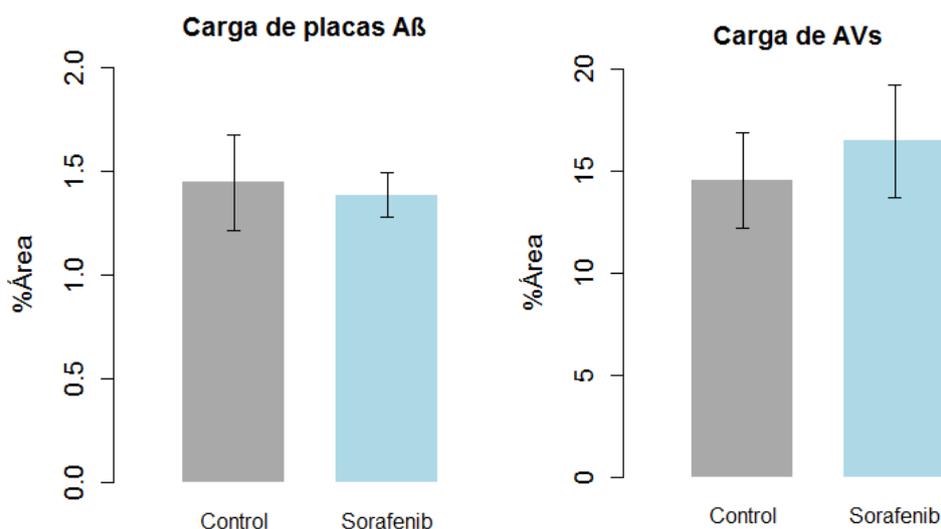


Figura 5. Arriba: carga de placas A β en la corteza cerebral. Abajo: carga de AVs en la corteza cerebral.

Al diferenciar los grupos por sexo se obtiene una tendencia similar a la del tamaño medio, de manera que en los machos se aprecia una disminución de la carga de placas y AVs en los ratones tratados, mientras que en las hembras la carga de placas y AVs es superior en el caso del grupo expuesto al fármaco. En ningún caso las diferencias fueron significativas ($p = 0.6583$ y $p = 0.1835$ en machos y $p = 0.4144$ y $p = 0.3642$ en hembras respectivamente).

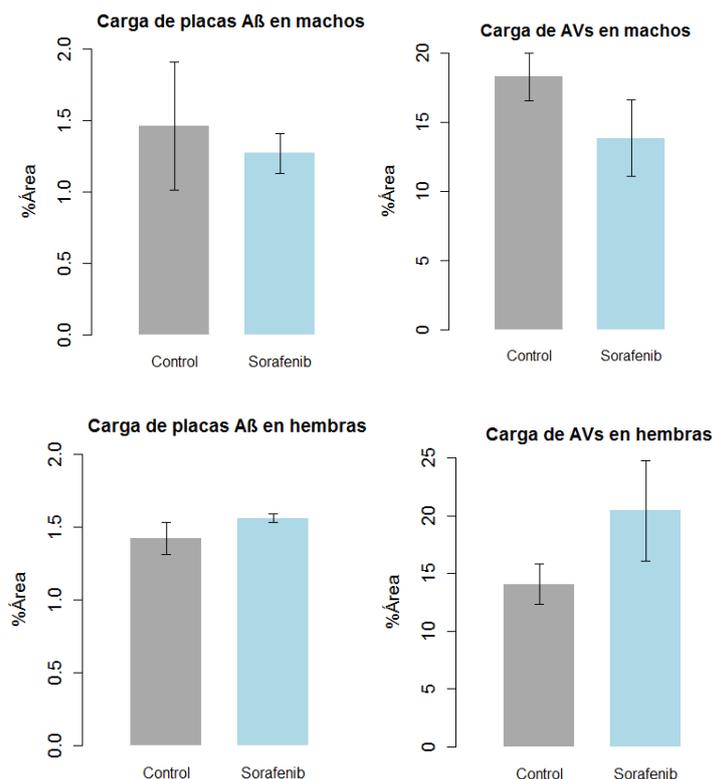


Figura 6. Arriba: carga de placas A β y las AVs machos. Abajo: carga de placas A β y las AVs en hembras.

5.2. Fármacos moduladores de la angiogénesis

Hoy en día no existe ningún tratamiento efectivo frente a la EA. Los fármacos de elección (inhibidores de la acetilcolinesterasa y antagonistas NMDA) solo son capaces de mejorar ligeramente la sintomatología o retrasar levemente la progresión de la enfermedad, pero no logran frenar dicha progresión o revertir el daño generado. Por tanto, encontrar alternativas terapéuticas eficaces constituye un punto crucial en la investigación de la EA.

El objetivo del tratamiento con Sorafenib en este estudio es desarrollar una prueba de concepto que permita esclarecer el papel de la angiogénesis no productiva en la EA. Por tanto, este ensayo en concreto no se realiza desde una perspectiva terapéutica. A pesar de que en este caso no se han obtenido resultados significativos, diversos estudios han demostrado que la inhibición de la angiogénesis se asocia a una mejora en la EA. Por ello, el segundo objetivo principal del presente trabajo consiste en realizar una revisión de fármacos moduladores de la angiogénesis que podrían considerarse en un futuro como tratamiento frente a la EA.

5.2.1. Inhibidores de la vía de señalización de VEGF

Los receptores VEGFR forman parte de la familia de receptores tirosina quinasa (RTKs), la cual agrupa diversas subfamilias de receptores caracterizados por poseer un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular quinasa seguido por una región C-terminal⁽³¹⁾.

Los receptores de VEGF son reguladores claves de la angiogénesis en el adulto. En mamíferos se han identificado tres tipos de receptores de este tipo: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, que a su vez presentan diversas afinidades por sus ligandos (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF). De ellos, VEGF-A destaca por su papel clave en la regulación de la angiogénesis. Este ligando tiene un alta afinidad tanto por VEGFR1 como por VEGFR2, pero la gran mayoría de sus acciones son mediadas a través del segundo⁽³²⁾.

Por tanto, VEGFR2 es esencial en la angiogénesis. Tal como se ha expuesto al inicio del trabajo, en la cascada de señalización de este receptor está implicada la unión Dll4-Notch⁽³³⁾. Esta unión se ve afectada por la actividad de la γ -secretasa, ya que es la enzima responsable de la proteólisis de Notch. VEGFR2 también se considera un receptor clave en la angiogénesis patológica y está implicado en alteraciones vasculares propias de tumores, motivo por el cual se emplea como diana en terapia proangiogénica y antiangiogénica⁽³⁴⁾.

