

SEMINARIO DE JACC: ENVEJECIMIENTO VASCULAR

# El tratamiento con dabigatrán a largo plazo retrasa la patogenia de la enfermedad de Alzheimer en el modelo de ratón TgCRND8



Marta Cortés-Canteli, PhD,<sup>a,b</sup> Anna Kruyer, PhD,<sup>b</sup> Irene Fernández-Nueda, RT,<sup>a</sup> Ana Marcos-Díaz, RT,<sup>a</sup> Carlos Cerón, MB,<sup>a</sup> Allison T. Richards, BA,<sup>b</sup> Odella C. Jno-Charles, MB,<sup>b</sup> Ignacio Rodríguez, PhD,<sup>a,c</sup> Sergio Callejas, PhD,<sup>a</sup> Erin H. Norris, PhD,<sup>b</sup> Javier Sánchez-González, PhD,<sup>d</sup> Jesús Ruíz-Cabello, PhD,<sup>a,c,e,f,g</sup> Borja Ibañez, MD, PhD,<sup>a,h,i</sup> Sidney Strickland, PhD,<sup>b,\*</sup> Valentín Fuster, MD, PhD<sup>a,j,\*</sup>

## RESUMEN

**ANTECEDENTES** La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo multifactorial con importantes alteraciones vasculares y hemostáticas que deben tenerse en cuenta durante el diagnóstico y el tratamiento.

**OBJETIVOS** Este estudio evalúa si la anticoagulación con dabigatrán, un inhibidor directo de la trombina, de administración oral, autorizado para el uso clínico, con un riesgo bajo de hemorragia intracerebral, mejora la patogenia de la EA en un modelo de EA en ratón transgénico.

**MÉTODOS** Se trataron ratones con EA TgCRND8 y ratones de las mismas camadas de tipo natural (*wild*) durante 1 año con dabigatrán etexilato o con un placebo. Se evaluó la capacidad cognitiva con el empleo del laberinto de Barnes, y se examinó la perfusión cerebral con marcaje de espín arterial. A nivel molecular, se realizaron análisis de inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) y análisis histoquímicos para analizar el contenido de fibrina, la carga de amiloide, la actividad neuroinflamatoria y la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE).

**RESULTADOS** La anticoagulación con dabigatrán previno la disminución de la memoria, la hipoperfusión cerebral y el depósito tóxico de fibrina en el cerebro de los ratones con EA. Además, el tratamiento con dabigatrán a largo plazo redujo significativamente la extensión de las placas de amiloide, los oligómeros, la microglía fagocitaria y los linfocitos T infiltrados en un 23,7%, 51,8%, 31,3% y 32,2%, respectivamente. La anticoagulación con dabigatrán previno también la astrogliosis y las alteraciones de los pericitos asociadas a la EA y mantuvo la expresión del canal de agua de acuaporina-4 en los podocitos perivascuales astrocitarios de la BHE.

**CONCLUSIONES** La anticoagulación a largo plazo con dabigatrán inhibió la trombina y la formación de trombos oclusivos en la EA; preservó la capacidad cognitiva, la perfusión cerebral y la función de la BHE; y redujo la neuroinflamación y el depósito de amiloide en ratones con EA. Nuestros resultados abren un campo para la futura investigación sobre la posibilidad de que el uso de anticoagulantes orales directos tenga valor terapéutico en la EA. (J Am Coll Cardiol 2019;74:1910–23) © 2019 Los autores. Publicado por Elsevier en nombre de la *American College of Cardiology Foundation*. Este es un artículo de acceso abierto (open access) que se publica bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>).



