(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 702 619**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/365 (2006.01)
A61K 36/19 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2014** **PCT/US2014/034758**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014** **WO14176149**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2014** **E 14787478 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2897608**

(54) Título: **Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo con andrografólidos**

(30) Prioridad:

22.04.2013 US 201361814445 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2019

(73) Titular/es:

INNOBIOSCIENCE, LLC (33.3%)
1303 Riverview Circle
Bradenton, FL 34209, US;
INESTROSA, NIBALDO C. (33.3%) y
HANKCKE OROZCO, JUAN L. (33.3%)

(72) Inventor/es:

INESTROSA, NIBALDO C. y
HANKCKE OROZCO, JUAN L.

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 619 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo con andrografólidos

Introducción

Los mecanismos implicados en los cambios patogénicos desencadenados en la enfermedad de Alzheimer (EA) no se entienden claramente, la disfunción neuronal, que incluye el fallo sináptico asociado con la pérdida de proteínas sinápticas y una reducción en la supervivencia neuronal por acumulación de péptido β amiloide (Aβ), contribuyendo a la progresión de la enfermedad. De hecho, el uso de compuestos naturales es una estrategia conceptual interesante en la búsqueda de fármacos con potencial terapéutico para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos. Aquí, informamos que Andrografólido (ANDRO), un diterpeno labdano y un componente importante de *Andrographis Paniculata* previene y revierte la neuropatología en modelos de ratones de EA en dos grupos de edades establecidas (ratones de 7 meses y 12 meses de edad, respectivamente). En ambos grupos de animales transgénicos, ANDRO recupera las funciones de la memoria espacial correlacionadas con la plasticidad sináptica y las proteínas sinápticas. ANDRO disminuye la fosforilación *tau* alrededor de especies oligoméricas y reduce los niveles de Aβ cambiando la ontogenia de las placas de Aβ alterando los niveles de Aβ en el hipocampo y la corteza en ratones de 6 meses de edad. ANDRO también incrementa los potenciales postsinápticos excitadores de campo en la región CA1 de las secciones de hipocampo que inhiben la depresión a largo plazo (LTD) por un mecanismo que probablemente involucra una inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3β. Los resultados sugieren que ANDRO podría utilizarse en una posible terapia preventiva y reversible durante el estado de progresión de la EA.

Abreviaturas: APP = proteína precursora amiloide; PS-1 = presenilina-1; A = péptido amiloide; ANDRO = Andrografólido; PSD-95 = proteína de densidad postsináptica-95; SYP = sinaptofisina; GFAP = proteína ácida fibrilar glial; glucógeno sintasa quinasa-3β = GSK-3β; MWM = laberinto acuático de Morris (del inglés Morris Water Maze); LTP = potenciación a largo plazo; LTD = depresión a largo plazo.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y hasta la fecha no existe una cura conocida disponible. La neuropatología subyacente de la EA incluye la deposición extracelular de péptido β amiloide (Aβ), acumulación intraneuronal de formas *tau* hiperfosforiladas (Mandelkow y Mandelkow 2012; Selkoe et al 2012), así como disfunción sináptica y pérdida neuronal (Scheff et al 2007; Selkoe et al 2012; Selkoe 2002; Terry et al 1991). El análisis de los cerebros de los pacientes con EA respalda la hipótesis de que los agregados de Aβ son responsables del fracaso sináptico (Mucke y Selkoe 2012) y la generación de modelos animales recapitula los rasgos característicos de EA, que tienen una gran relevancia para mejorar la comprensión de esta enfermedad y ayudar a desarrollar nuevas terapias (Braidy et al 2012; Garcia-Alloza et al 2006)

Andrographis Paniculata es una planta nativa de los países del sudeste asiático. Durante siglos, se ha utilizado como medicina herbal oficial en China para el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas (Tang y Eisenbrandt 1992). Estudios previos han indicado que el andrografólido (ANDRO), un diterpeno de la familia labdano, es responsable de la mayoría de los efectos biológicos de *Andrographis Paniculata* (Figura 1A) (Basak et al 1999; Hidalgo et al 2005; Iruretagoyena et al 2005). Estudios recientes sugieren que ANDRO podría ejercer algunos efectos neuroprotectores, es decir, contra el daño inducido por la dopamina en los cultivos de neuronas gliales mesencefálicas (Wang et al 2004), el estrés oxidativo inducido por la nicotina en el cerebro (Das et al 2009) y en la isquemia cerebral (Chan et al 2010), a través de la inhibición de ciertas vías dependientes de la apoptosis, Akt y NF-κB (Lu et al 2011). Sin embargo, el papel de ANDRO en enfermedades neurodegenerativas como la EA no ha sido investigado.

Aquí exploramos si ANDRO muestra efectos beneficiosos en un modelo de ratón transgénico AD con APP y transgenes mutantes PS-1 (APP/PS1) (Garcia-Alloza et al 2006). Los ratones transgénicos jóvenes y envejecidos se trataron con ANDRO y se utilizaron para análisis conductuales, electrofisiológicos, bioquímicos e histoquímicos. Encontramos una recuperación de memoria, funciones sinápticas, potenciación a largo plazo (LTP) y una clara reducción en la fosforilación de *tau* en ambos conjuntos de animales. Curiosamente, en ratones de 7 meses de edad detectamos una reducción en las especies y agregados de Aβ. No obstante, en ratones de 12 meses no tenemos cambios oligoméricos Aβ significativos en el hipocampo. Con la idea de encontrar un posible mecanismo, mostramos que ANDRO inhibió la depresión a largo plazo (LTD) que indica un mecanismo sináptico, que está relacionado con la inhibición de la actividad de GSK-3β (Bradley et al 2012b; Peineau et al 2007). Nuestros resultados sugieren que ANDRO puede proporcionar efectos beneficiosos para el tratamiento de la EA en diferentes niveles de edad.

El documento WO2011/086007 (Indena S.P.A.) se refiere a composiciones que comprenden extractos de *Andrographis Paniculata* combinados con extractos de Ginkgo biloba complejados con fosfolípidos, y su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, en particular la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple.

Sumario de la invención

La invención proporciona andrografólido para uso en un método para el tratamiento de la demencia de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano en donde el andrografólido se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz como una dosis oral diaria de 1 a 4 miligramos por kilogramo de peso corporal de un ser humano.

Adecuadamente, el método para el tratamiento de la demencia en un ser humano de la enfermedad de Alzheimer

comprende:

a) administrar a un ser humano un ensayo seleccionada del grupo que consiste en: el Mini Examen del Estado Mental (MMSE), la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer (ADAS), la Prueba de Nombres de Boston (BNT) y la Prueba Token (TT); y después

b) administrar andrografólido a dicho ser humano, durante al menos 30 días, una dosis diaria efectiva para preservar o mejorar la función cognitiva.

Adecuadamente, el andrografólido se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Adecuadamente, el andrografólido se proporciona como un extracto de *Andrographis paniculata,* estandarizado para contener no menos del 50% (p/p) de andrografólido.

Adecuadamente, el andrografólido es puro andrografólido.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: ANDRO recupera las funciones cognitivas en un modelo de ratones con EA de diferentes edades. (A) Andrografólido (ANDRO) es un diterpeno de la familia labdano purificado de *Andrographis paniculata.* (B)El rendimiento del comportamiento en el test de flexibilidad de memoria. Los ratones APPswe/PS-1 de 6 meses de edad fueron tratados con IP con disolución de vehículo control (Wt, círculos grises y Tg Control, círculos blancos) o con ANDRO (Tg ANDRO, círculos negros). (C) El rendimiento del comportamiento fue evaluado por la latencia de escape en el test MWM clásico. Se trataron ratones Wt y APPswe/PS-1 de 12 meses de edad con disolución de vehículo (Wt, círculos grises y Tg Control, círculos blancos) o ANDRO (Tg ANDRO, círculos negros). Los asteriscos indican diferencia significativa, $p < 0.05$.

Figura 2: ANDRO recupera la inducción de LTP y las proteínas sinápticas. (A) La LTP generada por TBS en las secciones del hipocampo CA1 de ratones APP/PS 1 de 12 meses de edad tratados con disolucion de vehículo o ANDRO muestra una recuperación en la capacidad para inducir una LTP. (Panel derecho) Gráfico de los cambios de pendiente de fEPSP en animales tratados después de 40 minutos de registro. Los puntos y las barras significan ± SE de 6 secciones diferentes, * $p < 0.05$. (B) La LTP generada por TBS en el hipocampo CA1 en secciones de ratones Wt y APP/PS1 de 7 meses de edad tratados con solución de vehículo o ANDRO muestra una recuperación en la capacidad para inducir una LTP. (Panel derecho) Gráfico de los cambios de pendiente de fEPSP en animales tratados después de 40 minutos de registro. Los puntos y las barras significan ± SE de 7 secciones diferentes, * $p < 0.05$. (C, D) Inmunotransferencias de extractos de proteínas totales del hipocampo de ratones Tg Control y Tg ANDRO (6 meses y 12 meses de edad respectivamente). Los gráficos corresponden al análisis densitométrico de cada proteína normalizada frente al control de carga y comparada con los niveles de la misma proteína en el control de APP/PS 1. El control de carga en cada caso fue β-tubulina (hipocampo). $n \geq 3$, * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 3: ANDRO reduce los agregados de Aβ en el cerebro de ratones APswe/PS-1 jóvenes. (A, a) Tinción Th-S utilizada para detectar depósitos de amiloide de ratones transgénicos en la corteza y el hipocampo de ratones transgénicos de 12 meses de edad con vehículo (panel izquierdo) y tratamiento con ANDRO (panel derecho). La acumulación de amiloide se cuantificó con la tinción Th-S y el número de placas amiloides por área en (a) corteza y (b) hipocampo. Las barras blancas muestran ratones con doble control de Tg y las barras negras muestran Tg ANDRO, * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Imagen a10x. (B, a) Representación de transferencia en ranura a partir de hipocampo, utilizando 6 µg de proteína por ranura manchada en una membrana de nitrocelulosa y expuesta al anticuerpo A11. (b) Los gráficos representan el perfil de análisis de densitometría normalizado de la intensidad de la ranura para cada tratamiento. (C) Gráfica de frecuencia acumulativa del tamaño de las placas amiloides para ratones tratados con APPswe/PS-1 control y ANDRO. (F) Caracterización morfológica de las placas amiloides Th-S positivas presentes en el cerebro de los APPS/PS-1 jóvenes. (E) Cuantificación del número de cada tipo de placa amiloide presente en el cerebro. (Fa) La tinción con Th-S usada para detectar depósitos de amiloide de ratones transgénicos viejos (12 meses de edad) en la corteza (Fb) e hipocampo (Fc) de Tg Control y Tg ANDRO. La acumulación de amiloide se cuantificó con la tinción con Th-S. Las barras blancas muestran ratones con doble control de Tg y las barras negras muestran Tg ANDRO. Imagen a 10x. Manchas representativas del hipocampo de viejos ratones APPswe/PS- 1 control y tratados con ANDRO (Ga), Los gráficos representan el perfil de análisis de densitometría normalizado de la intensidad de la ranura para cada tratamiento.

Figura 4: ANDRO reduce la fosforilación de *tau* en cerebros de ratones APPswe/PS1 de diferentes edades. (A)Inmunotransferencia de homogeneizados de hipocampo de ratones APPswe/PS-1 de 12 meses de edad (Tg Control y Tg ANDRO) utilizando el anticuerpo PHF-1 y AT8. (Panel inferior) El gráfico corresponde al análisis densitométrico de las bandas normalizadas frente al control de carga y comparado con el control APPswe/PS-1 con APPswe tratado con ANDRO. (B) Las células positivas AT8 se detectan en otras regiones en ratones APPswe/PS-1 control y se tratados con ANDRO. (Gráficos de abajo) muestra la cuantificación del número de neuronas AT8 positivas por área en mm^2 y cerca de placas amiloides detectadas con ThS. Las neuronas positivas y las placas amiloides están indicadas por una flecha blanca y negra respectivamente. Cuantificación del número de neuronas AT8 positivas por placa * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 5: ANDRO inhibe GSK-3β permitiendo el aumento en los niveles de β catenina e induce un aumento en la transmisión sináptica. Las secciones de hipocampo de animales Wt se expusieron a 10 μM de ANDRO durante 1h. Manchas representativas de extractos de proteínas totales de secciones del hipocampo tratados con ACSF o ANDRO 10μM. (A, a) El tratamiento con ANDRO durante 1h inhibe GSK-3β, esto se muestra en el incremento de la fosforilación de Ser-9 (forma inhibida de GSK-3β) y en la disminución de la fosforilación de Tyr-216 (forma activada de GSK-3β). (A, b) Los gráficos del análisis densitométrico de cada proteína se normalizaron frente al GSK-3β total y el control de carga y se compararon con los niveles de la misma proteína presente en el control WT expresados como valores relativos. (A, c) La β-catenina también se evaluó en presencia de ANDRO (panel derecho). Los gráficos del análisis de densitometría de cada proteína se normalizaron contra el control de la carga total de β-catenina y compararon con los niveles de la misma proteína en el control de WT expresados como valor relativo. Las barras blancas corresponden a ASCF y las barras negras a las muestras tratadas con ANDRO. Las barras representan el promedio ± S.E. * p <0.05; ** p <0.01(B, a) Gráfica de fEPSP a tiempos diferentes, en condición de control o tratado con ANDRO (10 μM). El panel derecho corresponde a la gráfica de los cambios de amplitud de fEPSP, en presencia o ausencia de ANDRO. (B, b) Gráfica de la facilitación por pares de pulsos (PPF) en presencia o ausencia de ANDRO. El recuadro muestra registros representativos. Los puntos y las barras tienen una media ± SE de 7 secciones diferentes, * p <0.05. (C) seccionesLas secciones del hipocampo se expusieron a ANDRO y se indujo LTP, la flecha indica el tiempo de TBS y la gráfica muestra la pendiente fEPSP a diferentes tiempo. El panel derecho corresponde a la gráfica de cambios en la pendiente se fEPSP, en presencia o ausencia de ANDRO. El recuadro muestra registros representativos. Los puntos y las barras tienen una media ± SE de 7 secciones diferentes, * p <0.05.

Figura 6: ANDRO bloquea LTD por inhibición de GSK-3β en la sinapsis CA3-CA1. (A) Modelo de mecanismo de acción de 6-BIO en la inhibición de GSK-3β durante la inducción de LTD. (B) seccionesLas secciones del hipocampo se expusieron a 6-BIO (10 nM) y se indujo el LTD, la flecha indica el tiempo de LFS y la gráfica muestra la pendiente de fEPSP a diferentes tiempos. (Panel derecho) Gráfico de cambios en la pendiente fEPSP, en presencia o ausencia de 6-BIO. (C) Las secciones de hipocampo se expusieron a ANDRO y se indujo un LTD, la flecha indica el tiempo de LFS y la gráfica muestra la pendiente fEPSP a diferentes tiempos. (Panel derecho) Gráfica de cambios en la pendiente fEPSP, en presencia o ausencia de ANDRO. El recuadro muestra resgistros representativos. Los puntos y las barras tienen una media ± SE de 7 secciones diferentes, * p <0.05.

Figura 7: ANDRO activa la ruta canónica Wnt. (A) Western blotting representativo de la ruta de activación Wnt en cultivos de neuronas de hipocampo de 14 DIV expuestas a diferentes concentraciones de ANDRO durante 6 h.(B) Inmunofluorescencia frente a β-catenina en cultivos de neuronas de hipocampo de 14 DIV expuestos a 5μM de ANDRO durante 6 h. (C) Electrotransferencia representativa de la fracción citoplásmica para el curso de tiempo de β-catenina y la inhibición de GSK-3β, en neuronas del hipocampo expuestas a ANDRO (10μM). (D) Electrotransferencia representativa de la fracción nuclear para el curso de tiempo de β-catenina, en neuronas del hipocampo expuestas a ANDRO (10 μM). Los valores representan la media ± S.E (n = 4 ratones). Prueba de t de Student, *p <0.05; **p <0.01.

Figura 8: ANDRO actúa ligando Wnt en dirección a su receptor. (A) Las secciones de hipocampo incubados conjuntamente con ANDRO o medio condicionado con Wnt3a en presencia de proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (sFRP) para analizar la acumulación de β-catenina por electrotransferencia.(B) Co-incubación de ANDRO o medio acondicionado con Wnt3a con el antagonista Wnt Dkk-1 para analizar la acumulación de β-catenina. (C) Cambio de movilidad de Disheveled 3 (Dvl-3) en secciones de hipocampo de ratones de dos meses de tipo salvaje en presencia de ANDRO, ligando Wnt3a o 6-BIO para analizar la fosforilación de Dvl-3 mediante la unión del ligando a su receptor. Los valores representan la media ± S.E (n = 4 ratones). Prueba de t de Student, *p <0.05; **p <0.01.

Figura 9: ANDRO induce las acumulaciones de β-catenina y la inhibición GSK-3β con una cinética similar de 6BIO. (A) Curso de tiempo de acumulación de β-catenina en presencia de ANDRO, medio acondicionado con Wnt3a o 6-BIO. (B) Curso de tiempo de inhibición de GSK-3β como se indica para un incremento en la fosforilación de Ser-9 en presencia de ANDRO, medio acondicionado con Wnt3a o 6-BIO. (C) Curso de tiempo de inhibición de GSK3β como se indica para una disminución en la fosforilación de Tyr-216 en presencia de ANDRO, medio acondicionado con Wnt3a o 6-BIO. Los valores representan la media ± S.E (n = 4 ratones). Prueba de t de Student, *p <0.05; **p <0.01.

Figura 10: ANDRO induce la transactivación y transcripciones de los genes diana Wnt. (A) Ensayo TOP flash en células HEK293T para ANDRO o 6BIO.(B) Ensayo FOP flash en células HEK293T para ANDRO o 6-BIO. (C) Gráfico de clustergram del valor de señal expresado diferencialmente de genes objetivo de Wnt para cultivos de hipocampo ANDRO y 6-BIO tratados durante 9 h. (D) Diagrama de genes objetivo de Wnt regulados por encima y por debajo para el tratamiento con ANDRO y 6-BIO. Los valores representan la media ± S.E (n = 4 ratones). Prueba de t de Student, *p <0.05; **p <0.01.

Figura 11: ANDRO inhibe directamente a GSK-3β compitiendo con el sitio de unión al sustrato (A) Gráfico representativo de la medida de actividad de GSK3β por una reacción de luminiscencia.(B) Ensayo de inhibición de GSK3β en presencia de diferentes concentraciones de ANDRO para determinar la constante de IC50.(C) Ensayo de inhibición en presencia o ausencia del agente reductor DTT para determinar si el mecanismo de inhibición de ANDRO implica un aducto covalente con una cisteína presente en la GSK3β.(D) Ensayo de inhibición de ANDRO en presencia de diferentes concentraciones de ATP y cálculo de los valores de IC50 para determinar si ANDRO es un inhibidor competitivo para el sitio de unión de ATP.(E) Ensayo de inhibición de ANDRO en presencia de diferentes concentraciones de sustrato y cálculo de los valores de IC50 para determinar si ANDRO es un inhibidor competitivo

para el sitio de unión del sustrato. Los valores representan la media ± S.E (n = 4 ratones). Prueba de t de Student, $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$.

Figura 12: Acoplamiento de ANDRO y GSK3β en el sitio de unión al sustrato. (A) Posición de acoplamiento de andrografólido (ANDRO) a un área del sitio de unión al sustrato de GSK-3β. Se generaron 20 poses vinculantes con una puntuación promedio de ChemPLP de 51.1 ± 2.2. El ligando se engancha en enlaces de hidrógeno con el bolsillo de unión cebador fosfato de GSK-3β (es decir, Arg-96, Arg-180, Lys-205) y está ubicado dentro de 5 Å del sitio de fosforilación de activación de quinasa Tyr-216. (B) El sitio de acoplamiento está más rodeado por los residuos Phe-67, Gln-89 y Asn-95 que se cree que están involucrados en el reconocimiento del sustrato.