En situaciones de hipoxia se estabiliza el factor inducible por hipoxia (HIF), el cual promueve la transcripción de los elementos de respuesta a hipoxia, entre los que se encuentra VEGF-A. Existen diversas células capaces de liberar este factor, el cual actúa de forma paracrina estimulando a VEGFR2, receptor expresado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos⁽³⁵⁾.

Por tanto, la interacción entre VEGFR2 y VEGF-A es esencial para que se desarrolle la angiogénesis correctamente, lo cual convierte a este receptor en una diana clave cuando se pretende inhibir dicho proceso. Dentro de los fármacos inhibidores de esta vía de señalización se diferencian dos grandes grupos: anticuerpos monoclonales e inhibidores de RTKs.

- Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son moléculas de gran tamaño que no tienen capacidad para atravesar la membrana plasmática. Se administran vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, puesto que su absorción vía oral es mínima. Existen anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas implicadas en la vía de señalización de VEGF, los cuales se emplean como inhibidores de la angiogénesis en terapia antitumoral. Algunos de los anticuerpos monoclonales de este tipo son Bevacizumab y Ramucirumab.

Bevacizumab es un anticuerpo IgG recombinante humanizado que se une con alta afinidad a VEGF-A, impidiendo su interacción con los receptores VEGFR. Fue el primer fármaco inhibidor de la angiogénesis aprobado por la FDA⁽³⁶⁾.

Ramucirumab es anticuerpo monoclonal tipo IgG1 completamente humano. Su diana es VEGFR2, en concreto el dominio extracelular del mismo, de manera que impide la unión de los ligandos (VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D) a dicho receptor⁽³⁷⁾.

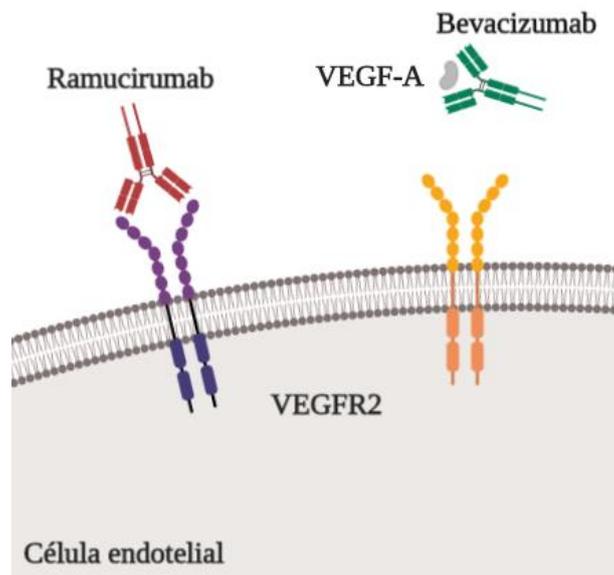


Figura 7. Mecanismo de acción de Ramucirumab y Bevacizumab. Ramucirumab bloquea VEGFR2 uniéndose a su dominio extracelular. Bevacizumab se une a VEGF-A, imposibilitando la unión del ligando con sus receptores.

- Inhibidores de receptores tirosina quinasa

Los inhibidores de RTKs son moléculas pequeñas y lipófilas, capaces de atravesar la membrana plasmática. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la actividad

quinasa del receptor, impidiendo la unión del ATP a la región catalítica, localizada en el dominio quinasa intracelular⁽³³⁾. Al igual que los anticuerpos monoclonales, el uso de inhibidores de RTKs está aprobado para el tratamiento frente a distintos tipos de cáncer.

Estos fármacos poseen varias dianas, por lo que sus efectos son más amplios que los de los anticuerpos monoclonales. Otra característica que diferencia a ambos fármacos es que los inhibidores de RTKs se pueden administrar vía oral. Dentro de este conjunto de fármacos se encuentran axitinib, cabozantinib, pazopanib, sunitinib, sorafenib o vandetanib. Al igual que el ensayo realizado con Sorafenib en el presente trabajo, se han realizado varios estudios sobre el efecto de inhibidores de RTKs en modelos de EA.

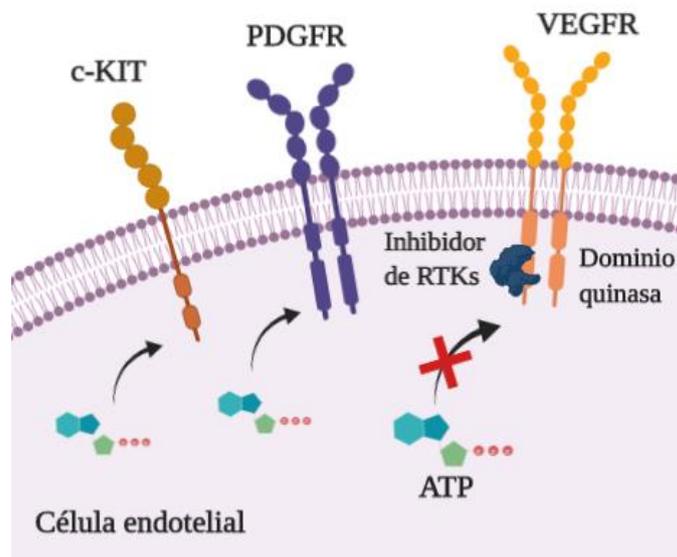


Figura 8. Mecanismo de acción de los inhibidores de RTKs. Se unen al dominio quinasa intracelular de los RTKs, impidiendo la unión de ATP.

Sunitinib es un fármaco derivado de la indolina cuyo uso como tratamiento frente al carcinoma de riñón y cáncer gastrointestinal fue aprobado en 2006. Esta molécula inhibe tanto los receptores de VEGF como los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor stem cell (c-KIT), el receptor Fms-like tirosina quinasa-3 (FLT3), el receptor del factor estimulante de colonias (CSF-1R) y el receptor del factor neurotrófico derivado de una línea de células gliales (RET)⁽³⁸⁾.

La exposición de dos modelos murinos distintos de EA a un tratamiento con Sunitinib concluyó que el fármaco tiene capacidad para reducir el daño vascular y la neuroinflamación. Se observó una disminución de los niveles del péptido A β en los

animales tratados con Sutinib, los cuales además obtuvieron mejores resultados en las pruebas de comportamiento, indicando una mejora de las funciones cognitivas con respecto al grupo control⁽³⁹⁾. Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una relación entre el péptido A β , la angiogénesis y la neuroinflamación.