Para escuchar el audio del resumen en inglés de este artículo por el Editor Jefe del JACC, Dr. Valentin Fuster, consulte [JACC.org](http://JACC.org)

Del <sup>a</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, España; <sup>b</sup>The Rockefeller University, Nueva York, Nueva York; <sup>c</sup>Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España; <sup>d</sup>Philips Healthcare Iberia, Madrid, España; <sup>e</sup>CIC biomaGUNE, Donostia-San Sebastián, España; <sup>f</sup>IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, España; <sup>g</sup>Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, España; <sup>h</sup>IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España; <sup>i</sup>CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Madrid, España; y la <sup>j</sup>Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Nueva York, Nueva York. \*Los Drs. Strickland y Fuster son ambos autores sénior. Este trabajo fue financiado por el Proof-of-Concept Award del Robertson Therapeutic Development Fund (Dra. Cortés-Canteli), The Rockefeller University; la subvención del NINDS/HNI

**ABREVIATURAS  
Y ACRÓNIMOS**

**A $\beta$**  = amiloide  $\beta$   
**EA** = enfermedad de Alzheimer  
**AQP4** = acuaporina 4  
**ASL** = marcaje de espín arterial  
**BHE** = barrera hematoencefálica  
**AAC** = angiopatía amiloide cerebral  
**FSC** = flujo sanguíneo cerebral  
**AOD** = anticoagulante oral directo  
**RM** = resonancia magnética  
**PDGFR $\beta$**  = receptor de factor de crecimiento de origen plaquetario  $\beta$   
**WB** = *Western blot* (inmunoelctrotransferencia)  
**WT** = tipo natural (*wild type*)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo y multifactorial caracterizado por las placas de amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ), los ovillos tau, la neuroinflamación y la atrofia cerebral (1). La EA está estrechamente relacionada con los factores de riesgo cardiovascular, y a menudo se acompaña de un componente vascular importante (2-4). La patología cerebrovascular presente en la EA incluye la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE), disfunción de la unidad neurovascular, desacoplamiento neurovascular y alteraciones del flujo sanguíneo cerebral (FSC) (5-7). Además, en la EA hay una disregulación crónica de la hemostasia, con un aumento de la generación de trombina, presencia de plaquetas activadas y fuga de proteínas plasmáticas hacia el parénquima cerebral (8, 9), que favorecen la formación y la persistencia de coágulos de fibrina (10, 11).

Se observa un aumento temprano de la fibrina (fibrinógeno) en la EA (12), de forma intravascular y extravascular en áreas de disfunción sináptica y patología amiloide (10, 11), que causa una interacción con el A $\beta$  (13, 14) e induce la formación de coágulos resistentes (10, 15). Dado que la reducción de las concentraciones de fibrina (fibrinógeno) en los ratones con EA retarda la progresión de la enfermedad (10, 11, 16), existe la posibilidad de que los tratamientos que normalizan el entorno protrombótico presente en la EA puedan ser útiles en combinación con otras estrategias (17). De hecho, se ha descrito que los anticoagulantes tradicionales aportan un beneficio en los pacientes con demencia (18, 19) y en los modelos de la EA en el ratón (20, 21). Sin embargo, para superar sus importantes limitaciones, como la necesidad de una supervisión estricta y el riesgo elevado de hemorragia, han surgido los anticoagulantes orales directos (AOD) como alternativa útil (22). De entre estos fármacos, el dabigatrán es un inhibidor directo de la trombina, de administración oral, que ha sido autorizado ya para varias indicaciones, como la prevención del ictus en pacientes con fibrilación auricular no valvular y el tra-

tamiento del tromboembolismo venoso (23). El dabigatrán muestra interacciones mínimas con otros fármacos (22), un riesgo bajo de hemorragia intracraneal (24, 25), un potente efecto antiinflamatorio (26) y dispone de un fármaco eficaz para revertir sus efectos (27).

Presentamos aquí una evidencia indicativa de que la anticoagulación a largo plazo con dabigatrán proporciona una mejora en múltiples características de la patogenia de la EA. El tratamiento con dabigatrán preservó la memoria y la perfusión cerebral en ratones transgénicos con EA, y ello se acompañó de una mejora de la integridad de la BHE, junto con unos niveles inferiores de fibrina, depósito de amiloide y actividad neuroinflamatoria en el cerebro con EA.