Figura 13: ANDRO induce neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos. Se inyectaron i.p. ratones de tipo salvaje de dos meses de edad. con vehículo solo o con 2 mg/kg de ANDRO 3 veces por semana durante 4 semanas. (A) Imágenes representativas del doble etiquetado de Ki67, utilizadas para identificar células en proliferación, y el marcador neuronal maduro NeuN en el giro dentado del hipocampo. Las imágenes representan las proyecciones en la dirección z de una serie de 8 secciones ópticas de 1μm. Ampliación original: 20X. Se observó un aumento significativo en el número total de células $Ki67^{+}$ en ratones tratados con Andro, lo que indica que el fármaco indujo la proliferación celular.(B)Tinción de inmunofluorescencia frente a el marcador neuronal inmaduro DCX. Las imágenes representan las proyecciones en la dirección z de una serie de 12 secciones ópticas de 1μm. Ampliación original: paneles izquierdos: 20X; Paneles derechos: 40X. Un aumento significativo en el porcentaje del área de la capa celular granular cubierta por DCX^{+} teñido se observó en ratones tratados con Andro en comparación con los controles. Los valores representan la media ± S.E (n = 4 ratones). Prueba de t de Student, $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$.

Figura 14: (A) Un gráfico de líneas que compara la actividad de la luciferasa (RLU) con el ATP (uM). (B) Un gráfico de líneas que compara la actividad de la luciferasa (RLU) con el registro [BIO] (nM).

Descripción detallada

La invención se entiende mejor revisando nuestros resultados experimentales reales. Estos resultados surgen de dos líneas de experimentos. En el primero (ejemplo 1), se examina el efecto de andrografólido sobre el aprendizaje y el comportamiento de la memoria en un modelo de Alzheimer. En el segundo (ejemplo 2), se examinan y cuantifican ciertos cambios anatómicos relacionados con el tratamiento con andrografólido en un modelo de Alzheimer.

Ejemplo 1

Material y métodos

Animales. Ratones transgénicos dobles APPswe/PS-1 de seis meses y doce meses de edad, que expresan el APPswe mutante (K595N/M596L) y PSEN1ΔE9, la eliminación del exón 9 bajo el control del promotor de priones de ratón, se obtuvieron del laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EE. UU., número de stock 004462). Los animales se trataron y manejaron de acuerdo con las pautas de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, Baltimore, MD). Los tratamientos se realizaron mediante inyección intraperitoneal (IP) de 2,0 mg/kg de ANDRO con solución salina como vehículo, tres veces por semana. Los animales de control transgénicos y de tipo salvaje (Wt) se inyectaron solo con el vehículo. Los datos de Control Wt se almacenaron después de los análisis de los resultados, ya que no se encontraron diferencias estadísticas entre ellos (datos no mostrados).

Reactivos y anticuerpos. Andrografólido (ANDRO, Figura 1A) se obtuvo de Sigma Chem, (St. Louis, MO). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-PSD-95 monoclonal de ratón (clon K28/43; (Antibodies, Inc, UC Davis/NIH NeuroMab Facility, Davis, CA), anti-Pan Shank de ratón (clon N23B/49; UC Davis/NIH NeuroMab), ratón anti-NR2B (clon N59/36; UC Davis/NIH NeuroMab), ratón anti-GluR2 (clon L21/32; UC Davis/NIH NeuroMab), anti-sinaptofisina de cabra (sc-7568 Santa Cruz), conejo anti-VAMP 1/2/3 (sc-13992 Santa Cruz), anti-ratón *tau*, epítopo PHF1 (un amable regalo del Dr. Peter Davies, Departamento de Patología, Facultad de Medicina Albert Einstein, Bronx, NY), clon de anti-β-actina de ratón AC-15 (A1978 Sigma Aldrich), anti-PHF de ratón *tau* clon AT8 (MN 1020, Thermo Scientific), anti-p44/42 MAPK de conejo (Erk1/2) (9102, señalización celular), anti-GSK-3β pSer-9 de conejo (señalización celular n 9336S), anti-GSK-3β pTyr-216 (BD Biosciences # 612312), GSK-3β total (sc-9166 Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-Aβ de ratón (4G8) y oligómero anti-Aβ (A11) (Chemicon, Temecula, CA)

Prueba de comportamiento

Prueba de modelo clásico: La tarea de MWM se realizó como se describió anteriormente en nuestro laboratorio (Braidy et al 2012; De Ferrari et al 2003; Dinamarca et al 2008; Inestrosa et al 2013; Toledo & Inestrosa 2010). Brevemente, los ratones se entrenaron en una piscina circular, de 1,2 m de diámetro (agua opaca, 50 cm de profundidad) llena de agua a 19-21 °C. Para el entrenamiento, una plataforma sumergida de 9 cm (1 cm por debajo de la superficie del agua, invisible para el animal) duración máxima de prueba 60 segundos, 10 segundos en la plataforma al final de las pruebas. Cada animal se entrenó para localizar la plataforma, la prueba se realizó considerando tres ensayos por día y la natación se monitorizó utilizando un sistema de seguimiento automático (HVS Imagen, Hampton, Reino Unido). Este sistema se utilizó para medir el tiempo de latencia necesario para alcanzar la plataforma y el tiempo empleado en cada cuadrante. Después de la prueba, se retiró el ratón del laberinto, se secó y se devolvió a su jaula.

Prueba de flexibilidad de memoria: El MWM se realizó como se describió anteriormente en nuestro laboratorio (Toledo e Inestrosa 2010). Brevemente, los ratones se entrenaron en un laberinto de agua circular de 1,2 m de diámetro (agua opaca, 50 cm de profundidad, 19-21 °C, una plataforma de 9 cm , 1 cm por debajo de la superficie del agua, duración máxima de ensayo de 60 s, 10 s en la plataforma al final de ensayos). Cada animal se entrenó para una localización pseudo aleatoria de la plataforma cada día, durante 4 días, con una nueva localización de platafroma cada día. El entrenamiento se llevó a cabo hasta 10 intentos por día, hasta que se cumplió el criterio de 3 ensayos sucesivos con una latencia de escape de <20 s. Al finalizar la prueba, el ratón se retiró del laberinto, se secó y se devolvió a su jaula. Los animales se probaron para la siguiente ubicación al día siguiente. Los datos se recopilaron utilizando un sistema de seguimiento de video para laberinto de agua (Imagen HVS).

Procedimientos inmunohistoquímicos. Los procedimientos de perfusión, fijación e inmunocitoquímica de flotación libre se realizaron como se describió anteriormente (De Ferrari et al 2003; Inestrosa et al 2013; Toledo & Inestrosa 2010). El lavado y la dilución de los reactivos inmunitarios se realizaron utilizando PBS 0,01 M con Triton X-100 al 0,2% (PBS-T) en todos los experimentos, con dos lavados de PBS-T por incubación de anticuerpos. Las secciones se pretrataron con H_2O_2 al 0,5% durante 30 minutos para reducir la actividad de peroxidasa endógena, seguido de un tratamiento con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% a temperatura ambiente durante 1 hora para evitar la unión no específica. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche a 4 ºC. La detección del anticuerpo primario se realizó con el kit Pierce ABC (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). La tinción se desarrolló incubando durante 15 minutos con diaminobencidina al 0,6%, seguido de la adición de H_2O_2 (0.01% concentración final). Después de la inmunotinción, todas las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, se secaron al aire, se deshidrataron y se cubrieron con bálsamo de Canadá (Merck, Darmstadt, Alemania).

El anticuerpo específico utilizado para la inmunohistoquímica se antifosforiló *tau* AT8 (1:1000). Las secciones se pretrataron con H_2O_2 al 0.3% y luego se incubaron en BSA al 3% en PBS. Los lavados y las diluciones de anticuerpos se realizaron utilizando Triton X-100 al 0,4% en PBS. La inmunohistoquímica se realizó utilizando el método ABC (complejo de biotina avidina-HRP) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las secciones de flotación libre se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina, se secaron al aire, se deshidrataron en etanol graduado y se cubrieron con bálsamo de Canadá (Merck, Darmstadt, Alemania). El análisis de imágenes y el recuento neuronal de PHF-1 se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Cancino et al 2008).

Tinción con tioflavina-S (Th-S). La tinción Th-S se desarrolló en secciones recubiertas de gelatina como se describió anteriormente (Carvajal & Inestrosa 2011; Toledo & Inestrosa 2010). Después de la deshidratación y la rehidratación en baterías de etanol y xilol, las secciones se incubaron en agua destilada durante 10 minutos y después se sumergieron en la disolución de Th-S (0.1% de THS en 70% de etanol) durante 5 minutos. Después, las secciones se lavaron dos veces en etanol al 70% durante 30 segundos y se cubrieron con un medio de montaje antifaz en la oscuridad.

Análisis de imagen. Las secciones del cerebro teñido se fotografiaron utilizando un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara RTV Micro-editor 3.3 (QImaging). La luminosidad de la luz incidente y el tiempo de exposición se calibraron para asignar valores de píxel que oscilan entre 0 y 255 en imágenes RGB (sin transmisión de luz a plena luz), que se utilizaron en todas las preparaciones. Las imágenes se cargaron en el software ImageJ v.1.40g (NIH) para su análisis. La selección de áreas para la medición se realizó mediante el ajuste de umbral manual o mediante la selección manual directa de ROI en tinciones heterogéneas.

Inmunotransferencia. El hipocampo y la corteza de los ratones transgénicos tratados o de control se disecaron en hielo y se procesaron de inmediato, como se detalla anteriormente (Toledo & Inestrosa 2010). Brevemente, los tejidos del hipocampo y de la corteza se homogeneizaron en un tampón RIPA (Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1% y SDS al 1%) complementados con una mezcla de inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa (25 mM NaF, 100 mM Na_3VO_4 y 30 µM de $Na_4PAG_20_7$) utilizando un homogeneizador Potter y luego pasa secuencialmente a través de jeringas de diferente calibre. Las muestras de proteína se centrifugaron a 14000 rpm a 4 C dos veces durante 15 min. Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce). Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia en membranas de PVDF. Los ensayos de Western blot se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Inestrosa et al 2013; Toledo & Inestrosa 2010).

Transferencia en ranura. Se realizaron ensayos de transferencia en ranura, como se describió anteriormente (Toledo & Inestrosa 2010). En resumen, los extractos de proteínas totales se centrifugaron para eliminar los agregados fibrilares a 20000 g durante 1 h. Se determinó la concentración de proteína de la fracción soluble y se mancharon 6 µg de proteína en 0,45 μm^2 de nitrocelulosa (Millipore), bloqueada con gelatina PBS-T al 0,4% e incubada con un anticuerpo anti-oligomérico A11 (1/5000) durante 2 horas a 4 °C. Las transferencias en ranura se revelaron con la misma metodología que WB.

Preparación de secciones y electrofisiología. Las secciones de hipocampo se prepararon de acuerdo con los procedimientos estándar descritos anteriormente (Cerpa et al 2010; VarelaNallar et al 2010). Brevemente, se cortaron secciones transversales (350 µm) del hipocampo dorsal en líquido cefalorraquídeo artificial frío (ACSF, en mM: 124 NaCl, 2,6 $NaHCO_3$, 10 D-glucosa, 2,69 KCl, 1,25 KH_2PO_4 2,5 $CaCl_2$, 1,3 $MgSO_4$, y 2,60 $NaHPO_4$) utilizando un Vibratome (Leica VT 1000, Alemania) e incubados en ACSF durante 1 hora a temperatura ambiente. En todos los

experimentos, se añadieron 10 μM de picrotoxina (PTX) para suprimir la inhibición del transmisor $GABA_A$ (Cuitino et al 2010). Los secciones se transfirieron a un recipiente experimental (2 ml), se sobrefundieron (3 ml/min, a 20-22 °C) con ACSF gaseado y se visualizaron mediante transiluminación con un microscopio binocular (MSZ-10, Nikon, Melville, NY). Para evocar potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP), se estimulan con electrodos concéntricos bipolares (Platino/Iridio, 125 μm de diámetro OD, FHC Inc., Bowdoin, ME) generados por un estimulador (Axon 700b, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y conectado a una unidad de aislamiento (Isoflex, AMPI, Jerusalén, Israel). La estimulación estaba en dentro del estrato radial (Stratum Radiatum) de 100-200 μm desde el sitio de registro. El índice de facilitación por pulso pareado se calculó mediante ((R2-R1)/R1), donde R1 y R2 fueron las amplitudes máximas de la primera y la segunda fEPSP, respectivamente. Para generar LTP se utiliza estimulación de ráfaga theta (TBS por sus siglas en inglés) (TBS) que consta de 5 trenes de estímulos con un intervalo entre trenes de 20 s. Cada tren constaba de 10 ráfagas a 5 Hz y cada ráfaga tenía 4 pulsos a 100 Hz. Para generar LTD se utiliza la estimulación de baja frecuencia (LFS) que consiste en 900 pulsos pareados a 1 Hz. Los registros se filtraron a 2,0-3,0 kHz, se tomaron muestras a 4,0 kHz usando un convertidor A/D y se almacenaron con pClamp 10 (dispositivo molecular). Las respuestas postsinápticas provocadas se analizaron en diferido, utilizando un software de análisis (pClampfit, dispositivo molecular), que permitía la detección visual de eventos, calculando solo aquellos eventos que excedían un umbral arbitrario.

Análisis estadístico. Todos los datos se muestran como la media ± SEM, con significación estadística evaluada por la prueba t de Student y ANOVA. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad Software Inc.).

Resultados

ANDRO recupera la memoria espacial en ratones APPswe/PS-1 transgénicos dobles de diferentes edades

Un conjunto de ratones APPswe/PS-1 transgénicos de seis meses y doce meses (Garcia-Alloza et al 2006) se trataron con ANDRO (Figura 1A) durante cuatro semanas. Cuando concluye el tratamiento, se evalúa la función del hipocampo asociada con la memoria espacial mediante una prueba de comportamiento relacionada con el aprendizaje y la memoria (Morris et al 1986). La evidencia previa indica que el déficit cognitivo asociado a la memoria espacial en los ratones APswe/PS-1 jóvenes tiene una alta variabilidad (Toledo e Inestrosa 2010). Por lo tanto, se evalúa el rendimiento de los ratones de 7 meses de edad mediante un paradigma de memoria espacial modificado asociado a la memoria episódica (flexibilidad de la memoria) que demostró ser más sensible a las disfunciones del hipocampo (Chen et al 2000). El análisis del comportamiento del comportamiento indicó que los animales Tg tratados con ANDRO tienen una reducción en el número de ensayos a criterio de aprendizaje (Figura 1B, círculos grises) en comparación con el control Tg (Figura 1B, círculos blancos). Por otro lado, se decide evaluar el efecto de ANDRO en ratones APPswe/PS-1 de 12 meses de edad, en cual se describe como una disminución constante en las funciones cognitivas. En este modelo envejecido, se evalúa el rendimiento de la memoria espacial mediante el clásico Morris Water Maze (MWM). El análisis del comportamiento mostró que los animales Wt inyectados con el vehículo tienen valores de latencia de escape normales durante el entrenamiento (Figura 1C, círculos grises). En contraste, APPswe/PS-1 tuvo los valores más altos de latencia, de acuerdo con la disfunción del hipocampo por los efectos neurotóxicos de A (Toledo e Inestrosa 2010). Sin embargo, APPswe/PS-1 tratado con ANDRO (Figura 1C, círculos negros) presentó valores de latencia de escape significativamente más bajos, similares a los ratones de control (Figura 1C, círculos blancos) que indican que ANDRO pudo reducir el deterioro cognitivo en el rendimiento de la memoria espacial durante la primera y la segunda semana de tratamiento. Estos resultados indican que ANDRO tuvo efectos beneficiosos frente al deterioro cognitivo presente en los ratones APPswe/PS-1, en ratones transgénicos jóvenes y maduros.

ANDRO recupera las funciones sinápticas en los ratones APP/PS1 de diferentes edades

Consistente con la idea de que la mejora de la memoria espacial está asociada con una recuperación de las funciones sinápticas en el hipocampo, se evalúa la plasticidad sináptica de los dos conjuntos de ratones APPswe/PS-1 mediante el análisis de la magnitud de LTP en la transmisión de CA3-CA1 en el hipocampo, que también se correlaciona con el proceso de memoria y aprendizaje (Morris et al 1986; Palop & Mucke 2010; Shankar et al 2008). En los ratones APPswe/PS-1 no tratados, no se observa la inducción de LTP, lo que concuerda con la literatura (Palop & Mucke 2010) (círculos blancos de la Figura 2A). Sin embargo, los dos conjuntos de ratones APP swe/PS-1 tratados con ANDRO tienen la propiedad de inducir una LTP que se mantiene durante 1 h (Figura 2A y B, círculos negros). Estos resultados indican que ANDRO protege la arquitectura sináptica para permitir la inducción del proceso sináptico como LTP en el modelo temprano de EA y, además, recuperar las funciones sinápticas en ratones APPswe/PS-1 de edad madura.

De acuerdo con la evidencia, las proteínas que conforman las estructuras y la función de la transmisión sináptica y la plasticidad disminuyen en los cerebros con EA y se alteran en los modelos transgénicos con EA (Scheff et al 2007; Selkoe 2002; Terry et al 1991; Toledo & Inestrosa 2010). Por lo tanto, se lleva a cabo un análisis de las proteínas sinápticas afectadas en ratones APPswe/PS-1 en hipocampo y corteza mediante inmunotransferencia. Como marcadores pre-sinápticos, se evaluaron los niveles de la proteína sináptica de la vesícula sinaptofisina (SYP) y la proteína de membrana integral asociada a la vesícula sináptica (VAMP). Por otro lado, como marcadores postsinápticos, se evaluaron los niveles de la proteína sináptica del andamiaje Shank, la subunidad del receptor NMDA GluN2B, la subunidad del receptor AMPA GluA2 y la proteína postsináptica de densidad 95 (PSD-95) (Sheng y Kim

2011). Como se esperaba en el hipocampo y la corteza, los ratones APP swe/PS-1 tratados con ANDRO recuperan significativamente las proteínas postsinápticas en ratones jóvenes (Figura 2C), mientras que los niveles totales de proteínas presinápticas SYP y VAMP no se alteraron (Figura 2C). Además, se cuantifican los niveles de proteínas sinápticas en ratones Tg maduros tratados con ANDRO. Se observó un aumento de los niveles de PSD-95 y GluA2 (Figura 2D), lo que indica que en los modelos de neurodegeneración avanzada todavía es posible inducir una recuperación del nivel de ciertas proteínas asociadas al proceso de estructura y transmisión sináptica (Sheng y Kim, 2011). Estas evidencias sugieren que ANDRO previene la pérdida de proteínas postsinápticas en ratones de 7 meses de edad, pero también permite la recuperación de proteínas sinápticas importantes en animales maduros.

ANDRO disminuye las deposiciones de A en ratones jóvenes APPswe/PS-1

Estudios previos sugieren que, en general, los niveles de amiloide están relacionados con el deterioro cognitivo en la EA (Jensen et al 2000). La evidencia reciente sugiere que los oligómeros Aβ causan el deterioro de las funciones sinápticas observadas en pacientes con EA y modelos de ratones (Shankar & Walsh 2009) y que los objetivos para los oligómeros Aβ se encuentran principalmente en la región postsináptica (Lacor et al 2004; Shankar et al 2008; Shankar y Walsh 2009). Con el fin de evaluar si la mejora en el comportamiento de los ratones se correlacionó con un cambio en los marcadores neuropatológicos de la EA, se analiza la acumulación de agregados de Aβ presentes en los cerebros de jóvenes (7 meses de edad) y ancianos (12 meses de edad) 1 tratado con ANDRO.

Encontramos que en la corteza y el hipocampo de ratones APPswe/PS-1 de 7 meses tratados con ANDRO hubo una reducción de las placas amiloides teñidas con Th-S en comparación con los animales no tratados (Figura 3Aa, b y c). Sin embargo, el nivel de oligómeros de Aβ, evaluado por transferencia en ranura con anticuerpo A11, en el hipocampo de ratones APPswe/PS-1 tratados con ANDRO no mostró cambios significativos (Figura 3Ba y b). Estos resultados indican que el tratamiento con ANDRO causa una reducción en la cantidad total de placas de Aβ, pero no en los oligómeros de Aβ (Figura 3Ba, b). También se llevó a cabo un análisis detallado de la distribución del tamaño de la placa. La distribución de tamaños agregados presentada como un gráfico de frecuencia acumulada muestra que los ratones APPswe/PS-1 tratados con ANDRO tienen un cambio en su distribución hacia un tamaño de placa más pequeño (Figura 3C).