Otro de los inhibidores multiquinasa estudiados en modelos de EA es pazopanib, cuyas dianas terapéuticas son VEGFR1-3, PDGFR y c-KIT. Este fármaco se emplea como tratamiento frente a cáncer renal y sarcoma. En un estudio llevado a cabo por Javidnia *et al.* se evaluó el efecto de dicho fármaco en dos modelos distintos de EA: 3x-A β PP y TauP301L.

En dicho estudio se observó una disminución de los niveles de tau hiperfosforilada en el modelo TauP301L y en los niveles de A β de los ratones 3x-A β PP. Además, las mediciones de marcadores de inflamación determinaron que dichas moléculas, generalmente sobreexpresadas en modelos de EA, recuperaban unos niveles normales en los ratones 3x-A β PP tratados con Pazopanib. Por el contrario, el fármaco no tuvo tal efecto en los modelos TauP301L, ya que en este caso los niveles de citoquinas proinflamatorias se mantuvieron elevados⁽⁴⁰⁾. Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una asociación entre las placas A β y la neuroinflamación causada por la activación de la microglía, mientras que los ovillos neurofibrilares no promueven dicha activación.

5.2.2. Talidomida e IMiDs

La talidomida es un fármaco con actividad inmunosupresora y antiangiogénica. El mecanismo de acción por el cual se consigue la regulación de la angiogénesis no está claro, pero se cree que está relacionado con una disminución en la liberación de VEGF y bFGF. Esto se debe a que diferentes ensayos han descrito una reducción de los niveles de estos factores proangiogénicos como consecuencia de la exposición a talidomida⁽⁴¹⁾.

Otro mecanismo mediante el cual la talidomida podría regular la angiogénesis sería a través de la inhibición de TNF- α , ya que esta citoquina aumenta la expresión de VEGFR⁽⁴²⁾ y de integrinas importantes en la migración y adhesión de células endoteliales⁽⁴³⁾. Además, TNF- α activa a la microglía y estimula la neuroinflamación por lo que, debido a la relación que existe entre la angiogénesis y la microglía, su inhibición podría ser de especial interés. La talidomida desestabiliza el ARNm que codifica para esta citoquina, de manera que disminuye su traducción⁽⁴⁴⁾.

Diversos estudios preclínicos han mostrado una disminución de la neuroinflamación y la amiloidogénesis acompañada de una mejora de las funciones cognitivas en modelos de EA tratados con talidomida^(40,41). El éxito de este fármaco en dichos estudios preclínicos llevó a la realización de ensayos clínicos en los que se pretendía evaluar el efecto de la talidomida en pacientes con EA moderada. Los resultados no fueron favorables, puesto que muchos pacientes abandonaron el ensayo debido a los numerosos efectos adversos del fármaco. Además, no se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con talidomida y el grupo control⁽⁴¹⁾.

Algunos autores han planteado emplear otro tipo de inhibidores de TNF- α , tales como los IMiDs (immunomodulatory imide drugs). Estos fármacos son análogos estructurales y funcionales de la talidomida que se emplean actualmente como tratamiento en diversos tipos de cáncer⁽⁴⁵⁾. Este grupo de fármaco mantiene las propiedades inmunomoduladoras y antiangiogénicas de la talidomida.

Al igual que en el caso de la talidomida, el mecanismo regulador de la angiogénesis de los IMiDs se desconoce, y también se cree que está relacionado con la inhibición de la liberación de VEGF y bFGF⁽⁴⁶⁾. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que se ha apreciado una disminución de los niveles de VEGF en animales tratados con IMiDs. Del mismo modo, se ha descrito que los IMiDs bloquean la migración y adhesión de células endoteliales en el proceso de angiogénesis, probablemente debido a la disminución del número de integrinas⁽⁴⁶⁾. En relación a la actividad inmunomoduladora de los IMiDs, es necesario destacar que se debe a la inhibición de la liberación de TNF- α y otras citoquinas proinflamatorias.

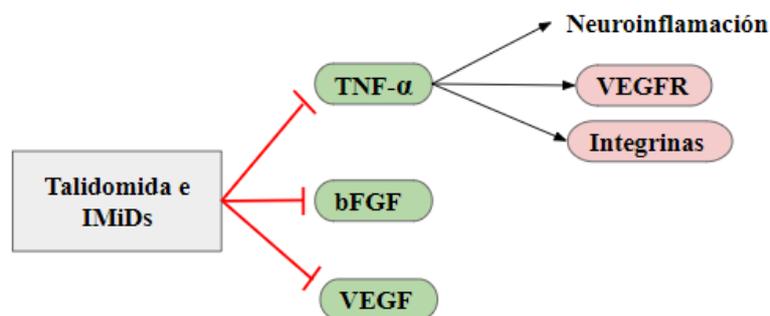


Figura 9. Esquema de las dianas de la talidomida y los IMiDs implicadas en el proceso de angiogénesis.

Dentro de los IMiDs se encuentra la lenalidomida. Esta molécula disminuye la expresión de varias citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6 e IL-8, y aumenta la expresión de IL-10, una citoquina antiinflamatoria. En consecuencia, el efecto global de la lenalidomida es la modulación de la respuesta inflamatoria⁽⁴⁵⁾.

En estudios preclínicos realizados en modelos de EA se ha observado una disminución de los niveles de TNF- α y carga de A β , así como una mejora en las funciones cognitivas en ratones tratados con lenalidomida. Estos buenos resultados han llevado al planteamiento de un ensayo clínico en fase II cuyo diseño consiste en la administración diaria de lenalidomida a pacientes de EA durante 12 meses⁽⁴⁷⁾.

5.2.3. Inhibidores de m-TOR

mTOR es una serina/treonina quinasa altamente conservada que se expresa en todas las células eucariotas. Esta molécula está implicada en varias vías de señalización, siendo una de ellas la ruta PI3K-AKT-mTOR⁽⁴⁸⁾. Entre los procesos celulares regulados parcialmente por esta ruta se encuentra angiogénesis. La relación entre esta vía y la angiogénesis viene dada por la implicación de mTOR en la regulación de los niveles de HIF-1 α , el principal precursor del proceso de formación de nuevos vasos⁽⁴⁹⁾.

Los mecanismos moleculares implicados en dicha regulación aún no están claros, ya que los estudios realizados en este ámbito han tenido resultados dispares. Se plantea la hipótesis de que mTOR aumente la transcripción y/o la traducción de HIF-1 α , así como su actividad transcripcional. Igualmente, varios estudios parecen indicar que mTOR contribuye a la estabilización de HIF-1 α , lo cual aumentaría su tiempo de acción^(49,50).