**MÉTODOS**

**RATONES.** Se dispuso de ratones con EA TgCRND8 y ratones de control de la misma camada, proporcionados por *The Tanz Centre for Research in Neurodegenerative Diseases, University of Toronto, Canadá* (28). En este estudio se utilizaron tan solo hembras de ratón debido a la conducta agresiva de los machos TgCRND8 de las mismas camadas, y la no viabilidad de un alojamiento de los animales de forma individual para experimentos conductuales y de larga duración. Se obtuvieron 70 ratones hembras mediante fecundación *in vitro*: 37 ratones TgCRND8 y 33 ratones de tipo natural (*wild type*) (WT). Cinco ratones TgCRND8 murieron antes del destete y 8 murieron durante el tratamiento con placebo/dabigatrán, lo cual supone una pérdida de un 35% en los ratones TgCRND8, que es coherente con lo indicado en estudios anteriores (28). Tan solo murió 1 ratón WT, durante el tratamiento con placebo. El tratamiento con placebo/dabigatrán se realizó también en cohortes de 30 semanas de edad, de menor tamaño; y se extrajeron los cerebros de esos animales que se incluyeron en los análisis de *Western blot* (WB) (inmunoelctrotransferencia) e inmunohistoquímicos. El tamaño del grupo utilizado en todos los experimentos se indica en cada uno de los apartados. Los protocolos de experimentación en animales fueron aprobados por los correspondientes comités locales de cuidado y uso de los animales.

NIS106668 (Drs. Norris y Strickland); el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea (FP7-PEOPLE-2013-IIF), el contrato de subvención nº PIFI-GA-2013-624811 (Drs. Cortés-Canteli y Fuster), CNIC, Madrid, España; el contrato de investigación de tipo I Miguel Servet (CP16/00174 y MS16/00174 [Dra. Cortés-Canteli]), el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), CNIC; la Iniciativa de Empleo Juvenil (PEJ16/MED/TL-1231 [A. Marcos-Díaz] y PEJ-2018-AI/BMD-11477 [C. Cerón]) de la Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid; el Fondo de Desarrollo Regional Europeo (FEDER "Una manera de hacer Europa") y el Fondo Social Europeo (FSE "El FSE invierte en tu futuro"); y con el apoyo de la Marie Curie Alumni Association (Dra. Cortés-Canteli). El CNIC cuenta con el apoyo del ISCIII, el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCNU) de España y la Fundación Pro-CNIC, y es un Centro de Excelencia Severo Ochoa (SEV-2015-0505). El CIC biomaGUNE es una Unidad de Excelencia María de Maeztu (MDM-2017-0720). El Dr. Sánchez-González es empleado de Philips Healthcare. Todos los demás autores han indicado no tener relaciones relevantes que declarar en relación con el contenido de este artículo. Mike Sharma, MD, ha actuado como Editor Asociado Invitado para este artículo.

Original recibido el 21 de junio de 2019; original revisado recibido el 18 de julio de 2019, aceptado el 28 de julio de 2019.

**TRATAMIENTO CON DABIGATRÁN.** Los ratones TgCRND8 hembras de dos meses de edad y los ratones WT no transgénicos de las mismas camadas ( $n = 13$  a  $18$  ratones/grupo) fueron asignados aleatoriamente a grupos que recibieron un alimento suplementado con  $5$  mg/g del profármaco dabigatrán etexilato (BIBR 1048) o de un placebo (ambos proporcionados por Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania) y fueron tratados hasta la edad de  $30$  semanas (30sem) ( $n = 8$  a  $11$  ratones/grupo) o hasta la edad de  $60$  semanas (60sem) ( $n = 5$  a  $7$  ratones/grupo). Se realizaron análisis del tiempo de trombina diluida, con objeto de determinar la concentración del dabigatrán en plasma (23).

**LABERINTO DE BARNES.** Se utilizó el laberinto de Barnes para evaluar la memoria espacial en ratones TgCRND8 de  $25$  semanas de edad y ratones WT de las mismas camadas tratados con dabigatrán/placebo durante  $17$  semanas (ratones/grupo:  $n = 16$  WT/placebo;  $n = 14$  EA/placebo;  $n = 16$  WT/dabigatrán;  $n = 12$  EA/dabigatrán) tal como se describe en el apartado de Métodos *online*.