Para analizar más a fondo el efecto de ANDRO en las placas amiloides, realizamos un análisis de las diferentes placas amiloides, clasificadas por etapa de maduración según su morfología como sigue (Figura 3D) (Bussiere et al 2004): tipo 1, placas que tienen una apariencia reticular sin núcleo central denso; tipo 2, placas que muestran un núcleo denso rodeado de material fibrilar, en forma de corona (tipo 2a) o irradiando desde el centro (tipo 2b), o carecen de material circundante (tipo 2c). El análisis de las placas de tipo 2a y 2c en el cerebro total (Fig. 3E) de los ratones APPswe/PS-1, tratados con ANDRO, no mostró diferencias significativas con respecto a los controles. Las placas tipo 2b, por otro lado, disminuyeron significativamente en el cerebro de los ratones APPswe/PS-1 tratados con ANDRO. Se observó que la mayoría de las placas inmaduras (tipo 1) aumentan significativamente con el tratamiento con ANDRO, lo que demuestra el efecto del tratamiento con ANDRO en la maduración de las placas amiloides (Figura 3E).

Por otro lado, se lleva a cabo el análisis de agregados de Aβ en ratones APPswe/PS-1 jóvenes. Los ratones transgénicos mostraron niveles importantes de placas amiloides en el hipocampo y la corteza (Figura 3Fa) y la cuantificación del área de acumulación de amiloide se muestra en la Figura 3F (b y c). Los ratones tratados con ANDRO no mostraron cambios en los niveles de depósito de amiloide en el hipocampo o la corteza (Figura 3Fb y c). Además, encontramos que en el hipocampo de los ratones APPswe/PS-1 tratados con ANDRO, los niveles de oligómeros Aβ en el hipocampo (Figura 3Ga yb) no mostraron cambios significativos.

Estos resultados indican que ANDRO no afectó la acumulación de Aβ en el antiguo modelo de ratón APPswe/PS-1, pero disminuyó significativamente los agregados de Aβ en ratones transgénicos jóvenes tratados con ANDRO, lo que sugiere que ANDRO previene la agregación de Aβ en los primeros estados durante el desarrollo de la enfermedad.

La fosforilación de *tau* disminuye después del tratamiento con ANDRO en ambos ratones APPswe/PS-1

Otro sello crítico en EA es la patología *tau* (Mandelkow y Mandelkow 2012) que se caracteriza por la hiperfosforilación de la proteína *tau* que genera la acumulación de filamentos helicoidales pareados y la formación de ovillos neurofibrilares (Mandelkow y Mandelkow 2012). En nuestro modelo, la fosforilación de la proteína *tau* en epítopos de EA se ha descrito en animales viejos (Iqbal et al 1989; Jicha et al 1997) y Aβ induce la manifestación de fosfo-epítopes en la proteína *tau* asociada al daño neuronal (Vincent et al 1994). Se usa inmunotransferencia, medimos residuos de fosforilación de *tau* asociados a EA, que corresponden a Ser-396 - Ser-404 (PHF-1) y al residuo Ser-202 (AT8) (Figura 4A) (Mercken et al 1992). Se encuentra una reducción en los niveles de tau positivo para PHF-1- y AT8 en el hipocampo de ratones APPswe/PS-1 de 6 meses de edad tratados con ANDRO en comparación con APPswe/PS-1 no tratados (Figura 4A y B). De acuerdo con esta idea, los informes indican que el aumento de la fosforilación de *tau* en epítopos de fosforilación específicos que rodean la placa es un signo de daño neuronal inducido por Aβ (Mandelkow y Mandelkow 2012). En consecuencia, se estudia la aparición del epítopo AT8 de tau cerca de las placas Aβ (Figura 4B). A pesar de que la fosforilación de *tau* afecta a diferentes partes del hipocampo y la corteza, se elige evaluar las células positivas para AT8 en un área circular (r ≈ 100 mm) que rodea las placas amiloides (Cancino et al 2008), donde se ha descrito que el citoesqueleto cambia, fosforilación *de tau*, activación de la proteína GFAP y pérdida de sinapsis

(Cancino et al 2008; Selkoe et al 2012). El tratamiento con ANDRO indujo una clara disminución en el número de neuronas AT8 positivas junto a los depósitos de amiloide para la APswe/PS-1 de 6 meses de edad (Figura 4B, b). El análisis del total de células positivas AT8 encontradas fuera del área circular alrededor de las placas en el hipocampo mostró una disminución en el número de estas células mediante el tratamiento con ANDRO (Figura 4c). Estos resultados muestran claramente que ANDRO es capaz de prevenir la fosforilación *de tau*, un evento clave en la patología de la EA.

ANDRO inhibe GSK-3β

La reducción de la fosforilación de los epítopos de los niveles *tau* fosforilada está altamente asociada al papel de GSK-3β (Mandelkow & Mandelkow 2012), la cual es una de las enzimas que también modula los cambios sinápticos por Aβ y que regulan de manera importante el proceso de plasticidad en el hipocampo (Hurtado et al 2012; Peineau et al 2007). De manera similar al experimento anterior donde se evaluó el estado fosforilado de GSK-3β en animales transgénicos tratados con litio (Toledo & Inestrosa 2010), se observó que los secciones de hipocampo tratados con ANDRO inducen una reducción de la forma activa (Tyr-216) y un aumento en los niveles de la forma inactiva de GSK-3β (Ser-9) (Figura 5A). De acuerdo con este resultado, se decide la actividad de GSK-3β en la regulación de ciertas proteínas como β-catenina, una molécula que es fosforilada por GSK-3β y define su degradación. Se observa un aumento en los niveles de β-catenina en los secciones incubados con ANDRO, lo que indica una disminución en la actividad de GSK-3β (Figura 5A). Esta evidencia indica un cambio en el estado de una enzima central, y posiblemente en la regulación de la EA. En consecuencia, la inactivación de la enzima podría alterar la función sináptica y la plasticidad. Por lo tanto, se explora los efectos de ANDRO (5 μM) en la transmisión sináptica basal en las conexiones CA3-CA1 en secciones de hipocampo de animales Wt. Los secciones expuestos a ANDRO durante 30 min aumentaron la amplitud de fEPSP (Figura 5B). Para determinar si este efecto corresponde a un efecto pre o postsináptico, se llevó a cabo la prueba de facilitación de pulso pareada (PPF) (Cerpa et al 2010). Los resultados muestran que ANDRO no aumenta la proporción de PPF (Figura 5B), lo que indica que la respuesta no dependió de los cambios presinápticos y probablemente la respuesta esté mediada por un efecto en la región postsináptica. Además, GSK-3β no tiene un papel central en la inducción de LTP (Peineau et al 2007), por lo tanto, se evalúa si ANDRO podría modular la inducción o el mantenimiento de LTP. No se observa alteración en la inducción o mantenimiento de LTP con la presencia de ANDRO (Figura 5C) que indica una evidencia consistente en la literatura sobre el papel potencial de GSK-3β (Collingridge et al 2010). Esta evidencia sugiere un cambio en el estado de una enzima central con posibles implicaciones en la regulación de la EA.

ANDRO previene la inducción de LTD

Además, el papel de GSK-3β se asocia con un proceso de plasticidad sináptica como el LTD (Bradley et al 2012a; Collingridge et al 2010) donde su activación induce la internalización de los receptores AMPA de la columna sináptica (Peineau et al 2007). Por lo tanto, se explora una posible contribución de ANDRO en la maquinaria de plasticidad sináptica como LTD. Primero, se utiliza el inhibidor selectivo de GSK-3β (6-BIO, 10 nM) y se estudia el papel en la inducción de LTD (Figura 6A). Tenga en cuenta que 6-BIO no forma parte de la presente invención reivindicada.

De acuerdo con las evidencias anteriores, se observa una inhibición completa de la inducción de LTD cuando GSK-3β se inhibe por 6-BIO (Figura 6B).

De acuerdo con las observaciones anteriores, se decide evaluar en la misma condición el efecto de ANDRO sobre la inducción de LTD. Se evaluó en seccionestratadas con ANDRO el cambio en la magnitud de la fEPSP durante la inducción de LTD y se encontró que el LTD se inhibió con la presencia de ANDRO (Figura 6C). El papel potencial de ANDRO directa o indirectamente sobre GSK-3β indica una modulación de la inducción y mantenimiento de LTD. Esta evidencia tiene implicaciones potenciales en el desarrollo de modelos de EA en los que se ha descrito un desequilibrio en la plasticidad sináptica asociada con un aumento de la magnitud de LTD sobre la LTP (Palop y Mucke 2010) y posiblemente ANDRO podría desempeñar un papel en la maquinaria de estos eventos plásticos sinápticos.

Discusión

En el presente estudio, se demuestra que los ratones APPswe/PS-1 jóvenes (7 meses) y maduros (12 meses) tratados con ANDRO recuperaron las capacidades cognitivas y disminuyeron varios marcadores neuropatológicos de la EA. Los efectos neuroprotectores específicos de ANDRO observados en este estudio incluyen: protección de proteínas postsinápticas, reducción de especies oligoméricas Aβ y recuperación de funciones sinápticas como LTP en ratones APPswe/PS-1transgénicos. Además, ANDRO inhibe la inducción de LTD por un mecanismo que podría incluir al menos la inhibición de la actividad de GSK-3β. En conjunto, los datos indican que ANDRO podría tener relevancia terapéutica en la EA.

Otros informes indican los efectos antiinflamatorios de ANDRO (Hidalgo et al 2005; Iruretagoyena et al 2005) que pueden ser un mecanismo adicional responsable de aliviar las alteraciones patológicas tardías observadas en el cerebro de ratones transgénicos, y estos efectos podrían ayudar a proteger papel de ANDRO contra la respuesta neuroinflamatoria desencadenada por las células gliales (Heneka y O'Banion 2007) protegiendo el daño cognitivo observado en el modelo de EA (Pike et al 1995). Además, en pacientes con EA hay evidencia de la etiopatología de los radicales libres (Mercken et al 1992; Smith et al 1996), que desencadenan modificaciones postraduccionales en

diferentes proteínas, incluida la oxidación, glicación y nitrotirosinación, todas modificaciones químicas que estimulan la pérdida. de la función de la proteína, como se describió anteriormente, todos estos efectos son particularmente relevantes en la EA (Miranda et al 2000). Varios estudios informan neuroprotección frente a una citotoxicidad mediada por antioxidantes (Dumont & Beal 2011; Quintanilla et al 2005). Por lo tanto, es posible que ANDRO posea algunas propiedades antioxidantes, que desempeñan un papel en la neuroprotección y prevención de las capacidades cognitivas observadas aquí en los ratones APPswe/PS-1 transgénicos tratados con ANDRO. Sin embargo, el papel potencial de ANDRO en el proceso asociado con el aprendizaje y la memoria observados en el modelo de EA tratado con ANDRO no se había asociado completamente a una respuesta antiinflamatoria o antioxidante que proponía otro mecanismo relacionado posiblemente con la transmisión sináptica y la plasticidad. En este contexto, se decide evaluar el papel sináptico de ANDRO en la transmisión del hipocampo CA3-CA1, encontrando una nueva relevancia de ANDRO en la modulación de la actividad GSK-3β con posibles implicaciones en el desarrollo de la EA en diferentes etapas.

Informes recientes indican que la interacción entre oligómeros Aβ y proteína *tau* podría generar daño y aumentar la muerte celular en el cerebro (Ittner & Gotz 2011). Esta evidencia con respecto a la hipótesis de la cascada de amiloide sugiere que la formación de Aβ es un paso crítico en la conducción de la patogénesis de la EA y que podría coexistir con la acción generada por *tau* aumentando la señal de desregulación en EA (Selkoe et al 2012). Aquí, se demuestra que en ratones APPswe/PS-1 tratados con ANDRO, la fosforilación *tau* en los sitios de PHF-1 y AT-8 se reduce, la función cognitiva se recupera y se revierte la pérdida en la inducción y mantenimiento de LTP en la región CA1 del hipocampo. Sin embargo, no se observa una disminución en el número o tamaño de las placas amiloides en el hipocampo de ratones maduros, lo que indica que las placas estables formadas no están degradadas por ANDRO, y posiblemente el papel de ANDRO podría actuar durante o después de la agregación de Aβ. Además, los informes anteriores indican que el tamaño o el número de placas seniles no se correlacionan con el deterioro cognitivo (Lee et al 2004). Aparentemente, parece que los oligómeros Aβ podrían desempeñar un papel más relevante en la sinaptotoxicidad que alteró el proceso cognitivo (Lacor et al 2004). Sin embargo, se indica una reducción de la especie amiloide en ratones transgénicos de 7 meses de edad, lo que indica que ANDRO podría tener una relevancia terapéutica en la etapa de formación de placa antes de la estabilidad de las placas amiloides durante la edad avanzada del modelo de EA.

Estos resultados sugieren un mecanismo funcional de protección activado por la presencia de ANDRO, y esta propiedad protectora podría explicar su capacidad contra el deterioro cognitivo observado en los ratones APPswe/PS-1. De hecho, muchos estudios han demostrado la contribución de la LTP del hipocampo en la memoria y los fenómenos de aprendizaje, por ejemplo, la inhibición o el bloqueo de las proteínas que participan en el mecanismo, ya que las subunidades AMPAR o NMDAR modulan negativamente la memoria y el comportamiento espacial (Morris et al 1986; Shankar et al. al 2008). En los modelos de EA, el deterioro de la LTP está relacionado con la acumulación de oligómeros Aβ, que desencadenan fallas postsinápticas, pérdida de proteínas sinápticas y, finalmente, una pérdida de memoria espacial y aprendizaje (Haass & Selkoe 2007; Shankar & Walsh 2009). El efecto ANDRO muestra la protección de las proteínas LTP y postsinápticas y este podría ser otro factor relevante en la restauración del deterioro cognitivo en una etapa temprana de la enfermedad. Curiosamente, el tratamiento de ANDRO en diferentes etapas en el modelo EA protege de la reducción de proteínas sinápticas inclusive con la no alteración de los oligómeros Aβ en los ratones transgénicos. Esto podría indicar que la presencia de ANDRO podría tener un efecto potencial en la señalización de los oligómeros Aβ durante los cambios en la transmisión sináptica y la plasticidad.

Los informes indican una ruta relacionada con la cascada generada por oligómeros Aβ que activan proteínas como la caspasa-3, y una ruta no apoptótica que induce la inhibición de Akt1, que a su vez contribuye a la sobre activación de GSK-3β (Hurtado et al. 2012; Jo et al 2011). Estos eventos inducen la internalización de los receptores AMPA de las espinas dendríticas que facilitan la inducción de LTD (Bradley et al 2012b; Jo et al 2011; Peineau et al 2007; Shankar et al 2008), que ocurre antes de la formación de placa y la muerte de las células neuronales. Tales efectos son desencadenados por oligómeros Aβ, que son formas moleculares solubles y tóxicas de Aβ (Cerpa et al 2008; Haass & Selkoe 2007; Mucke & Selkoe 2012; Shankar et al 2008). Estas vías están involucradas en el desarrollo de las fallas sinápticas en los modelos de EA (Palop & Mucke 2010) y el tratamiento con inhibidores o shRNA que bloquean específicamente GSK-3β indujo un fenotipo similar a los descritos para el modelo de EA tratado con ANDRO (Hurtado et al 2012; Jo et al 2011; Peineau et al 2007; Toledo & Inestrosa 2010). Con respecto a los posibles mecanismos por los cuales ANDRO podría ejercer su efecto en el sitio postsináptico, encontramos que ANDRO inhibe el LTD mediante la inactivación de GSK-3β, impidiendo el mecanismo de acción de los oligómeros Aβ. Además, la inhibición de GSK-3β puede implicar la activación de diferentes vías asociadas con la supervivencia y la protección de las neuronas. En este contexto,*Wnt*la señalización se activa después de la inhibición de GSK-3β por el litio y este fenómeno protege contra el deterioro cognitivo (Toledo & Inestrosa 2010). De hecho, mostramos un aumento en los niveles de βcatenina con ANDRO, y estudios recientes de nuestro laboratorio indican que ANDRO induce una fuerte activación de la proteína canónica.*Wnt*Vía de señalización (Tapia-Rojas et al., resultados no publicados). En resumen, hemos identificado un fármaco natural que inhibe GSK-3β y podría estar bloqueando el LTD observado en la región CA1 del hipocampo en presencia de oligómeros Aβ, permitiendo la recuperación de la función cognitiva. La ausencia de medicamentos o tratamientos efectivos disponibles para la EA permite nuevas posibilidades para obtener productos naturales con efectos selectivos en los modelos de EA, lo que podría permitir un enfoque alternativo para obtener nuevas terapias para tratar y prevenir la progresión de enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA.

Ejemplo 2

Andrografólido activa la señalización de Wnt/β-catenina por inhibición directa de GSK-3β en células del hipocampo y estimula la neurogénesis en adultos *en vivo.*

Introducción

La vía de señalización de Wnt/β-catenina regula múltiples procesos biológicos y su disfunción está asociada con varias enfermedades. El uso de compuestos naturales es una estrategia interesante para buscar posibles fármacos que activen esta vía y pueden tener un potencial terapéutico. Aquí se informa que Andrografólido (ANDRO), un componente de*Andrographis paniculata* es un potente activador de la señalización Wnt. ANDRO activa esta vía por un mecanismo que pasa por alto el receptor Wnt e implica la inhibición de GSK-3β. Los análisis *in silico* sugieren que ANDRO interactúa con el bolsillo de unión al sustrato GSK-3β, que se probó demostrando que ANDRO compite por el sitio. después, se evalúa si ANDRO fue capaz de regular un proceso *en vivo* regulado por la vía de señalización Wnt, neurogénesis del hipocampo adulto. El tratamiento de ratones de tipo salvaje de 2 meses de edad con ANDRO durante 4 semanas induce fuertemente la proliferación celular y la generación de neuronas recién nacidas en el giro dentado del hipocampo. En conjunto, los resultados indican que ANDRO es un activador *en vivo* de la vía de señalización de Wnt que podría utilizarse como una estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas a un deterioro de la señalización de Wnt y en condiciones patológicas en las que hay una neurogénesis disminuida.

La glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β) es una enzima descubierta hace unos 30 años. Esta quinasa fosforila los sustratos con una secuencia de reconocimiento Ser/Thr-X-X-X-pSer/pThr, y la acción previa de una quinasa "de cebado" es fundamental para catalizar la fosforilación (Dajani et al, 2001; Frame et al, 2001). La actividad de GSK-3β está regulada por la fosforilación dentro de su dominio amino-terminal; la fosforilación en el residuo Ser-9 inhibe la enzima, mientras que la fosforilación de Tyr-216 dentro de la región del bucle T, modificación que parece ser el resultado de una reacción de autofosforilación, mejoró la actividad de la enzima (Cole et al, 2004; Hughes et al. al, 1993). Aunque GSK-3β se identificó originalmente como una quinasa involucrada en la regulación del metabolismo del glucógeno, ahora se sabe que participa en el control de muchos procesos celulares, incluido el desarrollo embrionario, donde es un componente clave de la vía de señalización de Wnt, así como transcripción génica y función de las células neuronales (Hoeflich et al, 2000; Inestrosa & Arenas, 2010; Jiang et al, 2005; McManus et al, 2005). La ruta Wnt ha sido descrita como una señalización esencial en la adhesión celular y la regulación de la determinación del destino celular durante el desarrollo (Patapoutian y Reichardt, 2000), y en el sistema nervioso participa en la formación del tubo neural y el desarrollo del cerebro medio. La vía de señalización canónica o Wnt/βcatenina se activa mediante la interacción de un ligando Wnt con un miembro receptor de la familia Frizzled (Fz) y el coreceptor LRP5/6 (refs). Esta unión desencadena la fosforilación de Disheveled (Dvl), que a su vez desactiva GSK-3β, un modulador clave de esta vía de señalización (Gao & Chen, 2010). Como resultado, los niveles intracelulares de β-catenina aumentan, lo que permite su importancia al núcleo donde se une a los miembros de la familia de los factores de transcripción del factor de células T/potenciador linfoide de unión (TCF/LEF) y activa la expresión de Wnt genes objetivo (Clevers y Nusse, 2012) que contienen una secuencia de consenso en sus promotores, llamada Wnt Response Element (WRE) (Mosimann et al, 2009). A la inversa, en ausencia de un ligando Wnt, GSK-3β forma un complejo de alto peso molecular que incluye Axin, el componente de la poliposis coli adenomatosa (APC) y la β-catenina, su actividad se activa y fosforila la β-catenina que está dirigida para la ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (Aberle et al, 1997).