Independientemente del mecanismo mediante el cual mTOR aumente los niveles o la actividad de HIF-1 α , la consecuencia de ello es el incremento de los niveles de VEGF y por tanto, de la angiogénesis. En definitiva, a pesar de que los bajos niveles de oxígeno constituyen la señal clave para la activación de HIF-1 α , la amplitud de la respuesta al mismo va a depender, entre otras, de las vía PI3/AKT/mTOR⁽⁵¹⁾.

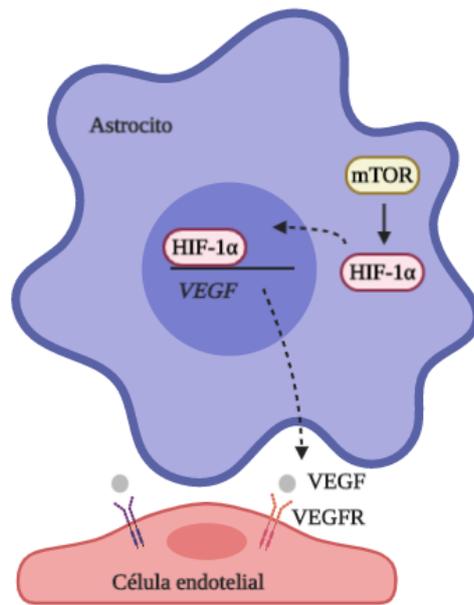


Figura 10. Esquema del papel de mTOR en la angiogénesis.

Por otro lado, es necesario señalar que la importancia de mTOR en la EA no reside únicamente en su relación con la angiogénesis. Como se ha mencionado previamente, mTOR es una proteína implicada en la regulación de diversos procesos celulares muy variados. Entre ellos se encuentra la autofagia, el principal mecanismo de degradación de proteínas y péptidos mal plegados⁽⁵²⁾. Concretamente, la estimulación de mTOR activa una cascada de señalización que bloquea el proceso de autofagia. Por tanto, la inhibición de mTOR se traduciría en una estimulación de la autofagia, lo cual supondría una disminución de placas A β y ovillos neurofibrilares⁽⁵³⁾.

Existen evidencias que apuntan a una sobreactivación de mTOR en la EA. Entre los datos que apoyan esta hipótesis cabe destacar la observación de una asociación entre los ovillos neurofibrilares y los niveles de S6K fosforilado (intermediario en la vía de mTOR) en pacientes con EA⁽⁵⁴⁾. También se ha descrito que existe una correlación entre el grado de autofosforilación de mTOR y la presencia de tau fosforilada⁽⁵⁵⁾ que parece indicar que esta vía se encuentra sobreactivada en aquellas neuronas que presentan ovillos neurofibrilares. Además, diversos autores han observado que la inhibición de la vía de señalización PI3/AKT/mTOR tiene como consecuencia una mejora tanto en los marcadores patológicos como en el comportamiento de modelos animales con EA⁽⁵⁶⁾. Por tanto, existen suficientes evidencias que apuntan a que la inhibición de mTOR puede mejorar la patología y los síntomas de EA.

El inhibidor de mTOR más conocido es la rapamicina o sirólimus, un inmunosupresor empleado para evitar el rechazo en trasplantes de riñón⁽⁵⁷⁾. Debido a que mTOR interviene en numerosas rutas de señalización, la rapamicina tiene diversos efectos sobre las células. En relación al tema que nos concierne, es interesante su efecto como inhibidor de la angiogénesis mediante la disminución de los niveles de VEGF⁽⁵⁸⁾ y como promotor de la autofagia. En ensayos con modelos de EA tratados con rapamicina se ha descrito una reducción de acúmulos de A β y tau fosforilada acompañada de una normalización de circulación cerebral y una mejora en las funciones cognitivas⁽⁵⁹⁾.

Por otro lado, existen derivados de la rapamicina que poseen un mecanismo de acción similar a dicho fármaco y ya han sido probados en modelos de EA. Entre ellos se encuentra everolimus, empleado en el tratamiento frente a diferentes tumores y en la prevención de rechazos en trasplantes de órganos. La principal diferencia entre ambos fármacos radica en la especificidad de everolimus por mTORC1, ya que sirolimus inhibe tanto mTORC1 como mTORC2⁽¹³⁾.

En relación a la EA, el grupo de investigación de Cassano *et al.* llevó a cabo un estudio en el que se administró everolimus a modelos de EA durante cuatro semanas. Los autores llevaron a cabo análisis bioquímicos, inmunohistoquímicos y de comportamiento en los que demostraron que el tratamiento supuso una mejora en la memoria a corto y largo plazo, además de una disminución de los niveles de A β ⁽¹³⁾.

6. Discusión

La patogénesis de la EA es un proceso complejo y multifactorial en que el que intervienen diversas células y vías moleculares. En los últimos años se ha realizado una investigación exhaustiva con el objetivo de determinar el papel que juegan algunos componentes como el sistema vascular o la neuroinflamación en la EA. Debido a que la relevancia de tales factores en la patogénesis de la EA ha sido más que demostrada, se ha abierto la posibilidad de buscar nuevas dianas terapéuticas relacionadas con estos procesos celulares.

Actualmente los fármacos moduladores de la angiogénesis se están empleando en estudios preclínicos con el fin de esclarecer el papel de este proceso en la EA. Como se ha expuesto en el presente trabajo, en la EA se produce una angiogénesis no productiva que lleva a la formación de anomalías vasculares. Dichas anomalías se asocian a la activación de la microglía, lo cual tiene un efecto de pérdida local de vasos que agrava

la patología. Por tanto, se interpreta que la inducción de la angiogénesis tiene un efecto perjudicial en la EA.

Los estudios preclínicos realizados en modelos de EA expuestos a fármacos inhibidores de la angiogénesis apoyan las ideas expuestas. Dado que la búsqueda de un fármaco efectivo para el tratamiento de la EA continúa siendo un gran reto para la investigación en este campo, es importante considerar las alternativas propuestas relacionadas con la regulación de la angiogénesis y la correcta vascularización del tejido.

Este tipo de planteamientos farmacológicos presenta algunos riesgos a tener en cuenta. En general, la alteración de la vasculatura del cerebro de individuos de elevada edad, como son comúnmente los pacientes de EA, supone un riesgo. De hecho, el tratamiento con inhibidores de la angiogénesis se asocia a riesgo cardiovascular, pudiendo llegar a causar hipertensión⁽²⁷⁾, trombocitopenia^(46,47) o alteración en la cicatrización de heridas⁽⁵⁹⁾. Por este motivo, se plantea que el fármaco ideal sería aquel que normalizara la vasculatura y se dirigiera frente a las anomalías vasculares pero no tuviera muchos efectos a nivel sistémico. La mayoría de los fármacos valorados en este trabajo normalizan la vasculatura, ya que este proceso se considera una consecuencia de la inhibición de la angiogénesis, pero también presentan múltiples efectos a nivel sistémico.