**MARCAJE DE ESPÍN ARTERIAL.** Se determinó el FSC con métodos no invasivos utilizando resonancia magnética (RM) con marcaje de espín arterial (ASL) en ratones TgCRND8 de  $40$  semanas de edad y ratones WT de las mismas camadas tratados con dabigatrán/placebo durante  $32$  semanas (ratones/grupo:  $n = 7$  WT/placebo,  $n = 6$  EA/placebo,  $n = 6$  WT/dabigatrán,  $n = 5$  EA/dabigatrán) tal como se describe en el apartado de Métodos *online*.

**ANÁLISIS DE WB.** Se extrajeron las fracciones de proteína soluble e insoluble (con contenido de fibrina) de la corteza y del hipocampo de los ratones en cada grupo experimental (ratones/grupo:  $n = 8$  WT/30sem/placebo,  $n = 9$  EA/30sem/placebo,  $n = 10$  WT/30sem/dabigatrán,  $n = 11$  EA/30sem/dabigatrán,  $n = 6$  WT/60sem/placebo,  $n = 6$  EA/60sem/placebo,  $n = 6$  WT/60sem/dabigatrán,  $n = 5$  EA/60sem/dabigatrán) y se sometieron a un análisis de WB tal como se describe en el apartado de Métodos *online*.

**TINCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN LOS CEREBROS DE LOS RATONES.** Se realizaron análisis inmunohistoquímicos de diaminobenzidina y doble inmunofluorescencia en cortes de flotación libre, según un método descrito anteriormente (29). Todos los análisis se llevaron a cabo con un diseño de estudio ciego (enmascaramiento). El tamaño de cada grupo experimental fue el mismo que el descrito para la WB. Puede consultarse una información detallada en el apartado de Métodos *online*.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO.** Todos los valores numéricos se presentan en forma de media  $\pm$  EEM. Los gráficos, los cálculos de valores atípicos y las estadísticas se genera-

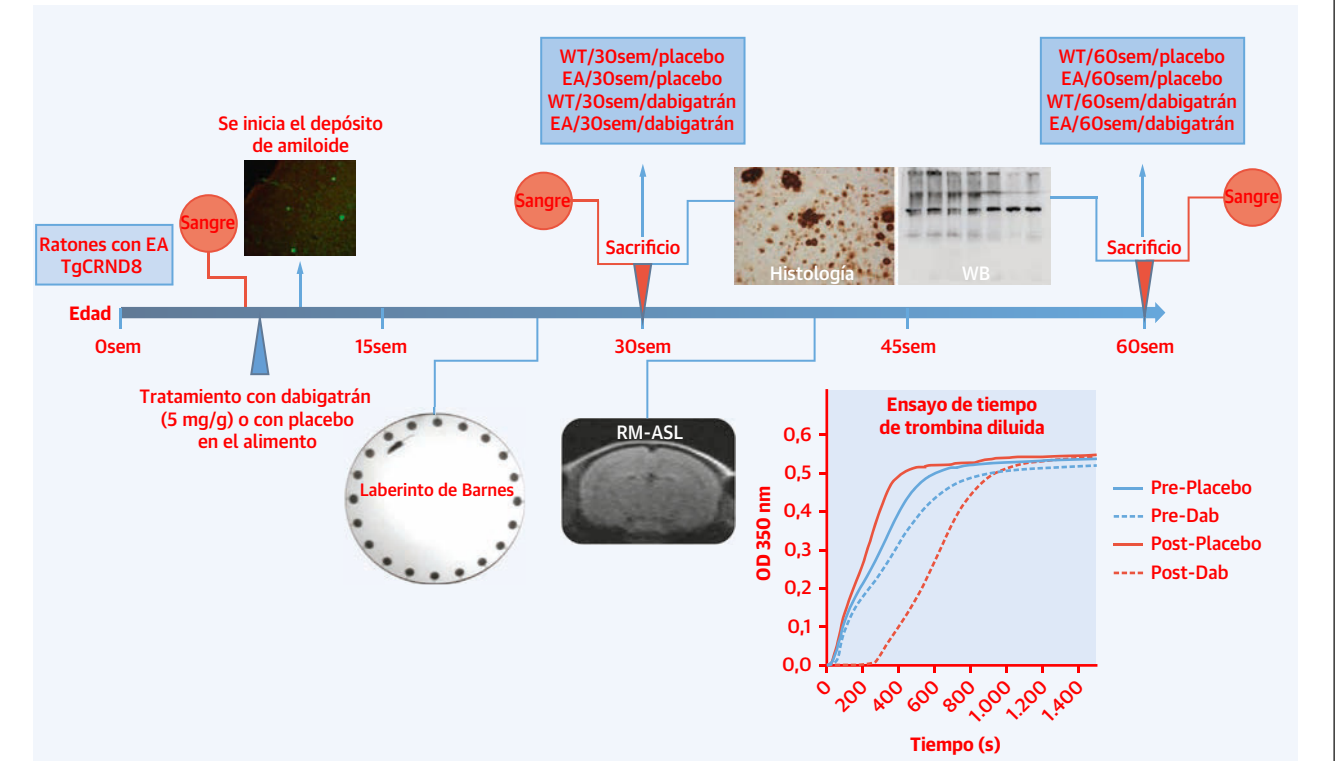
ron con el programa GraphPad Prism versión 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos). La comparación de los 2 grupos (que se indica mediante una línea horizontal en el gráfico correspondiente) se realizó con la prueba de *t* de Student. Para determinar si el efecto del genotipo, la edad o el tratamiento eran significativos, se llevaron a cabo análisis de la varianza de doble vía, aplicando el post-test de Tukey para las comparaciones múltiples. La significación se presenta de la siguiente forma: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  y \*\*\* $p \leq 0,001$ .