La vía de señalización de Wnt tiene roles relevantes en el sistema nervioso adulto (Inestrosa y Arenas, 2010), y la disfunción de esta vía se asocia con varias enfermedades mentales, como la esquizofrenia, los trastornos del estado de ánimo, el autismo y la enfermedad de Alzheimer (EA) (Balu & Lucki, 2009). La neurogénesis es uno de los procesos regulados por la vía de señalización Wnt en el cerebro adulto. La vía Wnt/β-catenina es activa en la zona subgranular (SGZ) del hipocampo (Lie et al, 2005), que es una de las regiones neurogénicas en el cerebro adulto, y regula la proliferación de células progenitoras y la diferenciación neuronal. los*en vivo*El bloqueo de la vía Wnt en el hipocampo redujo la neurogénesis y afectó el aprendizaje y la memoria (Lie 2005; Jessberger).

Se ha descrito una relación negativa entre el envejecimiento y la neurogénesis (Kuhn et al, 1996; Luo et al, 2006; Olariu et al, 2007). Se ha informado de una reducción del 80% en la neurogénesis en el giro dentado de ratones de edad en comparación con adultos jóvenes (Cameron y McKay, 1999; Kuhn et al, 1996; Olariu et al, 2007). Además, se observa una disminución de la neurogénesis en diferentes condiciones patológicas. La proliferación de células madre neurales disminuyó en el hipocampo de pacientes con esquizofrenia, y se ha sugerido que esto puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Reif et al, 2006). El trabajo en modelos de roedores con estados de ánimo deprimidos mostró una supresión de la neurogénesis del hipocampo, mientras que los antidepresivos farmacoterapéuticos elevaron la neurogénesis (Winner et al, 2011). Además, se ha informado una alteración de la neurogénesis en diferentes modelos de ratones transgénicos de EA (Lazarov & Marr, 2010; Marlatt & Lucassen, 2010).

El papel emergente de la señalización de Wnt como un objetivo terapéutico para las enfermedades neurodegenerativas llevó a evaluar posibles fármacos capaces de activar esta vía de señalización. Un componente de la vía de señalización Wnt que podría ser un objetivo interesante para el diseño de nuevas intervenciones terapéuticas es GSK-3β. *Andrographis Paniculata* contiene altas cantidades de andrografólido (ANDRO) (Cheung et al, 2001; Lu et al, 1981; Panossian et al, 2000) y se ha utilizado tradicionalmente como un remedio natural para el

tratamiento del proceso inflamatorio a fin de tratar la laringitis, la diarrea y artritis reumatoide en China, India, Corea y Japón. Sin embargo, poco se sabe acerca de otras dianas farmacológicas relacionadas con sus acciones antiinflamatorias conocidas (Chen et al, 2011; Suebsasana et al, 2009; Xia et al, 2004). En diversos estudios se ha sugerido que ANDRO podría ejercer algunos efectos neuroprotectores. Utilizando un modelo de rata de isquemia cerebral, se observó que ANDRO indujo la supresión de NF-kB y una reducción en la producción de citocinas y factores proinflamatorios (Chan et al, 2010). También se informó que el tratamiento con ANDRO ejerce efectos protectores contra la toxicidad de la nicotina y el estrés oxidativo mitocondrial en diferentes regiones del cerebro (Das et al, 2009). Del mismo modo, ANDRO posee un papel en la actividad antiplaquetaria, que implica la activación de la vía eNOSNO/GMP cíclica, lo que resulta en la inhibición de la PI3 quinasa/Akt-p38 MAPK y PLCy2PKC cascadas (Lu et al, 2011), importantes vías de señalización involucradas en la apoptosis y que podría interferir con la señalización de GSK-3β.

En el presente trabajo, se analizan los efectos de ANDRO en la activación de la señalización Wnt. Los resultados muestran que ANDRO activa la vía Wnt canónica con la consiguiente transcripción de los genes diana Wnt con una cinética diferente a la reportada para el ligando canónico Wnt-3a. Los efectos de ANDRO no fueron reprimidos por la presencia de inhibidores de la señalización de Wnt como dickopf-1 (Dkk-1) y la proteína soluble relacionada con Fz (sFRP), ambos actuando a nivel del receptor. Además, Dvl-3 no se fosforiló por la acción de ANDRO, lo que sugiere una acción posterior del fármaco. Los ensayos de actividad muestran que ANDRO inhibe directamente GSK-3β compitiendo por el sitio de unión al sustrato, como también lo sugiere *in silico* estudios de acoplamiento molecular. Finalmente, el tratamiento *en vivo* con ANDRO indujo la proliferación celular y aumentó la generación de nuevas neuronas en el giro dentado, lo que indica que ANDRO aumenta la neurogénesis en el hipocampo adulto. Estos resultados sugieren que *en vivo* ANDRO estimula la vía de Wnt/β-catenina mediante la inhibición de GSK-3β, lo que indica que este medicamento podría usarse como un tratamiento potencial para enfermedades relacionadas con la disfunción de señalización de Wnt y la enfermedad neurodegenerativa.

Materiales y métodos

Reactivos y anticuerpos. Andrografólido (ANDRO) se obtuvo de Sigma Chem, (St. Louis, MO). El inhibidor de GSK-3β 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO) se adquirió de Sigma (# B1686). Los anticuerpos primarios utilizados fueron el clon de anti-β-actina de ratón AC-15 (A1978 Sigma Aldrich), el anti-GSK-3β pSer-9 de conejo (señalización celular n9336S), el anti-GSK-3β pTyr-216 (BD Biosciences # 612312), GSK-3β total (sc-9166 Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-β-catenina (H-102) (sc-7199 Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-GAPDH (sc-7199 Santa Cruz Biotechnology, Inc)

Preparación del corte.Se prepararon secciones de hipocampo de animales de tipo salvaje de dos meses de edad según los procedimientos estándar (Varela-Nallar et al, 2010). Se cortaron seccionestransversales (250-300 μm) del hipocampo dorsal con líquido cefalorraquídeo artificial frío saturado de oxígeno utilizando un microtomo Vibroslice (VSL, World Precision Instruments, Inc WPI, Sarasota, FL). Una vez obtenidos, las secciones se incubaron en ACSF durante al menos una hora a temperatura ambiente, para estabilizar la actividad. En cada momento durante la disección, seccioneslas secciones de rebanado y experimentación se oxigenaron con un 95% de oxígeno y un 5% de dióxido de carbono.

Cultivo primario de neuronas del hipocampo de rata.Se prepararon cultivos de hipocampo de rata como se describió anteriormente (Arrazola et al, 2009). En el día 3 de cultivo, las células del hipocampo se trataron con 1-b-Darabinofuranosylcytosine 2mM (AraC) durante 24 h para reducir el número de células no neuronales en proliferación. Este método dio como resultado cultivos altamente enriquecidos para neuronas (5% de glía). PCR-ARRAY. El ARN de las neuronas del hipocampo se extrajo utilizando Trizol. La cuantificación y la pureza de las preparaciones de ARN se verificaron mediante absorbancia utilizando Nanodrop ND-2000. Solo se utilizaron preparaciones con una relación de 260/280 nm ≥ 1.8, una relación de 260/230 nm ≥ 1,7 y ningún signo de degradación de ARN, verificada por electroforesis en gel de agarosa con Gel Red TM. El ADN genómico fue degradado. Usando el kit de síntesis de ADNc RT2First-Strand (SuperArray), se transcribió de manera inversa 1 μg de ARN y luego se realizó la PCR en tiempo real agregando el ADNc directamente a la mezcla maestra de PCR, que contiene SYBR Green y ROX. Las mezclas se dividieron en alícuotas en placas de matriz de PCR de 96 pocillos, que perfilan la expresión de 84 genes objetivo de Wnt de rata. La PCR se realizó en ABI StepOnePlus, con 1 ciclo de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Los valores de umbral de ciclo (Ct) se calcularon para todos los genes presentes en la matriz (Schmittgen y Livak, 2008).

Tratamiento de cultivos neuronales. Los cultivos primarios del hipocampo de las neuronas 14 DIV se lavaron dos veces en medio neurobasal y se mantuvieron durante 1 hora. Luego se agregaron ANDRO (10 μM) y 6-BIO (10 nM) a diferentes períodos de tiempo.

Extracción nuclear y citoplasmática. Después de un tratamiento de curso temporal, las neuronas se lavaron con PBS frío y se recogieron en 600 μE de tampón de homogeneización frío (HEPES 10 mM, pH 7,9; MgCl2 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 1 mM). Las células se rompieron por 20 pasadas, de ida y vuelta, a través de una jeringa de 1 ml. Los lisados se centrifugaron durante 6 minutos a 700 g a 4C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó en 100 μl de tampón (HEPES 20 mM pH = 7,9; NaCl 420 mM; MgCl2 1,5 mM; EDTA 0,2 mM; DTT 1 mM; glicerol al 25%) y se centrifugó nuevamente para generar una fracción nuclear. Las fracciones citosólicas se generaron a partir del sobrenadante de 100.000 g para 1 °C a 4 °C. Ambos tampones fueron suplementados con inhibidores de proteasa y serina-fosfatasa.

Las fracciones nuclear y citosólica se sometieron posteriormente a transferencia Western.

Ensayo de luciferasa.Se sembraron células 150 000 HEK293T por triplicado por condición y se mantuvieron durante 24 horas a 37 ºC con 5% de CO_2. Los cultivos se transfectaron con TOPflash o FOPflash (400 ng), que son construcciones de ADN informador de luciferasa de luciérnaga (Millipore), utilizando LipofectAMINE 2000 (Invitrogen). Para controlar la transfección, se incluyó pRL-TK (10 ng) en todas las transfecciones. Se añadió ANDRO (10 µM) o 6-BIO (10 nM) al cultivo 24 h después de la transfección. Después de 24 h, se retiró el medio de las células, se lavó con PBS y se midieron las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla utilizando el sistema de ensayo de indicador doble de luciferasa (Promega) con un luminómetro TURNER DESIGNS modelo TD-2020. Los valores se normalizaron por el valor de renilla del mismo pozo. Para comparar estadísticamente los tratamientos se utilizó ANOVA.

Inmunotransferencia. Las muestras se diseccionaron en hielo y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido o se procesaron, se ha detallado previamente (Inestrosa et al, 2011). Brevemente, los tejidos se homogeneizaron en tampón RIPA (Tris-Cl 10 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 1% y SDS al 1%) suplementado con una mezcla inhibidora de proteasa (PMSF 1 mM, 2 µg/mL de aprotinina, 1 µg/ml de pepstatina y 10 µg/ml de benzamidina) e inhibidores de la fosfatasa (25 mMNaF, Na3VO4 100 mM, EDTA 1 mM y Na4P207 30 mM) utilizando un homogeneizador Potter y luego se pasaron secuencialmente a través de jeringas de diferentes calibre. Las muestras de proteína se centrifugaron a 14000 rpm a 4 °C dos veces durante 15 min. La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce). Las muestras se redisolvieron con un 12% de SDS-PAGE y se redisolvieron con un 10% de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las reacciones se seguieron por incubación con peroxidasa IgG anti-ratón, anti-cabra o anti-conejo conjugada (Pierce, Rockford, IL) y desarrollada utilizando un kit ECL (Western Lightning Plus ECL, PerkinElmer).

Inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación se realizó como se describió anteriormente (Garrido et al, 2002). Brevemente, el hipocampo de ratones de tipo salvaje de dos meses de edad se lisó en un tampón de inmunoprecipitación (HEPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 125 mM, NaF 25 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 al 1%) incluyendo inhibidores de fosfatasa ($NaVO_3$ 1 mM y ácido okadaico 200 nM) y el cóctel de inhibidores de proteasa descrito anteriormente. Se preaclararon 200 µg de proteínas totales de lisado utilizando perlas de proteína G-Sepharosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a 4 °C y luego se incubaron con anticuerpo anti-GSK-3β (Santa Cruz Biotechnology) y nuevas cuentas de proteína G para 4 h a 4 °C. Los inmunocomplejos se sedimentaron finalmente y se lavaron tres veces con tampón de inmunoprecipitación en frío.

Ensayo de actividad de GSK-3β. La IC50 de ANDRO se determinó mediante un ensayo de actividad luminométrico GSK-3β. Este método se ha descrito anteriormente y proporciona valores IC50 comparables a la detección radioactiva (Baki et al, 2007). Brevemente, se probó ANDRO a diferentes concentraciones y se diluyó en tampón de quinasa que contenía concentraciones finales de: Tris 40 mM, pH 7,5; MgCl2 20 mM; 0,1 mg/ml BSA. Se añadió ANDRO diluido a un sustrato peptídico pGS-2 25 µM (Millipore, Billerica, EE. UU.), GSK-3b inmunoprecipitado y ATP 10 µM (Cell Signaling, Boston, EE. UU.) hasta un volumen de ensayo total de 50 µl. La reacción enzimática se detuvo después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente agregando 50 µl de quinasa Glo (Promega, Madison, EE. UU.). La señal luminométrica se dejó estabilizar durante 10 minutos y se midió con un luminómetro TURNER DESIGNS modelo TD-2020.

Acoplamiento molecular. Se generaron 29 confórmeros para andrografólido con el método de búsqueda LowModeMD (campo de fuerza MMFF94x) del entorno operativo molecular (MOE) versión 2010.10 (Chemical Computing Group, Montreal, Canadá) para explorar conformaciones de anillos alternativas. El método LowModeMD emplea simulaciones de dinámica molecular corta que utilizan velocidades con poca energía cinética en los modos vibracionales de alta frecuencia (Labute, 2010). El confórmero de menor energía fue seleccionado para acoplamiento. A continuación, se preparó la estructura cristalina de GSK-3β en complejo con 6-BIO (entrada de PDB 1uv5) (Meijer et al, 2003) para el acoplamiento con MOE. Se agregaron átomos de hidrógeno y el complejo se sometió a minimización de energía restringida (campo de fuerza AMBER99 y modelo de solvatación Born generalizado) hasta que el gradiente RMS cayó por debajo de 0,05 kcal (molÅ) -1. Se eliminaron las moléculas de agua y el ligando cocristalizado 6-BIO. El acoplamiento molecular se realizó con la versión 5.1 de GOLD (Cambridge Crystallographic Data Center, Cambridge, Reino Unido) (Jones & Willett, 1995). Se exploraron los posibles sitios de unión de andrografólido mediante acoplamiento a la proteína completa. Luego, los residuos dentro de 11Å del azufre de Cys-199 se definieron como la bolsa de unión de ATP y los átomos dentro de 12Å de la columna vertebral de nitrógeno de Ser-203 se definieron como la bolsa de unión de sustrato. Se generaron 20 posiciones de acoplamiento con la función de puntuación CHEMPLP y los parámetros de búsqueda automática (200% de eficiencia).

Inmunofluorescencia. Las neuronas del hipocampo se colocaron en un cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de $5x10^4$ células por pozo, como se describió anteriormente (Arrazola et al, 2009; Chacon et al, 2008). Se usó un ratón monoclonal anti-b-catenina. Las células se lavaron extensamente con PBS y luego se incubaron con IgG anti-ratón conjugado con Alexa 488 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se montaron en un medio de montaje y se analizaron en un microscopio láser confocal Carl-Zeiss.

Los animales Los ratones de tipo salvaje C57BC6 de dos meses de edad fueron tratados y manejados de acuerdo con las pautas de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, Baltimore, MD). Los tratamientos se realizaron mediante inyección intraperitoneal (ip) de 2,0 mg/kg de ANDRO y los animales de control de tipo salvaje se inyectaron solo con

solución salina como vehículo.

Perfusión y post-fijación. Los ratones se anestesiaron (100 µg de ketamina + 10 µg de xilazina en 10 µl de solución salina/g) y luego se perfundieron transcardialmente con solución salina, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 0,1 M. Los cerebros se extrajeron e incubaron en PBS-PFA al 4% durante 24 horas a temperatura ambiente, se deshidrataron en sacarosa al 30% y se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis.

Corte de tejidos. Después de la deshidratación, cada cerebro de ratón se seccionó en un criostato en 12 series de secciones coronales seriadas de 40 µm de espesor (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se recogió en PBS enfriado con hielo en placas de múltiples pocillos. Cada conjunto contenía 5-7 secciones que cubrían toda la longitud del hipocampo.

Inmunofluorescencia para Ki67 y Doublecortin (DCX). Las secciones se lavaron con PBS 3 veces durante 5 min y luego se incubaron en solución de bloqueo (suero de burro al 3%, BSA al 3%, Triton X-100 al 0,5% en PBS) durante 4 h. Luego, los tejidos se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: conejo anti-Ki67 (Abcam), conejo anti-DCX (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, EE. UU.), Monoclonal anti-NeuN (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). Después de lavar 3 veces con 0,5% de Triton X-100 PBS, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados Dy Light (Abcam) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los secciones se montaron en secciones recubiertas de gelatina con Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.). Para la cuantificación, las células positivas para Ki67 se contaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Tokio, Japón). Las células se contaron en todas las secciones de un conjunto (consulte la sección de tejido). Las células totales contadas en un conjunto se multiplicaron por el número total de conjuntos para obtener una estimación del número total de células Ki67+ en el hipocampo completo. Para la cuantificación del % de área cubierta por DCX, se realizó el doble etiquetado de DCX/NeuN. El área total de la capa celular granular se estimó como el área positiva para la tinción con NeuN y se estimó el porcentaje de esta área cubierta por la tinción con DCX. Este análisis de imagen se llevó a cabo utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.). Las imágenes mostradas se analizaron mediante microscopía láser confocal (Olympus FV 1000) y se generaron proyecciones z con el software ImageJ.

Análisis estadístico. Todos los datos se muestran como la media ± SEM, con la significación estadística evaluada por ANOVA de una vía con la posterior prueba Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad Software Inc.).

Resultados

ANDRO activa la ruta Wnt/β-catenina en neuronas cultivadas de hipocampo de rata.

Para evaluar si ANDRO es capaz de modular la ruta de Wnt/β-catenina en las neuronas, las neuronas del hipocampo en cultivo se trataron con ANDRO a diferentes concentraciones durante 6 h. Como se muestra en la Figura 7A, ANDRO inhibe GSK-3β según lo indicado por el aumento en la forma inhibida de la enzima (fosfo-Ser-9) y la disminución en la forma activa (fósforo-Tyr-216), que se correlaciona con una acumulación de β-catenina de una manera dependiente de la concentración. La β-catenina es un componente estructural integral de las uniones adherentes basadas en cadherina y un efector clave de la vía Wnt canónica en el núcleo (Valenta et al, 2012). Según se evaluó mediante tinción de inmunofluorescencia, el tratamiento con ANDRO 5 µM durante 6 h aumentó los niveles de β-catenina en neuronas de hipocampo cultivadas *in vitro* a los 14 días (DIV) (Figura 7B). La activación de señalización de Wnt desencadena la estabilización de la β-catenina en el citoplasma y su translocación al núcleo, donde activa la activación transcripcional de los genes diana de Wnt (Nusse, 2012). Se evalúan los niveles citoplásmicos y nucleares de β-catenina en las neuronas tratadas con ANDRO, y observamos una acumulación máxima a las 9 h de tratamiento (Figura 7C y 7D). Curiosamente, la acumulación máxima de β-catenina está precedida por el aumento máximo de la forma inhibida de GSK-3β a las 6 h (Figura 7C). Estos resultados sugieren que ANDRO activa la vía de señalización Wnt/β-catenina canónica.

ANDRO activa la ruta Wnt/β-catenina por un mecanismo independiente de la unión del ligando-receptor.