Uno de los fármacos que normalizan la vasculatura es Sorafenib, el fármaco elegido para el tratamiento experimental de este trabajo. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas entre el tamaño medio y la carga de las placas A β y las AVs del grupo control y el grupo tratado con Sorafenib

Estos datos no concuerdan con un ensayo previo realizado en el laboratorio en el que se llevó a cabo un procedimiento similar. En tal caso se obtuvieron diferencias significativas en relación a las placas A β , de forma que los animales tratados con Sorafenib presentaban un tamaño medio y una carga de placas inferior al grupo control. En el presente estudio se observa una tendencia de bajada en ambos parámetros, pero no es significativa. Respecto a las AVs, en el estudio previo se concluyó que las diferencias del tamaño medio y la carga entre ambos grupos no eran significativas, aunque se apreció una tendencia de bajada en el grupo expuesto al fármaco⁽²⁶⁾.

A pesar de que el diseño experimental de ambos estudios es el mismo, es posible que las discordancias entre los resultados se deban a variaciones en el proceso experimental, ya

que tanto la administración del fármaco y del vehículo como el posterior tratamiento de datos (ensayos inmunohistoquímicos y cuantificación) lo llevaron a cabo distintas personas. Igualmente, el microscopio en el que se tomaron las imágenes era de un modelo distinto (NewCast), lo cual supone una variación en la obtención de imágenes.

También es necesario mencionar que el pequeño tamaño de la muestra, de cinco ratones por grupo, no permite extraer conclusiones altamente fiables del estudio. En el caso de la división por sexos, los grupos estaban compuestos por solo dos o tres individuos.

Además, se aprecian resultados anormales en el caso de las hembras, ya que el grupo tratado mostró un incremento en el tamaño medio y la carga de placas A β y AVs. Esto se explica porque una de las dos hembras de este grupo presentó valores anormalmente altos en la cuantificación.

El reducido número de muestras, sumado a una elevada variabilidad interindividual entre las muestras, dificulta la extracción de conclusiones sólidas. Por tanto, sería necesario desarrollar un ensayo con un número más elevado de animales con el fin de reducir el impacto de la variabilidad y poder obtener conclusiones más fiables. Además, se podría comprobar el efecto del tratamiento en la inhibición de la angiogénesis mediante el estudio de marcadores de esta vía, como la integrina $\alpha 5\beta 3$, que se expresa en vasos que inician la angiogénesis para estabilizar el receptor de VEGF⁽⁶⁰⁾.

Igualmente, se plantea también la realización de otro tipo de ensayos para evaluar el efecto del tratamiento con Sorafenib en modelos de EA, tales como pruebas de comportamiento que permitan determinar si existen mejoras en las funciones cognitivas o análisis bioquímicos que permitan determinar si hay variaciones entre las proteínas expresadas en la corteza y el hipocampo de ambos grupos.

A pesar de que los resultados de este ensayo no han sido exitosos, existen evidencias de que los inhibidores de RTKs contribuyen a la modulación de procesos implicados en la patogénesis de la EA como la angiogénesis y la neuroinflamación. Aunque existe esta tendencia generalizada, los efectos descritos en los distintos estudios son variados. Esto se debe a que se han empleado distintos fármacos (sorafenib, sunitinib o pazopanib) y modelos de EA, además de que el diseño experimental varía entre los diferentes estudios.

Aún existen pocos estudios preclínicos en modelos de EA para poder determinar si alguno de estos fármacos reúne las características necesarias para plantearlo como alternativa terapéutica en la EA, por lo que es esencial continuar investigando.

Igualmente, aún no se han realizado estudios preclínicos con anticuerpos monoclonales inhibidores de la vía de señalización de VEGF en modelos de EA. El principal problema a la hora de valorar estos fármacos como posible tratamiento para una enfermedad que afecta al sistema nervioso central es que son moléculas grandes que poseen una mayor dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, una de las indicaciones de Bevacizumab es el tratamiento de glioblastomas, debido a que este fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica⁽⁶¹⁾. En el caso de Ramucirumab y los anticuerpos monoclonales frente a VEGFRs, la barrera hematoencefálica supone una gran limitación, ya que estos fármacos no podrían acceder a su diana. Otro factor a tener en cuenta de la terapia con anticuerpos monoclonales es que la vía de administración es parenteral, lo cual supone una desventaja con respecto a los demás tipos de moduladores de la angiogénesis, que se administran vía oral.

La baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica supone un obstáculo para más inhibidores de la angiogénesis, no solo para los anticuerpos monoclonales. En el caso de los inhibidores de mTOR, se ha observado una importante reducción en la dosis absorbida y en los efectos cuando se ha administrado vía parenteral, debido a que la barrera hematoencefálica dificulta la absorción del fármaco⁽¹³⁾. Sin embargo, debido a que mantienen cierta capacidad para cruzarla y a que la permeabilidad de la barrera aumenta en pacientes con EA, es posible que se encuentre una dosis tolerable y eficaz en la cual la barrera hematoencefálica no suponga una limitación.

Por el contrario, los inhibidores de los RTKs, la talidomida y los IMiDs atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, lo cual supone un punto a favor de estos fármacos frente a los mencionados anteriormente.

Por otra parte, un aspecto importante a considerar en la valoración de estas alternativas terapéuticas es el número y el tipo de dianas sobre las que se dirigen. Los anticuerpos monoclonales son moléculas muy específicas, lo cual permite un efecto más focalizado sobre la vía de señalización de VEGF. Por el contrario, los demás fármacos propuestos poseen múltiples dianas terapéuticas. Esto puede tener consecuencias beneficiosas, ya

que facilita la regulación de varios mecanismos implicados en la degeneración neuronal y el deterioro cognitivo.

Es la situación que se plantearía con los inhibidores de mTOR, los cuales promueven la autofagia a la par que inhiben la angiogénesis. Como se ha expuesto al inicio del trabajo, la angiogénesis no productiva induce la fagocitosis mediada por la microglía, de forma que en un tratamiento con estos fármacos se estaría promoviendo degradación de A β mediante la estimulación de la autofagia y se estaría reduciendo el daño celular al inhibir la angiogénesis.

Igualmente, los inmunomoduladores (talidomida y derivados) no solo regulan la neuroinflamación sino que también inhiben la angiogénesis. De esta forma, se previene el daño celular mediante el control de la microglía, reduciendo su activación mediante la modulación de la angiogénesis e inhibiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias.