## RESULTADOS

Los ratones hembra TgCRND8 con EA y los ratones no transgénicos de las mismas camadas recibieron el alimento con un suplemento de dabigatrán etexilato o placebo a las  $8$  semanas de edad, inmediatamente antes del inicio del depósito de amiloide (figura 1). Basándonos en los datos de consumo de alimento por ratón ( $\sim 5$  g), el peso de los animales a lo largo de todo el estudio ( $26,5 \pm 4,0$  g) y la baja biodisponibilidad del dabigatrán etexilato ( $6,5\%$ ) (30), estimamos que los ratones recibieron una media de dosis de  $\sim 60$  mg/kg de dabigatrán etexilato a lo largo de  $24$  h. Los análisis del tiempo de trombina diluida indicaron un retraso en la formación del coágulo en el plasma de los ratones tratados con dabigatrán (figura 1), y la media de concentración de dabigatrán activo en plasma a lo largo de todo el tratamiento fue de  $141,2 \pm 72,5$  ng/ml en el grupo de WT/dabigatrán y de  $125,7 \pm 64,5$  ng/ml en el grupo de EA/dabigatrán. Durante el tratamiento con dabigatrán/placebo, se evaluó la memoria espacial y el FSC, con el empleo del laberinto de Barnes y de la RM-ASL, respectivamente (figura 1). Los ratones fueron sacrificados a las  $30$  o  $60$  semanas de edad, y se obtuvo tejido para los exámenes de histología y de WB (figura 1).

### EL TRATAMIENTO CON DABIGATRÁN PREVIENE LA DISMINUCIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL EN LOS RATONES TgCRND8 CON EA.