Los antagonistas de señalización de Wnt pueden inhibir la activación de la vía mediante la unión a los receptores de Wnt o los coreceptores o por interacción directa con los ligandos de Wnt que evitan su acción. La familia Dickkopf (Dkk) de proteínas secretadas actúa como antagonistas de la señalización de Wnt canónica mediante la unión a LRP5/6 y evitando que interactúe con los complejos de Wnt-Frizzled, o mediante la unión a proteínas Kremen que desencadenan la internalización de LRP-5/6 (Caraci et al, 2008; Niehrs, 2006). Otros antagonistas de Wnts son los miembros de la familia sFRPs que antagonizan la señalización de Wnt al unirse directamente a los ligandos de Wnt a través de sus dominios ricos en cisteína N-terminal (CRD), evitando su unión a los receptores Fz (Bovolenta et al, 2008; Mii y Taira, 2011). La incubación con sFRP (Figura 8A) y Dkk-1 (Figura 8B) durante 15 minutos antes del tratamiento con medio acondicionado con ANDRO o Wnt3a 5 µM durante 1 h muestra que estos antagonistas de Wnt son capaces de inhibir la acumulación de β-catenina en la presencia de Wnt3a pero no en presencia de ANDRO, lo que sugiere que el fármaco se dirige a los componentes de los receptores Wnt en sentido descendente.

Para investigar más a fondo esta hipótesis, se evalúa la fosforilación de Dvl-3 cuya fosforilación se desencadena por la unión de un ligando Wnt a receptores Fz y coreceptores (Gao & Chen, 2010). Las secciones de hipocampo se

incubaron con ANDRO durante 1 h y la fosforilación de Dvl se evaluó mediante el cambio de movilidad a través de Western Blot. La figura 8C muestra que, a diferencia de lo que se observó con el tratamiento con Wnt-3a, ANDRO no induce un cambio de movilidad de Dvl-3. Como se esperaba, no se observó ningún cambio de movilidad en Dvl mediante el tratamiento con 6-bromoindirubin3'-oxima (6-BIO), un inhibidor directo y selectivo de GSK-3β competitivo para el sitio de unión de ATP (Figura 7C). En conjunto, estos resultados sugieren que el objetivo de ANDRO responsable de la estabilización de la β-catenina puede ser aguas abajo del Dvl.

El litio y otro compuesto que inhibe la enzima GSK-3β producen un aumento en los niveles de β-catenina intracelular y la consiguiente activación de la vía Wnt/β-catenina (Toledo & Inestrosa, 2010). Para analizar la temporalidad de la estabilización de β-catenina, se expusieron secciones de hipocampo de ratones de tipo salvaje de 2 meses de edad a ANDRO 5 μM, medio acondicionado de ligando Wnt3a o 6-BIO 10 nM, durante diferentes períodos de tiempo hasta 1 h. La Figura 9A muestra que ANDRO y 6-BIO aumentaron los niveles totales de β-catenina a los 15 minutos de tratamiento, mientras que el efecto del ligando canónico Wnt-3a se observó a los 45 minutos. De la misma manera, el aumento en los niveles del GSK3β inactivo fosforilado en Ser-9 (Figura 9B) y la disminución en los niveles del GSK-3β Tyr-216 activo fosforilado (Figura 9C) fue más rápido en ANDRO y 6-BIO Tratamientos en comparación con el tratamiento con Wnt-3a. Estos resultados sugieren que ANDRO activa la vía Wnt canónica mediante un mecanismo diferente al ligando Wnt-3a, y respalda un mecanismo independiente del receptor.

ANDRO induce la transcripción de genes objetivo de Wnt.

La señalización de Wnt culmina con la translocación de β-catenina al núcleo y la activación transcripcional de los genes objetivo de Wnt (Jamieson et al, 2012). La posible capacidad de transactivación del tratamiento con ANDRO se analizó con el sistema informador de luciferasa TOP/FOP. El reportero TOPflash contiene los sitios de unión al ADN de la secuencia de consenso TCF/LEF corriente arriba de un gen reportero de luciferasa, mientras que el FOPflash contiene estos sitios silenciados. El tratamiento con ANDRO y el 6-BIO causaron un aumento significativo en el TOPflash (Figura 10A) pero no en la actividad informadora del FOPflash (Figura 10B), lo que sugiere que ANDRO puede inducir específicamente la transcripción de genes acoplados a WRE. Para estudiar el efecto de ANDRO en la expresión génica, utilizamos una plataforma que contiene numerosos genes diana Wnt expresados en diversos tipos de células de rata. Incubamos neuronas del hipocampo cultivadas con ANDRO o 6-BIO durante 9 h (Figura 10D), el momento de mayor acumulación de β-catenina nuclear por el tratamiento con ANDRO (Figura 7C). De los 86 genes analizados, solo 12 mostraron un cambio. Sorprendentemente, solo 4 de ellos fueron compartidos por ANDRO y 6-BIO, mientras que 3 y 4 genes fueron específicamente modulados por ANDRO y 6-BIO respectivamente (Figuras 10D y 10E). Estos resultados muestran que ANDRO es capaz de inducir la transcripción de genes objetivo de Wnt.

ANDRO inhibe directamente GSK-3β al competir con el sitio de unión al sustrato

Teniendo en cuenta los efectos de ANDRO en los niveles de β-catenina y la activación de los genes diana Wnt, y considerando que el mecanismo parece ser aguas abajo de los receptores y Dvl, evaluamos la posibilidad de que ANDRO pueda inhibir directamente GSK-3β. La búsqueda de inhibidores de GSK-3 es un campo de investigación muy activo tanto para centros académicos como para compañías farmacéuticas, ya que se ha demostrado que GSK-3 tiene roles clave en la regulación de una amplia gama de funciones celulares, así como un objetivo para la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas (Cohen & Goedert, 2004). Para determinar si ANDRO es capaz de inhibir directamente los ensayos de actividad de GSK-3β se realizaron. Se incubó GSK-3β inmunoprecipitado de hipocampo de ratones de tipo salvaje con ATP y péptido pGS-2 sustrato durante 5 minutos, luego se detuvo la reacción y se determinó la actividad de la quinasa en un luminómetro.

La luminiscencia fue directamente proporcional a la concentración de ATP (Figura 14A). La Figura 11A muestra la actividad GSK-3β, sigue una disminución en la actividad luciferasa por el consumo de ATP en presencia de quinasa. En la Figura 11B, GSK-3β se incubó previamente con diferentes concentraciones de ANDRO durante 10 min. El gráfico muestra que ANDRO inhibe la actividad de la quinasa con una constante de inhibición (IC50) de 5.58 μM. Para validar el ensayo de inhibición, calculamos la IC50 para 6-BIO (Figura 14B) que concuerda con la informada previamente (5 nM) (Meijer et al, 2003; Polychronopoulos et al, 2004).

Estudios previos sobre el mecanismo farmacológico de ANDRO y sus conocidas acciones antiinflamatorias demuestran que los conjugados ANDRO covalentemente redujeron la cisteína 62 de p50, evitando así la unión del oligonucleótido NF-κB a p50, inhibiendo la actividad transcripcional nuclear NF-κB y atenuando la inflamación en varios *in vitro* ensayos y *en vivo* modelos (Xia et al, 2004; Yao et al, 2012). Para evaluar si ANDRO es capaz de inhibir GSK-3β por un conjugado covalente con un residuo de cisteína presente en la quinasa, incubamos ANDRO en presencia de DTT 0,5 mM con GSK-3β previo en el ensayo de actividad. Los resultados muestran que la presencia de DTT no afecta la actividad de la quinasa ni evita la inhibición generada por ANDRO (Figura 11C), lo que indica que el mecanismo de ANDRO no implica la formación de un aducto covalente entre una molécula de GSK-3β y una molécula de andro. 6-BIO es un inhibidor de GSK3β potente, reversible y competitivo con ATP, por lo que evaluamos si ANDRO podría inhibir a GSK-3β compitiendo por el sitio de unión de ATP. Calculamos los valores de CI50 de ANDRO en presencia de diferentes concentraciones de ATP (Figura 11D). La IC50 de ANDRO que utiliza diferentes concentraciones de ATP estaba muy cerrada a los 5,58 μM calculados, lo que indica que el mecanismo de inhibición no implica competencia para el sitio de unión de ATP. Para determinar la posibilidad de que ANDRO inhiba GSK-3β compitiendo con el sitio de unión al sustrato, calculamos los valores de CI50 en presencia de diferentes

concentraciones del sustrato (Figura 11E). Hubo un aumento en la CI50 de ANDRO cuando se incrementó la concentración de sustrato, lo que indica que ANDRO es un inhibidor competitivo de GSK-3β que compite por el sitio de unión al sustrato de la enzima.

In silico los análisis sugieren la interacción de ANDRO con el sitio de unión al sustrato GSK-3β

Los resultados de los ensayos de inhibición de GSK-3β son indicativos de un modo competitivo de inhibición (no ATP). Para identificar un sitio de unión potencial de ANDRO, acoplamos el compuesto con el software GOLD a la estructura cristalina tridimensional de GSK-3β. Dos áreas que comprenden el ATP y los sitios de unión al sustrato se identificaron inicialmente como potenciales bolsillos de unión con puntuaciones de acoplamiento comparables para ANDRO (puntuación de ChemPLP del sitio de unión de ATP: 52.5 ± 1.4; puntuación ChemPLP del sitio de unión de sustrato: 51.1 ± 2.2). La interacción con el sitio de unión de ATP parecía poco probable, ya que las poses de acoplamiento predichas no formaban ningún enlace de hidrógeno con la región bisagra de la quinasa, una característica esencial observada en los inhibidores competitivos de ATP conocidos. Sin embargo, las poses de acoplamiento generadas en el sitio de unión del sustrato mostraron interacciones con residuos importantes para la unión del sustrato. En la Figura 12, mostramos una posición representativa de acoplamiento de ANDRO unido al sitio de unión al sustrato de GSK-3β co-cristalizado con el inhibidor competitivo de ATP 6-BIO (entrada de PDB 1uv5). Sin embargo, debido a la flexibilidad estructural, se encontraron varias geometrías de unión de ANDRO adicionales para diferentes conformadores estructurales de GSK-3β. Para tener en cuenta la flexibilidad estructural, acoplamos ANDRO a treinta y siete estructuras cristalinas GSK-3β humanas disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (ver Materiales y Métodos). Los residuos de quinasa contactados en más del 50% de todas las poses de acoplamiento incluyen Phe-67, Leu-88, Gly-90, Val-93, Lys-94, Asn-95, Arg-96 y Gly-202. De estos, Arg-96 junto con Arg-180 y Lys-205 forman un sitio de unión de oxianión cargado positivamente que se sugirió para acomodar la cadena lateral de P + 4 fosfo-Ser/Thr de péptidos de sustrato cebado. Se observaron interacciones con Arg-96 en el 95% de todas las poses de acoplamiento, y en el 16% con Arg-180. El bloqueo del sitio de oxianión podría interferir fácilmente con la fosforilación de sustratos imprimados. La mutación de alanina de Arg-96 abolió la actividad de la quinasa hacia sustratos cebados. Además, Phe-67 (75% de contactos), Asn-95 (96% de contactos) y Gln-89 (23% de contactos) demostraron ser importantes en el reconocimiento de sustratos.*in vitroyen vivo.*La mutación de estos residuos en alanina redujo significativamente la fosforilación de varios sustratos, incluida la β-catenina. El bloqueo de la bolsa de unión forrada por Phe-67, Gln-89, Asn-95 podría impedir el acceso de péptidos de sustrato a la quinasa y, por lo tanto, inhibe la fosforilación del sustrato. En resumen, el análisis *in silico* predijo la interacción de ANDRO con residuos del sitio de unión al sustrato importante para el reconocimiento específico y la fosforilación de los sustratos de GSK-3β.

ANDRO induce la proliferación celular y la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo.

Finalmente, se evalúa el efecto de ANDRO en la neurogénesis del hipocampo como un proceso *en vivo* que está regulado positivamente por la vía de señalización Wnt. El efecto de ANDRO sobre la proliferación celular se evaluó en la SGZ de ratones de 2 meses de edad inyectados i.p. con 2 mg/kg de ANDRO o con solución de vehículo como control (solución salina), 3 veces por semana durante 4 semanas. Se usó la tinción de Ki67 (Figura 13A, paneles de la izquierda) como marcador mitótico (Kee et al, 2002). El tratamiento con ANDRO aumentó significativamente el número total de $Ki67^{+}$células en la SGZ que indican que ANDRO estimula la proliferación celular en el giro dentado. Además del aumento en la proliferación, el tratamiento con ANDRO aumentó la generación de nuevas neuronas según lo determinado mediante un aumento en la densidad de neuronas inmaduras positivas para el marcador neuronal inmaduro DCX (Figura 13B). De hecho, el porcentaje de la capa celular granular cubierta por la tinción con DCX aumentó significativamente en el hipocampo de ratones tratados con ANDRO durante 4 semanas (Figura 13B, gráfico). Curiosamente, las células DCX^{+} muestran una morfología más compleja en los ratones tratados con ANDRO en comparación con los ratones de control (Figura 13B, paneles de la derecha), lo que sugiere que el fármaco también indujo el desarrollo de neuronas recién nacidas. En conjunto, estos hallazgos indican que ANDRO aumenta la neurogénesis en el hipocampo adulto.

Discusión

En este estudio, demostramos que el tratamiento *in vitro* con ANDRO induce la estabilización de la β-catenina e induce los genes diana Wnt por un mecanismo que pasa por alto la unión del ligando/receptor e implica la inhibición directa de GSK-3β que compite con el sitio de unión del sustrato. *En vivo*, el tratamiento con ANDRO aumenta la proliferación y generación de neuronas recién nacidas en el giro dentado del hipocampo de ratones adultos. Estos resultados apuntan a ANDRO como un fármaco potencial para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la disfunción de señalización de Wnt, así como a patologías que implican la neurogénesis en adultos.

ANDRO es un agente anticancerígeno y antiinflamatorio potente aislado de la planta. *Andrographis paniculata.* Se ha informado que es citotóxico frente a diversas líneas celulares de cáncer *in vitro* y también actúa como un potente antiinflamatorio al interferir directamente con la proteína NF-κB (Xia et al, 2004). Aquí se muestra un objetivo nuevo e interesante para ANDRO: la inhibición de GSK-3β. GSK-3 se identificó originalmente en 1980 y está altamente conservada en diversas especies desde levaduras hasta mamíferos (Embi et al, 1980). Los mamíferos expresan dos isoformas GSK-3, α (51kDa) y β (47 kDa), que están codificadas por genes distintos y su aminoácido es idéntico en un 97% dentro de sus dominios catalíticos. Sin embargo, sus secuencias difieren significativamente fuera del dominio de la quinasa (Wada, 2009). A pesar de la especificidad dada por su nombre, es una quinasa reguladora central y

clave en una amplia gama de procesos biológicos y tiene múltiples sustratos como parte de diferentes cascadas de señalización (Grimes y Jope, 2001). Ambas isoformas GSK-3 se expresan de forma ubicua y, aunque ambas isoformas son muy similares en estructura y secuencia, está claro que GSK-3α no puede compensar todos los efectos de GSK-3β, por ejemplo los ratones GSK3β -/- mueren en el útero debido a la apoptosis de los hepatocitos (Hoeflich et al, 2000). Varios estudios han asociado la desregulación de GSK-3β con una serie de trastornos patológicos, que incluyen diabetes mellitus, obesidad, inflamación, trastorno bipolar, enfermedad neurodegenerativa y cáncer (Rayasam et al, 2009; Wada, 2009; Woodgett, 2003).

GSK-3β se implicó por primera vez en la señalización Wnt debido a la inducción de un fenotipo de duplicación del eje ventral dorsal por su forma negativa dominante en embriones de Xenopus laevis (Domínguez et al, 1995; He et al, 1995) que ahora se asocia con Wnt-β Activación de la vía de señalización catenin. Posteriormente, la β-catenina se identificó como un sustrato de GSK-3β y la fosforilación mediada por GSK3 desencadena la desestabilización y degradación de la β-catenina por el proteasoma (Aberle et al, 1997; Yost et al, 1996). Este hallazgo estableció GSK-3β como un componente clave en la cascada de señalización Wnt canónica. Más adelante, se identificaron nuevos papeles para GSK-3β en esta vía de señalización, además de la fosforilación de β-catenina. Entre estos, se estableció que GSK-3β fosforila la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad LRP5 o LRP6 de co-receptor Wnt (Wu y Pan, 2009).

La señalización de Wnt juega un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo y en el hipocampo adulto es un regulador de la estructura y función de la sinapsis (Inestrosa y Arenas, 2010). La desregulación de la vía Wnt se ha implicado en muchas enfermedades humanas, que incluyen diversos tipos de cáncer, fibrosis pulmonar y trastornos esqueléticos (Luo et al, 2007). La señalización Wnt está fuertemente regulada en múltiples niveles celulares, por lo que parece factible modular terapéuticamente la vía en diversos puntos. Teniendo en cuenta el papel fundamental de GSK3β en la cascada de señalización, la actividad de esta enzima ha sido una diana terapéutica muy atractiva, el diseño o descubrimiento de inhibidores altamente específicos y eficientes de GSK-3β que no tengan efectos secundarios, es un atractivo.

Se identifica a ANDRO como un inhibidor de GSK-3β que compite por el sitio de unión al sustrato. Para demostrar la implicación de esta quinasa en un proceso biológico, es necesario que la vía de señalización o el tratamiento de pacientes con alguna patología asociada a hiperactivación posea un inhibidor más selectivo. En la actualidad, se han identificado más de 30 inhibidores de GSK-3 y algunos con valores de CI50 en el rango nanomolar. Sin embargo, los inhibidores más utilizados, como el SB216763 o el 6BIO, compiten por las bolsas de unión a ATP de la enzima. Debido a que GSK-3α y GSK-3β son muy similares estructuralmente, es poco probable que los inhibidores que se dirigen a los sitios de unión a ATP se diferencien entre las dos isoformas. De acuerdo con nuestros resultados, ANDRO puede actuar como un inhibidor selectivo de isoformas debido a que su mecanismo de inhibición implica la competencia por el sitio de unión al sustrato. Sin embargo, se requerirán experimentos adicionales para determinar si ANDRO es un inhibidor específico de isoforma de GSK-3β.

ANDRO indujo la acumulación de β-catenina en las fracciones tanto citoplásmicas como nucleares en las neuronas del hipocampo, lo que sugiere que puede activar la transcripción de los genes objetivo de Wnt, posibilidad que se evaluó en las células HEK293T. Esta línea celular se seleccionó porque estas células: i) tienen una alta tasa de transfección; ii) se han utilizado para el sistema de análisis de indicadores TOPflash (Killick et al, 2001; Hooper et al, 2011); (iii) muestran niveles endógenos de TCP1, LEF1, TCF4 y TCF3 suficientes para la transactivación dependiente de β-catenina (Klymkowsky et al, 1999). ANDRO aumentó el indicador de luciferasa 4 veces, mientras que el efecto de 6-BIO fue casi 6 veces mayor que el control de la condición. Esto sugiere diferentes capacidades de transactivación de estos dos inhibidores de GSK-3β. Además, se observan diferencias en el efecto de estos inhibidores en la expresión de los genes Wnt diana. Curiosamente, un estudio reciente mostró que la inhibición de GSK-3 por dos vías distintas, como la insulina y Wnt3a (mucho más rápido) causa una expresión diferencial de siete genes (Hooper et al, 2011).

En los resultados, después de una corrección de Bonferroni para muestras múltiples, se determinó la regulación negativa del gen Ets2 mediante el tratamiento con ANDRO. Curiosamente, este gen se reguló al alza en el síndrome de Down y en pacientes con EA hasta edad mediana (Coyle et al, 1986) y los estudios de sobreexpresión de este gen en neuronas corticales humanas han determinado una serie de cambios que conducen a la muerte neuronal apoptótica (Helguera et al, 2005). Otro gen que presentó la expresión diferencial inducida por ANDRO y no por 6-BIO es el Cdh-1, que se asocia con la apoptosis neuronal en el hipocampo después de la isquemia cerebral global (Zhang et al, 2011). GSK-3β es un mediador clave de la apoptosis (Turenne y Price, 2001) y, por lo tanto, podría contribuir directamente a la pérdida neuronal en los trastornos neurodegenerativos, por lo que su inhibición es un evento importante que previene la muerte neuronal. Nuestros resultados indican que ANDRO induce la expresión de genes de supervivencia y muestra otro enfoque terapéutico para este compuesto natural.