No obstante, la diversidad de los efectos de estos fármacos también puede conllevar un mayor número de efectos secundarios que aquellos fármacos que sean más específicos. De hecho, tal y como se ha expuesto previamente, los numerosos efectos secundarios fueron el motivo que llevó al abandono de la mitad de los pacientes que participaron en un ensayo clínico de talidomida. Igualmente, los múltiples efectos adversos que presentan los inhibidores de mTOR es el argumento que mantienen algunos autores para justificar que aún no se haya realizado ningún ensayo clínico con estos fármacos en pacientes de EA, a pesar de que han mostrado resultados favorables en estudios preclínicos.

Por otro lado, deben tenerse en cuenta las diferencias que existen entre características de fármacos del mismo grupo. En relación a los inmunomoduladores, se conoce que la lenalidomida y los IMiDs en general presentan una mayor tolerabilidad que la talidomida, además de un potencial antiangiogénico e inmunomodulador es superior^(45,46), por lo que podrían suponer una alternativa más adecuada. Del mismo modo, aparte de los inhibidores de RTKs comentados en el presente trabajo, se podría valorar la posibilidad de realizar estudios en modelos de EA con otros fármacos de este tipo. Un fármaco que podría aportar resultados interesantes sería axitinib, ya que inhibe de forma específica los receptores VEGFR, por lo que aunque la amplitud de la respuesta fuera menor posiblemente disminuirían los efectos adversos.

Por último, mencionar que también sería interesante evaluar el efecto de estos fármacos en modelos o pacientes en los que la patología no esté muy avanzada, ya que se ha planteado que uno de los posibles motivos por los que aún no se ha encontrado ningún fármaco efectivo sea que la enfermedad está demasiado avanzada al inicio del tratamiento. Por ello, podría ser interesante evaluar el efecto de estos fármacos en modelos de EA jóvenes o pacientes en estadios tempranos, para estudiar si pueden tener un efecto protector.

Todos los fármacos propuestos son empleados en la actualidad, por lo que sus efectos, mecanismos de acción, características farmacodinámicas y posibles efectos adversos se conocen desde hace años. Sin embargo, es necesario continuar investigando con el fin de analizar en profundidad estos aspectos en relación a modelos y pacientes de EA.

7. Conclusiones

- No se han observado diferencias significativas en el tamaño medio y la carga de las placas A β y las AVs del grupo control y el grupo tratado con Sorafenib.
- Es necesario ampliar la muestra del ensayo con el objetivo de aumentar la fiabilidad del mismo y esclarecer los motivos de la discordancia entre los resultados de este estudio y los resultados de los estudios previos con Sorafenib.
- Para una completa evaluación del efecto de Sorafenib en modelos de EA sería necesaria la realización de más ensayos, como pruebas de comportamiento o análisis bioquímicos.
- Existen varias familias de fármacos con actividad antiangiogénica en los que ya se ha comprobado su eficacia para regular la angiogénesis, reducir la neuroinflamación y ralentizar la progresión de la enfermedad en modelos de EA.
- Es necesario continuar realizando estudios preclínicos con el fin de valorar si existe algún fármaco que reúna las características adecuadas para llevar a cabo ensayos clínicos con inhibidores de la angiogénesis.

8. Bibliografía

1. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59–70.
2. World Health Organization. Dementia [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 5]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
3. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: A review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. Vol. 2, Alzheimer's Research and Therapy. *Alzheimers Res Ther*; 2011.
4. Drew L. An age-old story of dementia. *Nature*. 2018;559(7715):S2–3.
5. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H BG. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2013;9(2):106–18.
6. Golde TE, Streit WJ, Chakrabarty P. Alzheimer's disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther*. 2013;5(3).
7. Xu W, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, et al. Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(12):1299–306.
8. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* (80-). 1992;256(5054):184–5.
9. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):1–23.
10. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*. 1992;359(6393):322–5.
11. Lansbury PT. Structural neurology: Are seeds at the root of neuronal degeneration? *Neuron*. 1997;19(6):1151–4.
12. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. Vol. 11, *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 457–70.
13. Cassano T, Magini A, Giovagnoli S, Polchi A, Calcagnini S, Pace L, et al. Early intrathecal infusion of everolimus restores cognitive function and mood in a murine model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* [Internet]. 2019;311(August 2018):88–105.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.011>

14. Makin S. Makin 2018 Nature Outlook - The amyloid hypothesis on trial. *Nature*. 2018;559(Supplement):S4–7.
15. Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Saecker A, Griep A, et al. NLRP3 is activated in AD and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 2013;493(7434):674–8.
16. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer’s disease. *Nat Immunol* [Internet]. 2015;16(3):229–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3102>
17. Yeh FL, Hansen D V., Sheng M. TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. Vol. 23, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd; 2017. p. 512–33.
18. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (80-). 2002;297(5580):353–6.
19. Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic B V. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(7):419–34.
20. Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Staufenbiel M, Krucker T. Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3587–92.
21. Beckmann N, Schuler A, Mueggler T, Meyer EP, Wiederhold KH, Staufenbiel M, et al. Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer’s disease. *J Neurosci*. 2003;23(24):8453–9.
22. Govindpani K, McNamara LG, Smith NR, Vinnakota C, Waldvogel HJ, Faull RL, et al. Vascular Dysfunction in Alzheimer’s Disease: A Prelude to the Pathological Process or a Consequence of It? *J Clin Med*. 2019;8(5):651.
23. De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: Filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(5):639–49.
24. Duarte A, Suchting S, Freitas C, Noble F, Benedito R, Bre C, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3225–30.
25. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, et al. A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of notch intracellular

- domain. *Nature*. 1999;398(6727):518–22.
26. Rosales-Nieves, Alicia E.; Alvarez-Vergara MI, et al. Non-productive angiogenesis disassembles A β plaque-associated blood vessels. Under review in *Nat. Comms*.
 27. Gentile C, Martorana A, Lauria A, Bonsignore R. Kinase Inhibitors in Multitargeted Cancer Therapy. *Curr Med Chem*. 2017;24(16):1671–86.
 28. Wälchli T, Mateos JM, Weinman O, Babic D, Regli L, Hoerstrup SP, et al. Quantitative assessment of angiogenesis, perfused blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain. *Nat Protoc*. 2015;10(1):53–74.
 29. Schindelin J, Arganda-Carrera I, Frise E, Verena K, Mark L, Tobias P, et al. Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 2009;9(7).
 30. Bourne R, Bourne R. ImageJ. *Fundam Digit Imaging Med*. 2010;9(7):185–8.
 31. Trenker R, Jura N. Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2020;63:174–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.016>
 32. Koch S. Neuropilin signalling in angiogenesis. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(1):20–5.
 33. Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K. VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(3):761–6.
 34. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 2013;153(1):13–9.
 35. Katoh O, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y, Tauchi H. Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Gene, KDR, in Hematopoietic Cells and Inhibitory Effect of VEGF on Apoptotic Cell Death Caused by Ionizing Radiation. *Cancer Res*. 1995;55(23):5687–92.
 36. Kazazi-Hyseni F, Beijnen JH, Schellens JHM. Bevacizumab. *Oncologist* [Internet]. 2010 Aug 5 [cited 2020 May 21];15(8):819–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/theoncologist.2009-0317>
 37. Aprile G, Rijavec E, Fontanella C, Rihawi K, Grossi F. Ramucirumab: Preclinical research and clinical development. Vol. 7, *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2014. p. 1997–2006.
 38. Roskoski R. Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis

- inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(2):323–8.
39. Grammas P, Martinez J, Sanchez A, Yin X, Riley J, Gay D, et al. A new paradigm for the treatment of alzheimer's disease: Targeting vascular activation. *J Alzheimer's Dis.* 2014;40(3):619–30.
 40. Javidnia M, Hebron ML, Xin Y, Kinney NG, Moussa CEH. Pazopanib Reduces Phosphorylated Tau Levels and Alters Astrocytes in a Mouse Model of Tauopathy. *J Alzheimer's Dis.* 2017;60(2):461–81.
 41. Paravar T, Lee DJ. Thalidomide: Mechanisms of action. *Int Rev Immunol.* 2008;27(3):111–35.
 42. Sainson RCA, Johnston DA, Chu HC, Holderfield MT, Nakatsu MN, Crampton SP, et al. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood.* 2008;111(10):4997–5007.
 43. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):314–22.
 44. Moreira BAL, Sampaio EP, Zmuidzinas SA, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide Exerts Its Inhibitory Action on Tumor Necrosis Factor α by Enhancing mRN A Degradation By Andre L. Moreira, Elizabeth P. Sampaio, S Antonina Zmuidzinas, Paula Frindt, Kendall A. Smith, and Gilla Kaplan*. 1993;177(June):6–11.
 45. Knight R. IMiDs: A Novel Class of Immunomodulators. *Semin Oncol.* 2005;32:24–30.
 46. Anderson KC. Lenalidomide and thalidomide: Mechanisms of action - Similarities and differences. *Semin Hematol.* 2005;42(SUPPL. 4):3–8.
 47. Decourt B, Wilson J, Ritter A, Dardis C, Difilippo FP, Zhuang X, et al. MCLENA-1: A phase ii clinical trial for the assessment of safety, tolerability, and efficacy of lenalidomide in patients with mild cognitive impairment due to alzheimer's disease. *Open Access J Clin Trials.* 2020;12:1–13.
 48. Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, et al. Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science (80-).* 1999 May 14;284(5417):1161–4.
 49. Conciatori F, Bazzichetto C, Falcone I, Pilotto S, Bria E, Cognetti F, et al. Role of mTOR signaling in tumor microenvironment: An overview. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):1–19.
 50. Faes S, Santoro T, Demartines N, Dormond O. Evolving significance and future

- relevance of anti-angiogenic activity of mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancers* (Basel). 2017;9(11):1–17.
51. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. *Society* [Internet]. 2002;22(20):7004–14. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/22/20/7004>
 52. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):132–41.
 53. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. Vol. 19, *Nature Medicine*. Nat Med; 2013. p. 983–97.
 54. An WL, Cowburn RF, Li L, Braak H, Alafuzoff I, Iqbal K, et al. Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2003 Aug 1;163(2):591–607.
 55. Li X, Alafuzoff I, Soininen H, Winblad B, Pei JJ. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain. *FEBS J*. 2005 Aug;272(16):4211–20.
 56. Lipton JO, Sahin M. The Neurology of mTOR. *Neuron*. 2014;84(2):275–91.
 57. Graziani EI. Recent advances in the chemistry, biosynthesis and pharmacology of rapamycin analogs. *Nat Prod Rep*. 2009;26(5):602–9.
 58. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20534–43.
 59. Kaeberlein M, Galvan V. Rapamycin and Alzheimer's disease: Time for a clinical trial? *Sci Transl Med*. 2019;11(476).
 60. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of $\alpha(v)\beta3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J*. 1999;18(4):882–92.
 61. Arrillaga-Romany I, Norden AD. Antiangiogenic therapies for glioblastoma. *CNS Oncol*. 2014;3(5):349–58.

9. Anexo. Informe del comité ético



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD Y FAMILIAS

ANEXO VIII

MODELO DE INFORME DEL ORGANISMO HABILITADO (Art. 34 del RD 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia)

COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (CEEA), COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN MACARENA – VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA. Órgano habilitado para la evaluación de proyectos de Experimentación Animal, mediante resolución del 9 de Agosto de 2013 de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

Reunido en la Sesión celebrada el día 27 de febrero de 2019 y según consta en el acta 02/2019, ha valorado el estudio Presentado por Alberto Pascual Bravo con DNI: 31265103-F Categoría (s) (según RD 1201/2005): B y C Titulado:

Ref. Interna: 0831-N-18

Título: "Uso de hiperoxia combinada con agentes normalizadores de la vasculatura para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, una prueba de concepto".

Que tiene una duración de: 12 meses

INFORMA

1. El proyecto, ha sido evaluado de forma apropiada al tipo de proyecto y la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto se realizará de acuerdo al artículo 34 del REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
2. El proyecto está justificado dados los beneficios que se prevén alcanzar desde el punto de vista de vista científico o educativo.
3. La finalidad del proyecto justifica la utilización de animales y está diseñado de manera que los procedimientos se realicen de la forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible, así como tendiendo a los principios de reemplazo, reducción y refinamiento.