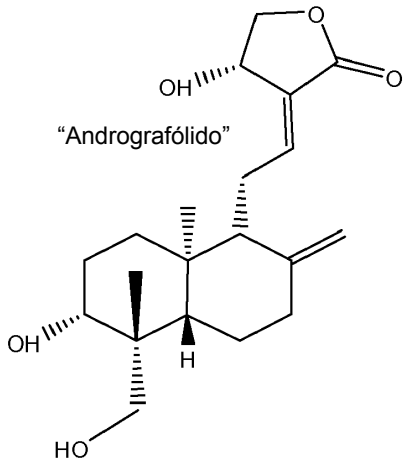
Además, observamos que el tratamiento con ANDRO aumentaba la proliferación celular y la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo. La SGZ del giro dentado es una de las regiones donde hay una generación continua de nuevas neuronas en el cerebro adulto (Gage, 2000). En la SGZ, las células precursoras neurales radiales y no radiales dan lugar a progenitores amplificadores transitorios que generan neuroblastos y después se convierten en neuronas inmaduras que maduran y se integran en el circuito del hipocampo preexistente (vanPraag et al, 2002). Muchas vías de señalización se han identificado como reguladores de este proceso (Ming & Song, 2011; Suh et al, 2009), y Wnts se encuentran entre las moléculas de señalización del nicho que regulan la neurogénesis. Se ha determinado *en vivo*

que el bloqueo de la señalización de Wnt disminuye la neurogénesis del hipocampo adulto mientras que la estimulación de esta vía tiene el efecto opuesto (Lie et al, 2005). Los efectos mediados por Wnt en la neurogénesis son causados por la activación transcripcional de los genes proneurales (Karalay et al, 2011; Kuwabara et al, 2009). Por lo tanto, es probable que ANDRO induzca la proliferación celular y la generación de neuronas recién nacidas en el hipocampo por su efecto inhibidor sobre GSK-3β y la la modulación a consecuencia de de la transcripción del gen objetivo de Wnt. Es importante destacar que el efecto sobre la neurogénesis indica que el tratamiento con ANDRO es eficaz *en vivo.*

En resumen, este estudio muestra que ANDRO es un nuevo inhibidor competitivo de GSK-3β en neuronas que parece no causar efectos secundarios en animales, lo que sugiere que este puede ser un fármaco eficaz para el tratamiento de patologías asociadas a la disfunción de señalización de Wnt como EA.

Andrografólido

Los experimentos murinos utilizaron andrografólido comprado de Sigma-Aldrich Chemical Company.



Andrografólido tiene Registro CAS No. 5508-58-7y el nombre sistemático 3- (2- (Decahidro-6-hidroxi-5- (hidroximetil)-5,8a-dimetil-2-metilenaftil) etiliden) dihidro-4-hidroxifuran-2 (3H) -ona.

Resumen

Nuestra investigación muestra que la andrografólido produce una constelación de distintos cambios anatómicos en el cerebro de un modelo murino para la enfermedad de Alzheimer. Estos cambios anatómicos se correlacionan con distintos cambios de comportamiento: encontramos que el tratamiento con andrografólido permitió que los sujetos de prueba modelo de Alzheimer se desempeñaran tan bien como los sujetos sanos normales en una prueba de natación de aprendizaje y memoria a corto plazo. Encontramos que la andrografólido induce una reducción en el estado activo de la glucógeno sintasa quinasa 3β, bloqueando la depresión a largo plazo en la región CA1 del hipocampo, permitiendo la recuperación de la función cognitiva en un modelo de enfermedad de Alzheimer de diferentes edades.

Si bien las pruebas reales utilizaron andrografólido puro tal como lo vendió Sigma-Aldrich Chemical Co., uno podría usar alternativamente un extracto vegetal que contenga una cantidad efectiva de andrografólido, o cualquiera de las diversas sales farmacéuticamente aceptables de andrografólido.

REIVINDICACIONES

1. Andrografólido para uso en un método para el tratamiento de la demencia de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano en donde se administra andrografólido en una cantidad terapéuticamente eficaz como una dosis oral diaria de 1 a 4 miligramos por kilogramo de peso corporal de un ser humano.

2. Andrografólido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método para el tratamiento de la demencia de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano comprende:

a) administrar a un humano una prueba seleccionada del grupo que consiste en: el Mini Examen de Estado Mental (MMSE), la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer (ADAS), la Prueba de Nombres de Boston (BNT) y la Prueba Token (TT); y después

b) administrar andrografólido a dicho ser humano, durante al menos 30 días, una dosis diaria efectiva para preservar o mejorar la función cognitiva.

3. Andrografólido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde se proporciona andrografólido en una cantidad terapéuticamente eficaz.

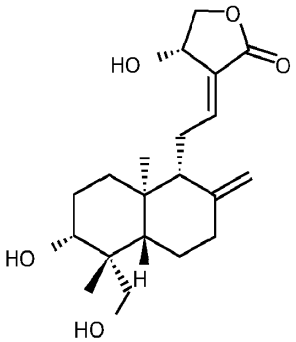
4. Andrografólido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se proporciona andrografólido como un extracto de *Andrographis paniculata,* normalizado para contener no menos del 50% (p/p) de andrografólido.

5. Andrografólido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el andrografólido es andrografólido puro.

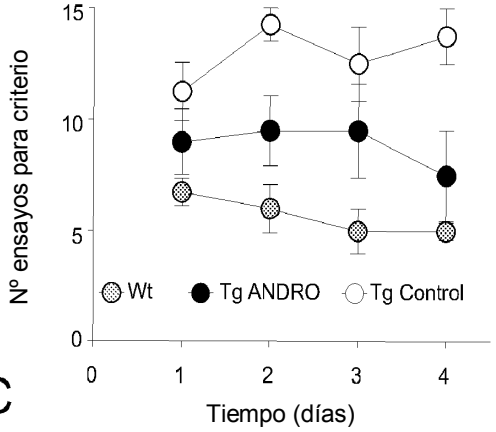
Figura 1

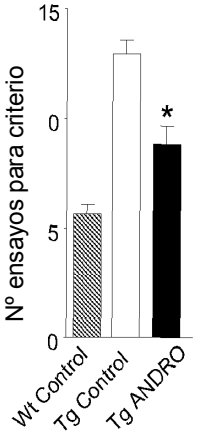
A

Andrographis paniculata


HO
O
O
HO
H
HO

B


Nº ensayos para criterio
15
10
5
0
Wt
Tg ANDRO
Tg Control
0
1
2
3
4
Tiempo (días)


Nº ensayos para criterio
15
0
5
0
*
Wt Control
Tg Control
Tg ANDRO

C

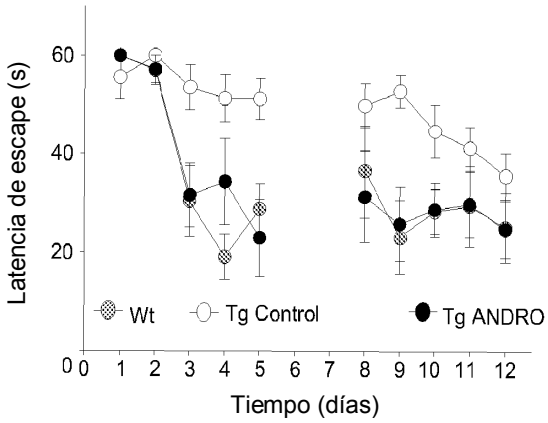

Latencia de escape (s)
60
40
20
0
Wt
Tg Control
Tg ANDRO
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Tiempo (días)

Figura 2

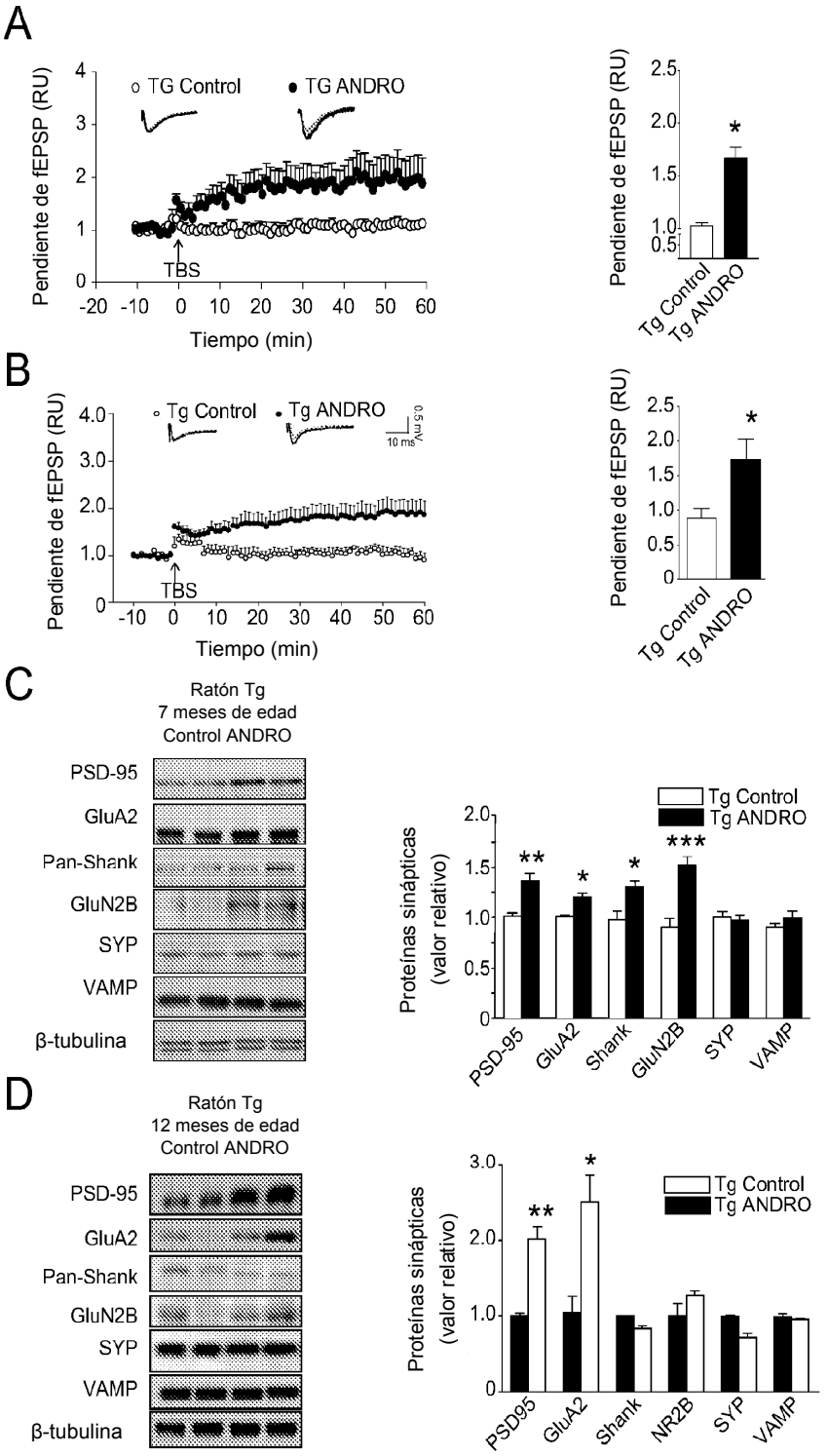

A
TG Control
TG ANDRO
Pendiente de fEPSP (RU)
TBS
Tiempo (min)
Tg Control
Tg ANDRO
B
Tg Control
Tg ANDRO
0.5 mV
10 ms
C
Ratón Tg
7 meses de edad
Control ANDRO
PSD-95
GluA2
Pan-Shank
GluN2B
SYP
VAMP
β-tubulina
Proteínas sinápticas
(valor relativo)
PSD-95
GluA2
Shank
GluN2B
SYP
VAMP
D
Ratón Tg
12 meses de edad
Control ANDRO
PSD95
GluA2
Shank
NR2B
SYP
VAMP

Figura 3

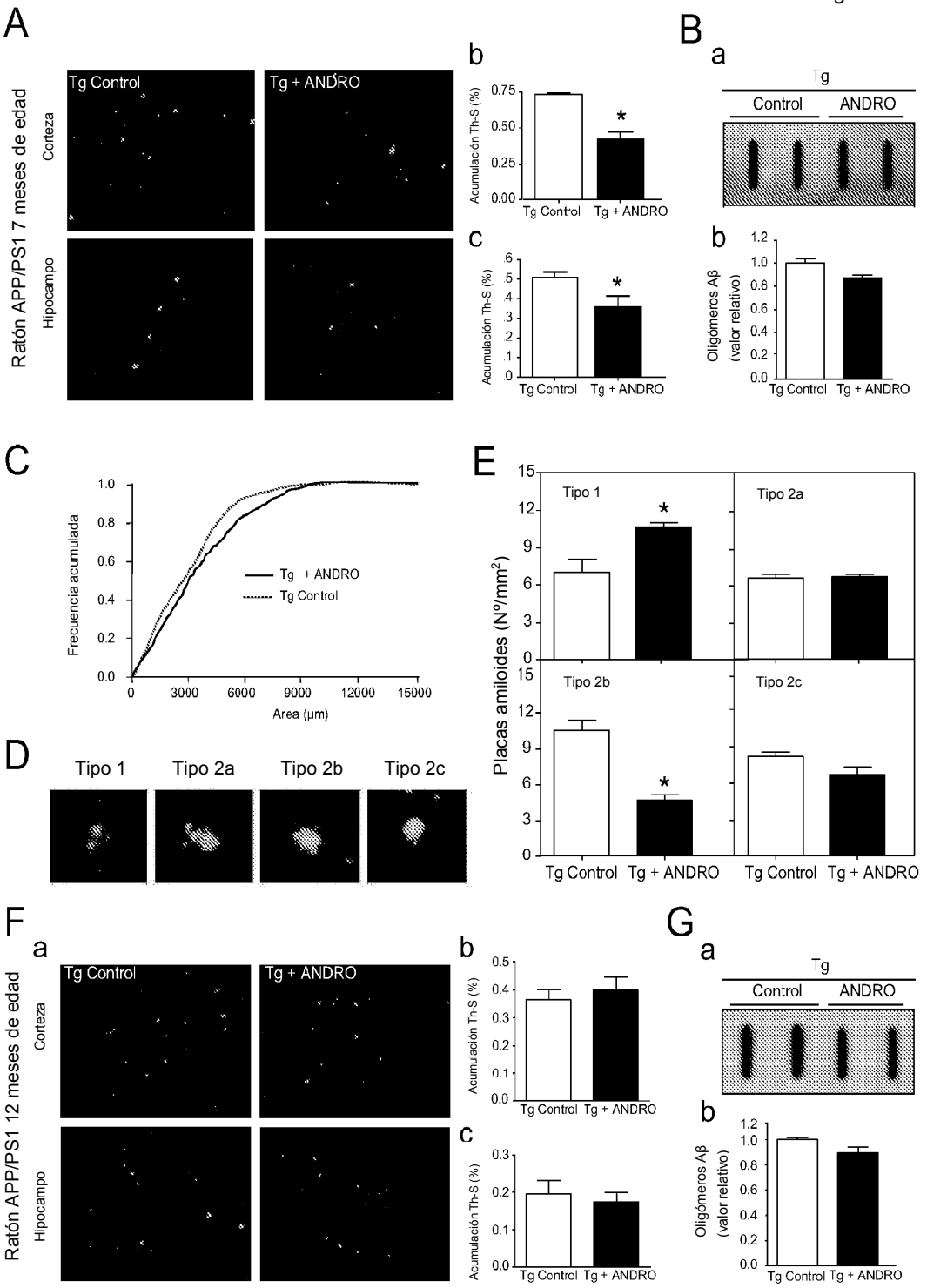

A
Ratón APP/PS1 7 meses de edad
Corteza
Hipocampo
Tg Control
Tg + ANDRO
b
Acumulación Th-S (%)
Tg Control
Tg + ANDRO
c
Acumulación Th-S (%)
B
a
Tg
Control
ANDRO
b
Oligómeros Aβ (valor relativo)
C
Frecuencia acumulada
Tg + ANDRO
Tg Control
Area (µm)
D
Tipo 1
Tipo 2a
Tipo 2b
Tipo 2c
E
Placas amiloides (Nº/mm²)
Tipo 1
Tipo 2a
Tipo 2b
Tipo 2c
F
a
Ratón APP/PS1 12 meses de edad
Corteza
Hipocampo
Tg Control
Tg + ANDRO
b
Acumulación Th-S (%)
c
Acumulación Th-S (%)
G
a
Tg
Control
ANDRO
b
Oligómeros Aβ (valor relativo)

Figura 4

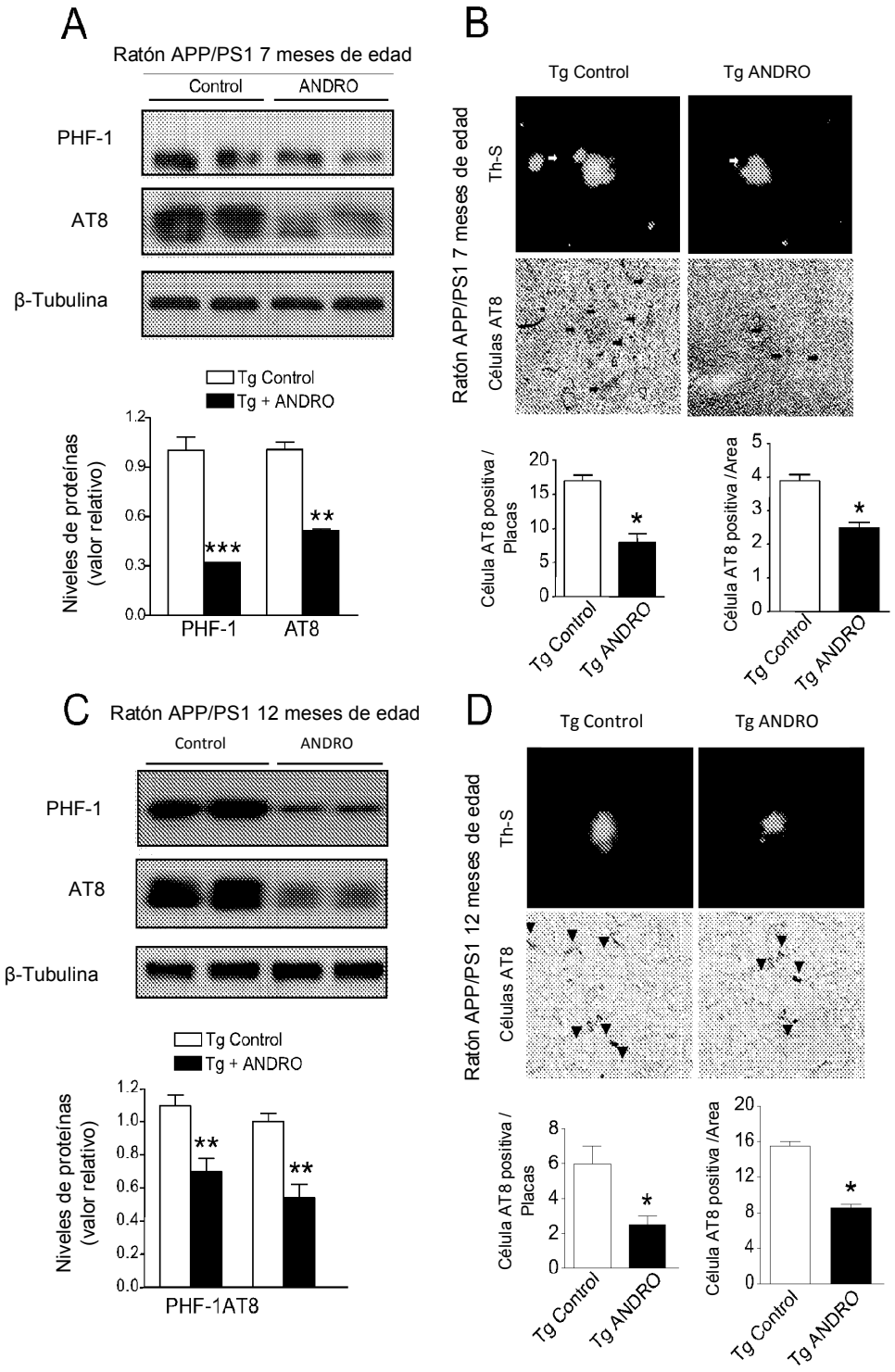
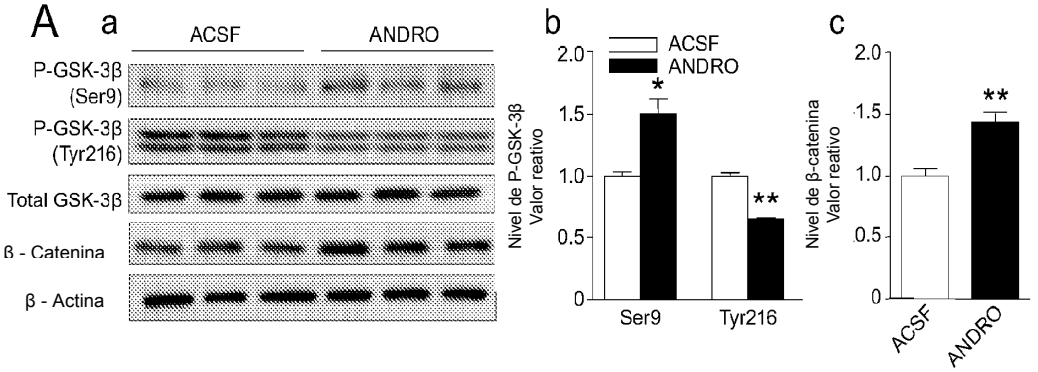
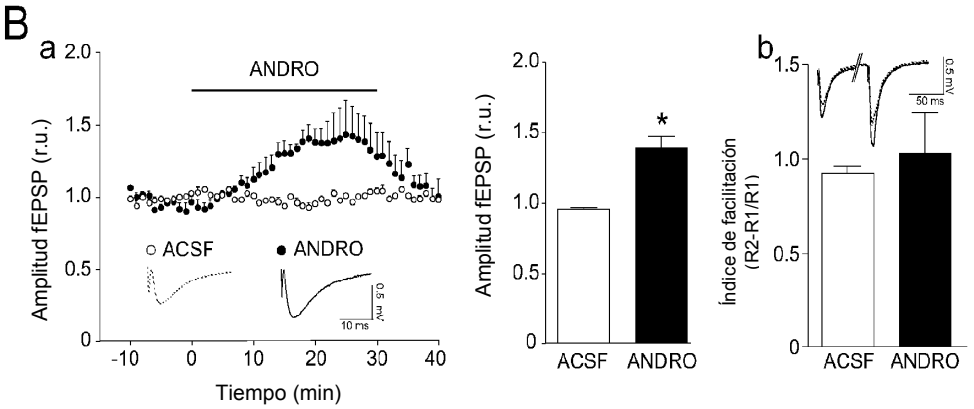

A
Ratón APP/PS1 7 meses de edad
Control
ANDRO
PHF-1
AT8
β-Tubulina
Tg Control
Tg + ANDRO
Niveles de proteínas (valor relativo)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
***
**
PHF-1
AT8
B
Tg Control
Tg ANDRO
Ratón APP/PS1 7 meses de edad
Th-S
Células AT8
Célula AT8 positiva / Placas
20
15
10
5
0
*
Tg Control
Tg ANDRO
Célula AT8 positiva /Area
5
4
3
2
1
0
*
Tg Control
Tg ANDRO
C
Ratón APP/PS1 12 meses de edad
Control
ANDRO
PHF-1
AT8
β-Tubulina
Tg Control
Tg + ANDRO
Niveles de proteínas (valor relativo)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
PHF-1AT8
D
Tg Control
Tg ANDRO
Ratón APP/PS1 12 meses de edad
Th-S
Células AT8
Célula AT8 positiva / Placas
8
6
4
2
0
*
Tg Control
Tg ANDRO
Célula AT8 positiva /Area
20
16
12
8
4
0
*
Tg Control
Tg ANDRO

Figura 5


A
a
ACSF
ANDRO
P-GSK-3β (Ser9)
P-GSK-3β (Tyr216)
Total GSK-3β
β - Catenina
β - Actina
b
ACSF
ANDRO
Nivel de P-GSK-3β Valor reativo
Ser9
Tyr216
c
Nivel de β-catenina Valor reativo
ACSF
ANDRO


B
a
ANDRO
Amplitud fEPSP (r.u.)
ACSF
ANDRO
10 ms
0.5 mV
Tiempo (min)
b
Índice de facilitación (R2-R1/R1)
50 ms
0.5 mV
ACSF
ANDRO

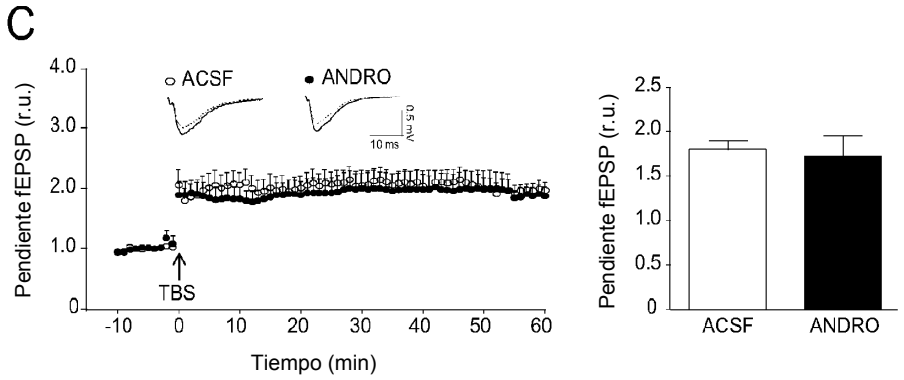

C
Pendiente fEPSP (r.u.)
ACSF
ANDRO
10 ms
0.5 mV
TBS
Tiempo (min)
ACSF
ANDRO

Figura 6

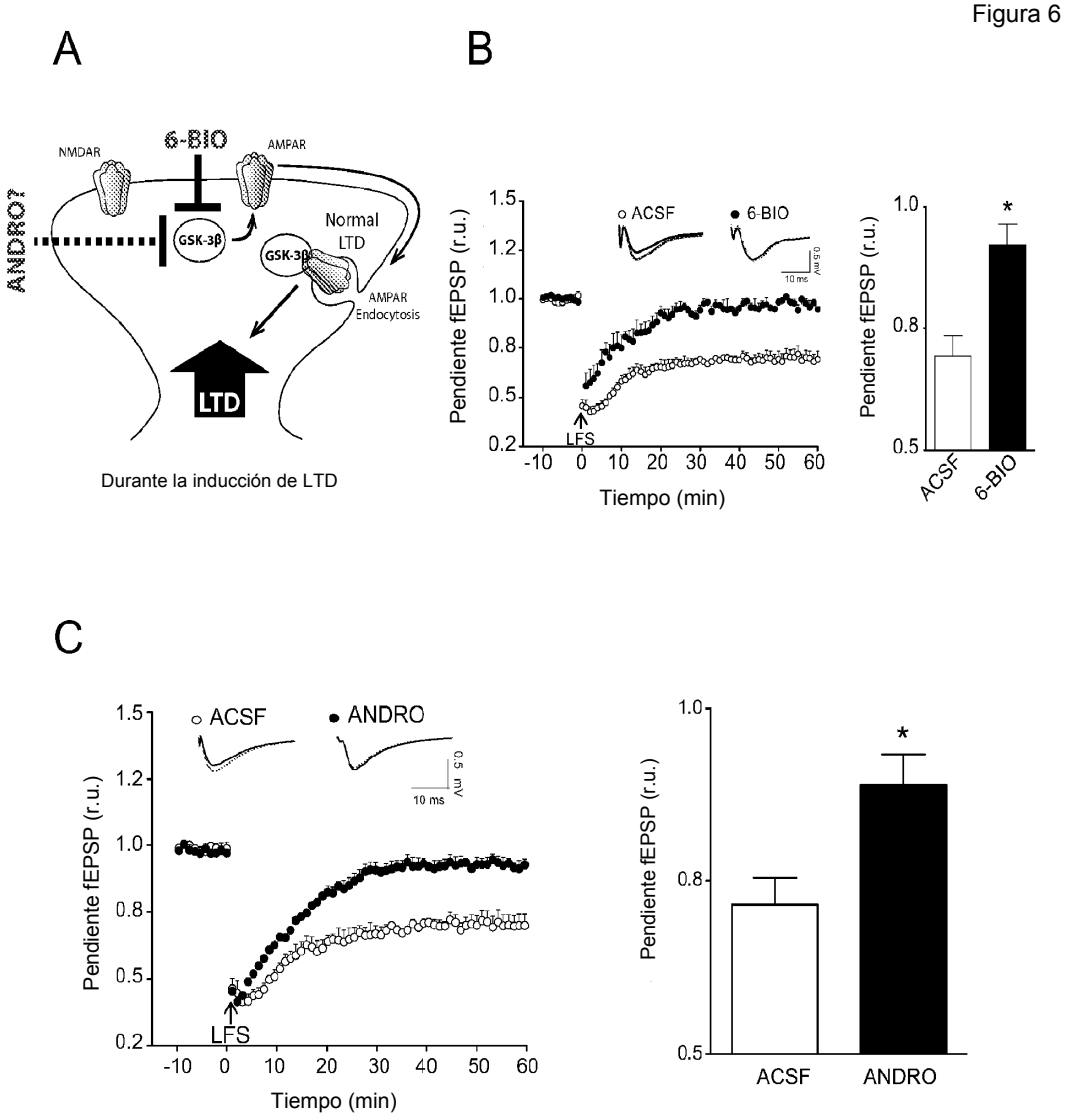

A
B
C
NMDAR
6-BIO
AMPAR
ANDRO?
GSK-3β
Normal LTD
AMPAR Endocytosis
LTD
Durante la inducción de LTD
ACSF
6-BIO
Pendiente fEPSP (r.u.)
Tiempo (min)
LFS
0.5 mV
10 ms
ANDRO
*

Figura 7

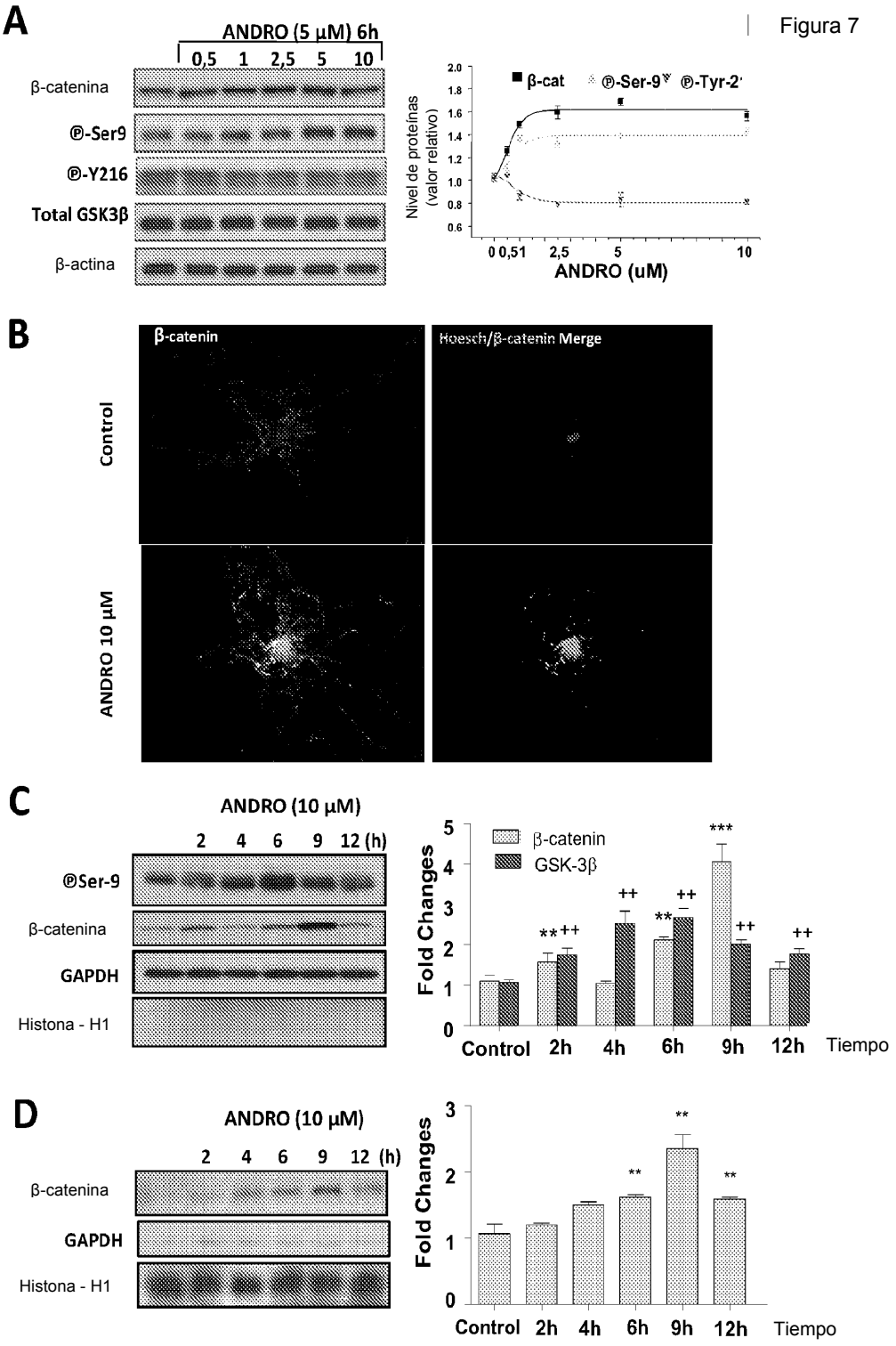

A
ANDRO (5 µM) 6h
0,5 1 2,5 5 10
β-catenina
Ⓟ-Ser9
Ⓟ-Y216
Total GSK3β
β-actina
β-cat
Ⓟ-Ser-9
Ⓟ-Tyr-2
Nivel de proteínas (valor relativo)
ANDRO (uM)
B
β-catenin
Hoesch/β-catenin Merge
Control
ANDRO 10 µM
C
ANDRO (10 µM)
2 4 6 9 12 (h)
Ⓟ-Ser-9
β-catenina
GAPDH
Histona - H1
β-catenin
GSK-3β
Fold Changes
Control 2h 4h 6h 9h 12h Tiempo
D
ANDRO (10 µM)
2 4 6 9 12 (h)
β-catenina
GAPDH
Histona - H1
Fold Changes
Control 2h 4h 6h 9h 12h Tiempo

Figura 8

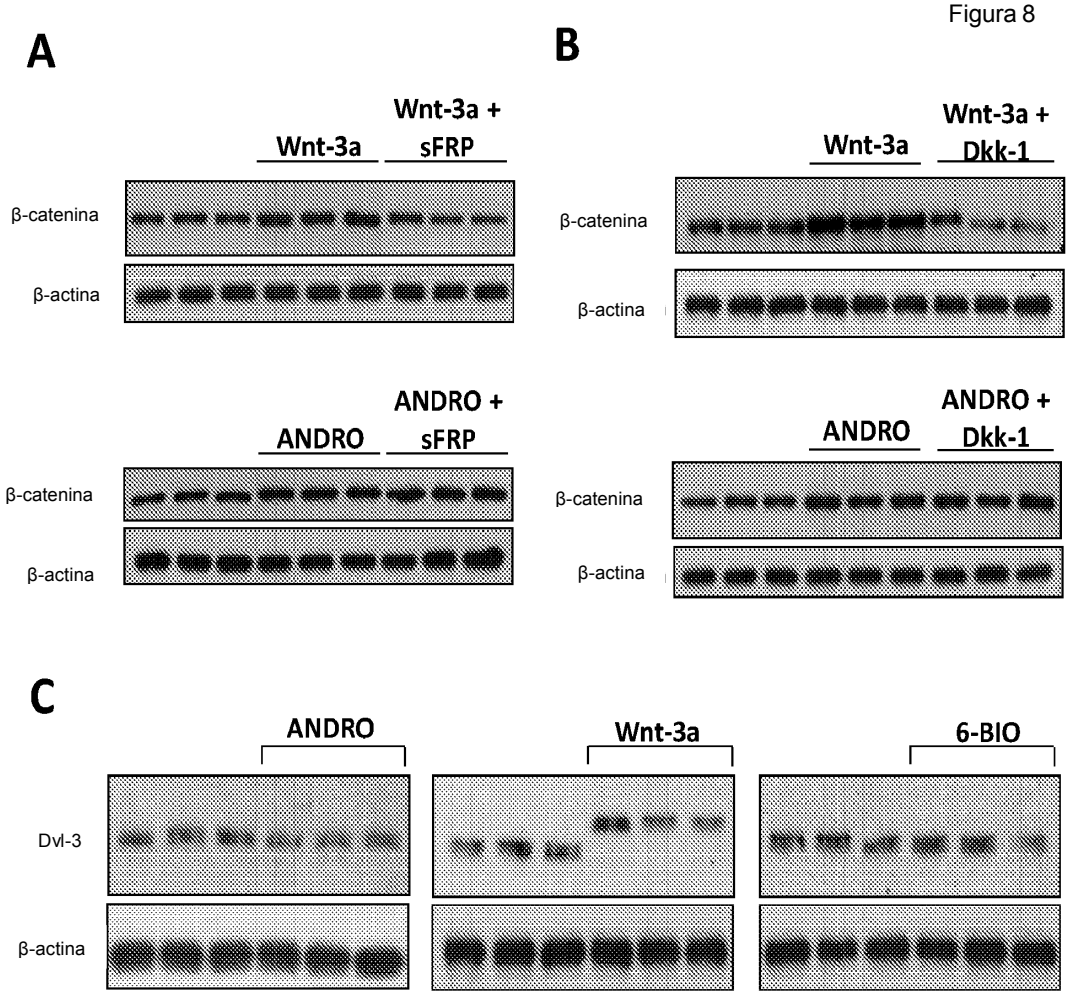

A
Wnt-3a
Wnt-3a + sFRP
β-catenina
β-actina
ANDRO
ANDRO + sFRP
β-catenina
β-actina
B
Wnt-3a
Wnt-3a + Dkk-1
β-catenina
β-actina
ANDRO
ANDRO + Dkk-1
β-catenina
β-actina
C
ANDRO
Wnt-3a
6-BIO
Dvl-3
β-actina