Comité de Ética de la Investigación de los HSJLH, Virgen Macarena – Virgen del Rocío
Comité de Ética de Experimentación Animal
Edificio Estación de Laboratorios
Avda. Manuel Siurot, s/n - 41013 Sevilla
Tel. 900 162 458 - Fax 900923001

FIRMADO POR	CRISTINA DOMÍNGUEZ GUERRERO	16/03/2019 12:36:29	PÁGINA 1/4
	VICTOR MANUEL SANCHEZ MARGALET	16/03/2019 12:12:48	
VERIFICACIÓN	88F02880H3v7W1eSuRLx77hAgTAcT	https://web03.juntadeandalucia.es/verificafirma/	



4. Que ha sido revisado basándose en las reuniones internas desarrolladas por el Órgano Habilitado en la fecha y nº de acta que aparece en la cabecera.
5. Que el proceso de evaluación ha sido transparente, se ha realizado de modo imparcial, pudiendo integrar la opinión de partes independientes (según el apartado 3 del artículo 34 del RD 53/2013).
6. El proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de intereses en las partes implicadas en la evaluación, siendo tanto ellos vocales (científico/s) evaluador/es de este proyecto, como ella especialista en bienestar animal, ajeno/a totalmente al mismo.
7. Basándose en la evaluación realizada en base a la documentación presentada por el investigador responsable se ha realizado la siguiente **EVALUACIÓN**:

Evaluación de su finalidad, de los beneficios científicos que se prevén alcanzar o de su valor docente: (Utilizar el espacio necesario)

Los datos presentados en el proyecto, justifican suficientemente la necesidad de la realización del mismo en base a los beneficios que se pretenden obtener.

Evaluación de su conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento: (Utilizar el espacio necesario)

Los protocolos presentados atienden a los principios de reemplazo, reducción y refinamiento.

Evaluación y clasificación de sus procedimientos en función del grado de severidad:

(Utilizar el espacio necesario. Añadir tantas evaluaciones y clasificaciones como sean necesarias según el número de procedimientos que conlleva el proyecto)

Procedimientos

Procedimiento 1: Generación de modelos de Alzheimer

Procedimiento 2: Generación de modelos de Alzheimer+to con Tamoxifeno

Procedimiento 3: Generación de modelos de Alzheimer+ Tratamiento (Sorafenib)

Procedimiento 4: Generación de modelos de Alzheimer+ Tratamiento

(dithiothaldomide)

Procedimiento 5: Generación de modelos de Alzheimer+ Tratamiento (inhibidor de

PKFB)

Procedimiento 6: Generación de modelos de Alzheimer+ Exposición a Hiperoxia

Comité de Ética de la Investigación de los BSLAF, Virgen Macarena - Virgen del Rocío
Comité de Ética de Experimentación Animal

Edificio Edificio de Laboratorios
Avda. Manuel Siurot, s/n - 41013 Sevilla
Tel. 800 162 458 - Fax 955923191

FIRMADO POR	CRISTINA PICHARRO GARCERÁN	14/03/2019 12:36:29	PÁGINA 24
	VICTOR MANUEL SANCHEZ MARGALET	14/03/2019 12:12:48	
VERIFICACIÓN	u9f2889f2e767e1a29f77a97a1c7	https://web01.juntadeandalucia.es/verificarFirma/	



Clasificación:

<input type="checkbox"/> Sin recuperación	<input type="checkbox"/> Leve	<input checked="" type="checkbox"/> Moderado	<input type="checkbox"/> Severo
---	-------------------------------	--	---------------------------------

Análisis de los daños y beneficios, para determinar si los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los resultados esperados, teniendo en cuenta consideraciones éticas y los beneficios que, en definitiva, pueda suponer el proyecto para los seres humanos, los animales o el medio ambiente:
(Utilizar el espacio necesario)

Tras el análisis de los daños y beneficios, consideramos que basándonos en las consideraciones éticas, los daños, el sufrimiento, el dolor y la angustia que se les puedan causar a los animales están justificados por los beneficios que se pueden obtener con los resultados esperados.

Examen de las situaciones y excepciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3, 25.5, 26 y 29 del RD 53/2013
(Utilizar el espacio necesario)

Situaciones: No procede

Excepciones: No procede

Determinación de si el proyecto debe evaluarse de forma retrospectiva:

Resultado:

<input type="checkbox"/> Si	<input checked="" type="checkbox"/> No
-----------------------------	--

Periodo de realización (en caso afirmativo):

Documentación para realizar la evaluación retrospectiva (en caso afirmativo):

- Grado de consecución de los objetivos.
- Evaluación del daño infringido a los animales, incluido el número y las especies de animales utilizados, y la severidad de los procedimientos.
- Cualquiera de los elementos que puedan contribuir a una mejor aplicación del requisito de reemplazo, reducción y refinamiento.

Comité de Ética de la Investigación de los BSLU, Víctimas Menores - Víctimas del Sexo
Comité de Ética de Especialización Animal
6ª planta Edificio de Laboratorios
Avda. Manuel Siurot, s/n - 41013 Sevilla
Tel. 800 162 458 - Fax 955023101

FIRMADO POR	CRISTINA RICHARDO GUERRERO VICTOR MANUEL SANCHEZ MARGALET	14/03/2019 12:36:29 14/03/2019 12:32:48	PÁGINA 3/4
VERIFICACIÓN	349028894326707e1a4e1d779a9f1a2f	https://web01.juntadeandalucia.es/verificaFirma/	



POR TODO LO ANTERIORMENTE EXPUESTO, CONFIRMO QUE EL PROYECTO SOMETIDO A ESTE INFORME DEL ÓRGANO HABILITADO:

1. Se clasifica como:

Proyecto Tipo I	<input type="checkbox"/>
Proyecto Tipo II	<input checked="" type="checkbox"/>
Proyecto Tipo III	<input type="checkbox"/>
OBSERVACIONES:	

2. Que la evaluación del proyecto sometido a este informe del Órgano Habilitado, resulta ser:

Favorable	<input checked="" type="checkbox"/>
Favorable condicionado a la subsanación de defectos formales o a la aportación de la documentación adicional expresamente solicitada	<input type="checkbox"/>
Desfavorable	<input type="checkbox"/>
OBSERVACIONES:	

3. Que este documento tiene una vigencia máxima de 5 años.

Elaborado por: Secretario Órgano Habilitado	
Nombre: Cristina Pichardo Guerrero Fecha: 14/03/2019	Firma

Revisado y aprobado por: Presidente Órgano Habilitado	
Nombre: Víctor Sánchez Margalet Fecha: 14/03/2019	Firma

Comité de Ética de la Investigación de los IISLA Virgen Macarena - Virgen del Rocío
Comité de Ética de Experimentación Animal
Edificio Edificio de Laboratorios
Avda. Manuel Siurot, s/n - 41013 Sevilla
Tel. 600 162 458 - Fax 955023191

FIRMADO POR	CRISTINA RICHARDO GUERRERO	15/03/2019 12:36:26	PÁGINA 4/4
	VICTOR MANUEL SANCHEZ MARGALET	14/03/2019 17:12:48	
VERIFICACIÓN	6URJ2698PUB5W7teRULx77hAgtAc7	https://web01.juntadeandalucia.es/verificaFirma/	