Figura 9

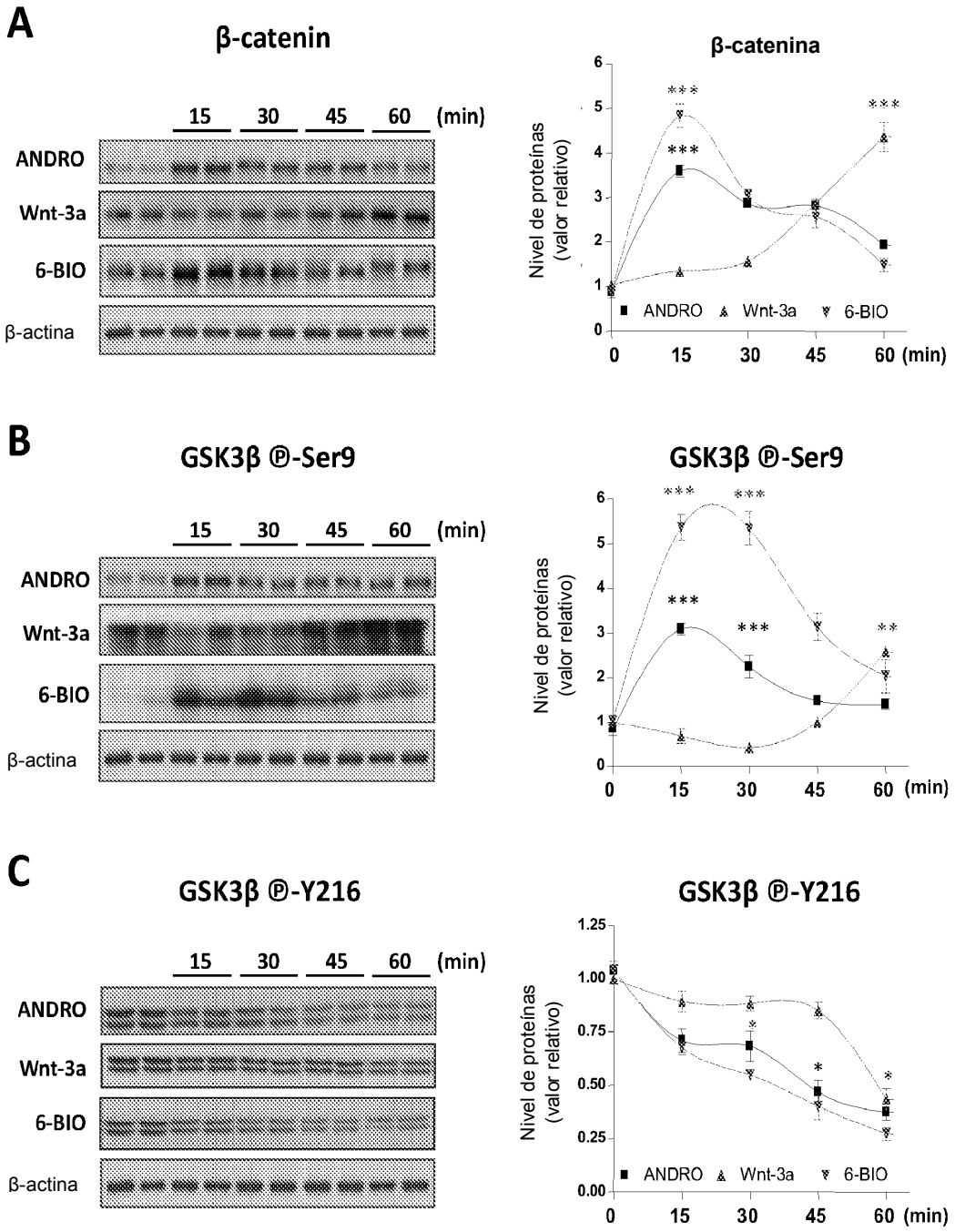

A
β-catenin
15 30 45 60 (min)
ANDRO
Wnt-3a
6-BIO
β-actina
β-catenina
Nivel de proteínas (valor relativo)
ANDRO Wnt-3a 6-BIO
0 15 30 45 60 (min)
B
GSK3β Ⓟ-Ser9
15 30 45 60 (min)
ANDRO
Wnt-3a
6-BIO
β-actina
GSK3β Ⓟ-Ser9
Nivel de proteínas (valor relativo)
0 15 30 45 60 (min)
C
GSK3β Ⓟ-Y216
15 30 45 60 (min)
ANDRO
Wnt-3a
6-BIO
β-actina
GSK3β Ⓟ-Y216
Nivel de proteínas (valor relativo)
ANDRO Wnt-3a 6-BIO
0 15 30 45 60 (min)

Figura 10

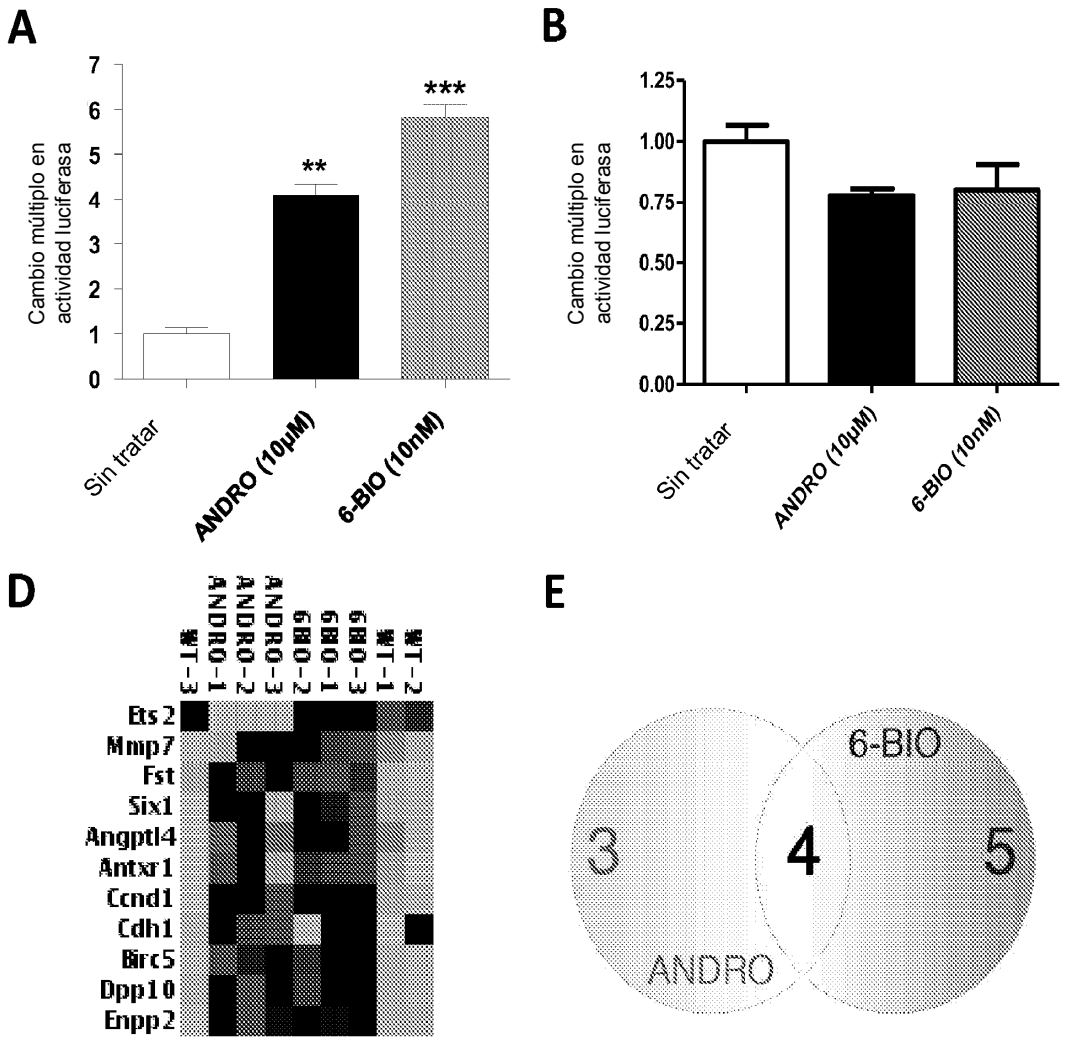

A
Cambio múltiplo en actividad luciferasa
0
1
2
3
4
5
6
7
**
***
Sin tratar
ANDRO (10μM)
6-BIO (10nM)
B
Cambio múltiplo en actividad luciferasa
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
Sin tratar
ANDRO (10μM)
6-BIO (10nM)
D
WT-3
ANDRO-1
ANDRO-2
ANDRO-3
6BO-2
6BO-1
6BO-3
WT-1
WT-2
Ets2
Mmp7
Fst
Six1
Angptl4
Antxr1
Ccnd1
Cdh1
Birc5
Dpp10
Enpp2
E
6-BIO
3
4
5
ANDRO

Figura 11

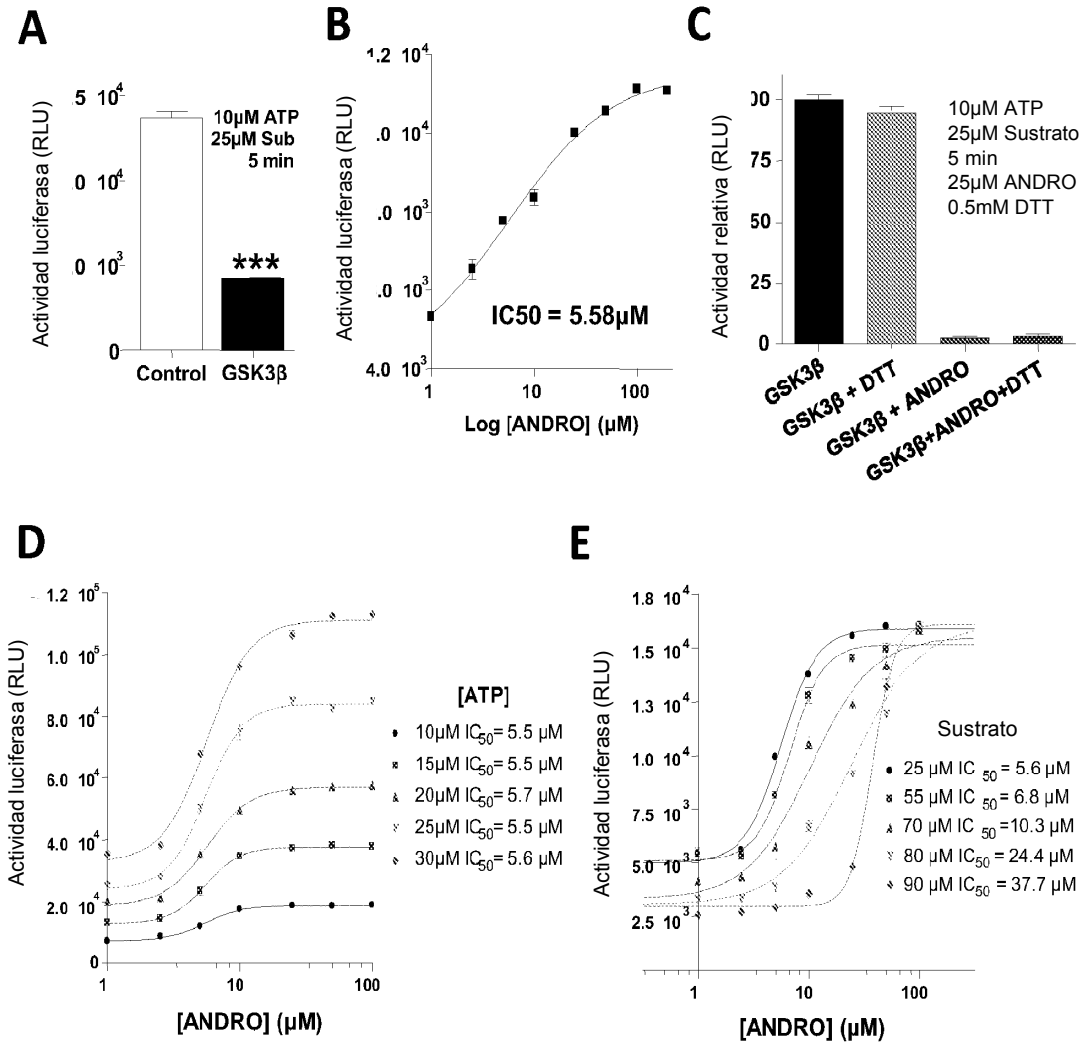
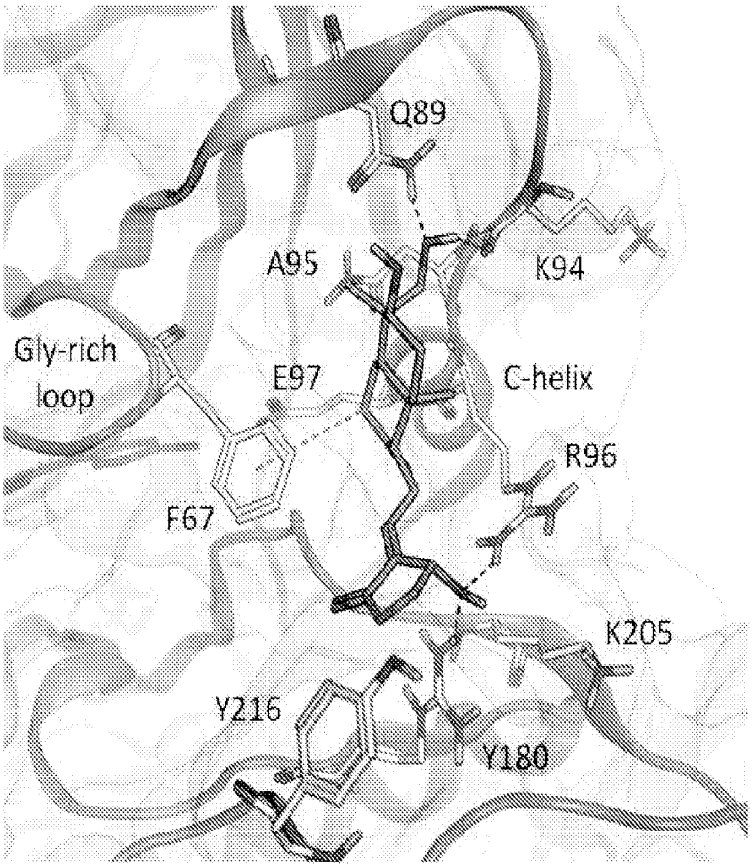

A
Actividad luciferasa (RLU)
10μM ATP
25μM Sub
5 min
***
Control
GSK3β
B
Actividad luciferasa (RLU)
IC50 = 5.58μM
Log [ANDRO] (μM)
C
Actividad relativa (RLU)
10μM ATP
25μM Sustrato
5 min
25μM ANDRO
0.5mM DTT
GSK3β
GSK3β + DTT
GSK3β + ANDRO
GSK3β+ANDRO+DTT
D
Actividad luciferasa (RLU)
[ATP]
10μM IC50= 5.5 μM
15μM IC50= 5.5 μM
20μM IC50= 5.7 μM
25μM IC50= 5.5 μM
30μM IC50= 5.6 μM
[ANDRO] (μM)
E
Actividad luciferasa (RLU)
Sustrato
25 μM IC 50 = 5.6 μM
55 μM IC 50 = 6.8 μM
70 μM IC 50 =10.3 μM
80 μM IC50 = 24.4 μM
90 μM IC50 = 37.7 μM
[ANDRO] (μM)

Figura 12

A


Q89
A95
K94
Gly-rich
loop
E97
C-helix
R96
F67
K205
Y216
Y180

B

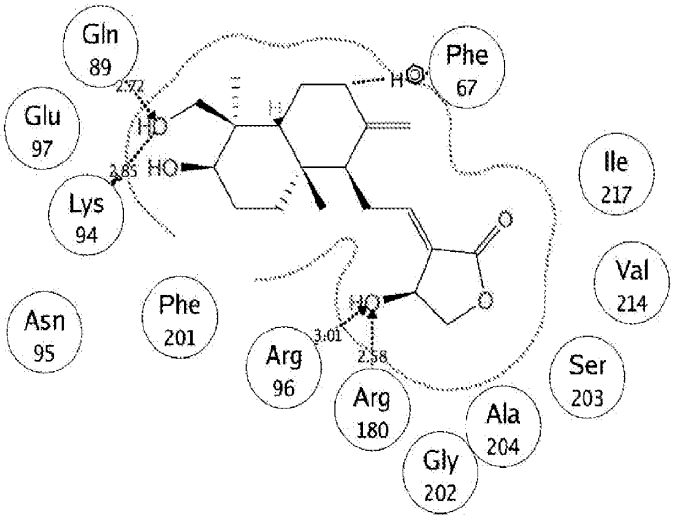

Gln
89
Phe
67
Glu
97
Lys
94
Ile
217
Val
214
Asn
95
Phe
201
Arg
96
Arg
180
Ser
203
Ala
204
Gly
202

Figura 13

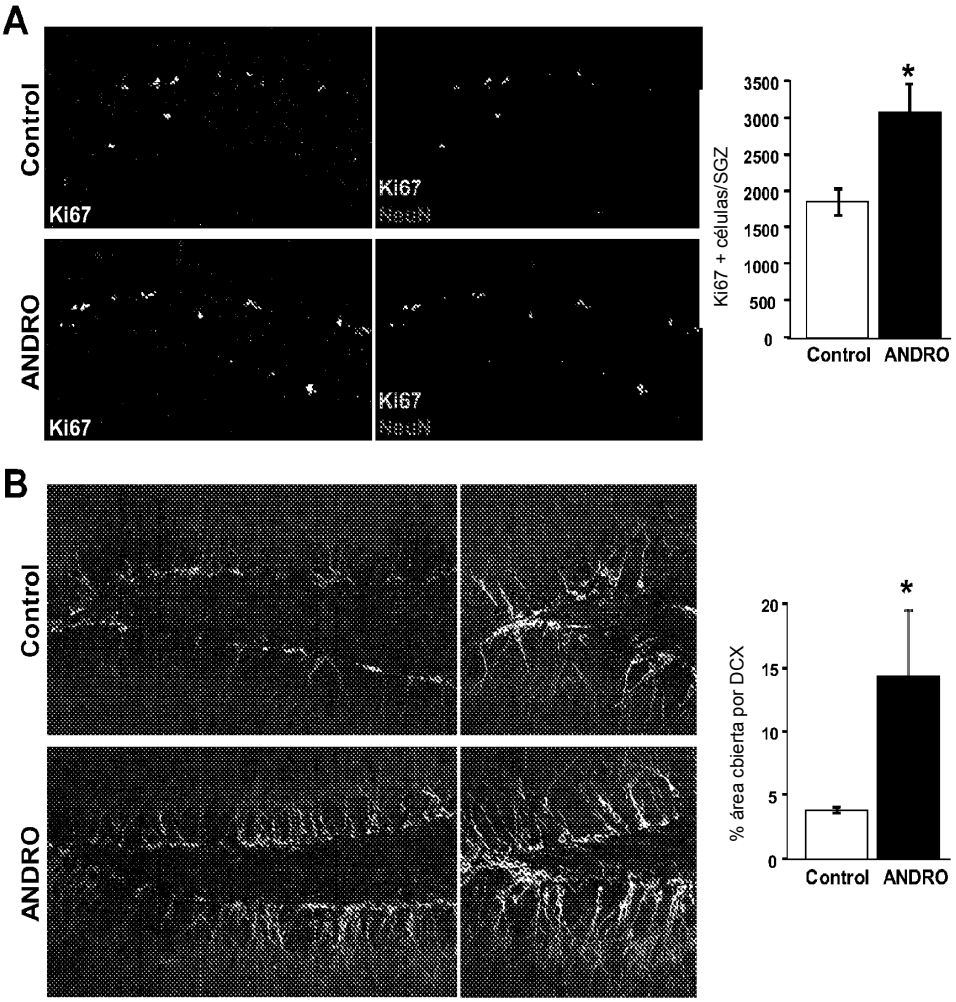
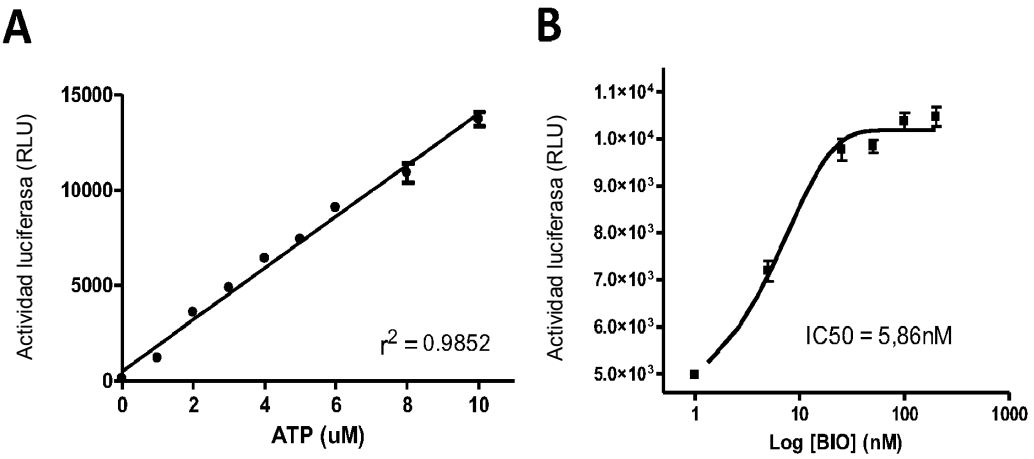

A
Control
ANDRO
Ki67
Ki67
NeuN
Ki67
Ki67
NeuN
Ki67 + células/SGZ
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
*
Control
ANDRO
B
Control
ANDRO
% área cbierta por DCX
20
15
10
5
0
*
Control
ANDRO

Figura 14


A
Actividad luciferasa (RLU)
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
ATP (uM)
r2 = 0.9852
B
Actividad luciferasa (RLU)
1.1×10⁴
1.0×10⁴
9.0×10³
8.0×10³
7.0×10³
6.0×10³
5.0×10³
1
10
100
1000
Log [BIO] (nM)
IC50 = 5,86nM