Los ratones TgCRND8 con EA de  $25$  semanas de edad y los ratones WT de las mismas camadas que fueron tratados con dabigatrán/placebo fueron evaluados con la tarea del laberinto de Barnes para determinar la memoria espacial. Durante el entrenamiento, todos los ratones mostraron disminuciones comparables de la latencia para la exploración del orificio de salida, lo cual indicaba una adquisición similar del aprendizaje espacial (figura 2A). Sin embargo, durante el ensayo de sondeo, cuando se obstruyó el orificio de salida y se les planteó el reto de recuerdo de la memoria espacial, los ratones TgCRND8 con EA tratados con placebo no recordaron en dónde estaba la caja de salida y pasaron un tiempo similar cerca de los orificios diana y no diana (figura 2B). Los ratones con EA tratados con

**FIGURA 1** Esquema del diseño experimental

Se utilizaron ratones TgCRND8 con EA y ratones WT de las mismas camadas ( $n = 13$  a  $18$  ratones hembra/grupo) en los que se inició un tratamiento con dabigatrán/placebo a las 8 semanas de edad, y se sacrificaron los animales al cabo de 22 semanas (a las 30 semanas de edad [30sem],  $n = 8$  a  $11$  ratones/grupo) o de 52 semanas de tratamiento (a las 60 semanas de edad [60sem],  $n = 5$  a  $7$  ratones/grupo). Se realizaron exámenes de histología y análisis de WB en los 8 grupos experimentales (WT/30sem/placebo, EA/30sem/placebo, WT/30sem/dabigatrán, EA/30sem/dabigatrán, WT/60sem/placebo, EA/60sem/placebo, WT/60sem/dabigatrán y EA/60sem/dabigatrán). Se extrajeron muestras de sangre antes y después del tratamiento, para determinar la concentración de dabigatrán mediante determinaciones del tiempo de trombina diluida (se muestra un gráfico representativo). Se utilizó el laberinto de Barnes para evaluar la memoria espacial 17 semanas después de iniciado el tratamiento (a las 25 semanas de edad,  $n = 12$  a  $16$  ratones/grupo). Se determinó la perfusión cerebral de forma no invasiva mediante RM-ASL 32 semanas después de iniciado el tratamiento (a las 40 semanas de edad,  $n = 5$  a  $7$  ratones/grupo). EA = enfermedad de Alzheimer; ASL = marcaje de espín arterial; DAB = dabigatrán; RM = resonancia magnética; WB = Western blot; WT = tipo natural (*wild*).

dabigatrán presentaron unos resultados similares a los de los ratones WT, puesto que pasaron un tiempo significativamente mayor en las zonas diana que en las no diana (**figura 2B**), lo cual demostraba que el tratamiento con dabigatrán en los ratones con EA tuvo un efecto beneficioso en cuanto al recuerdo de la memoria espacial.

**EL FSC ESTÁ CONSERVADO EN LOS RATONES CON EA TRATADOS CON DABIGATRÁN.** Los experimentos de RM-ASL se realizaron en ratones TgCRND8 y ratones WT de 40 semanas de edad tratados con dabigatrán/placebo para cuantificar el FSC (**figura 3A**). Detectamos una hipoperfusión cortical significativa en los ratones TgCRND8 con EA, con una disminución del FSC de un  $\sim 15\%$  en comparación con los ratones WT de las mismas camadas (**figura 3B**) ( $100,0 \pm 4,2\%$  con WT/placebo frente a  $85,8 \pm 3,4\%$  con EA/placebo). El tratamiento con dabigatrán previno esa hipoperfusión (**figura 3B**) ( $85,8 \pm 3,4\%$  con EA/placebo frente a  $112,7 \pm 9,6\%$  con EA/dabigatrán).

**EL TRATAMIENTO CON DABIGATRÁN PREVIENE EL DEPÓSITO DE FIBRINA EN EL CEREBRO CON EA.** A continuación comparamos la cantidad de fibrina insoluble presente en la corteza y en el hipocampo de los ratones TgCRND8 y WT de 30 y de 60 semanas de edad, tratados con dabigatrán/placebo. Los análisis de WB pusieron de manifiesto que el depósito de fibrina en el cerebro aumentaba a medida que avanzaba la edad de los ratones y que progresaba la patología de EA (**figura 4**) (11). Sin embargo, después de una anticoagulación a largo plazo con dabigatrán, hubo una menor cantidad de fibrina en el cerebro con EA (**figura 4**), lo cual indicaba que la inhibición de la trombina previno la formación de coágulos de fibrina patológicos y su acumulación en el cerebro de los ratones durante el curso de la enfermedad.

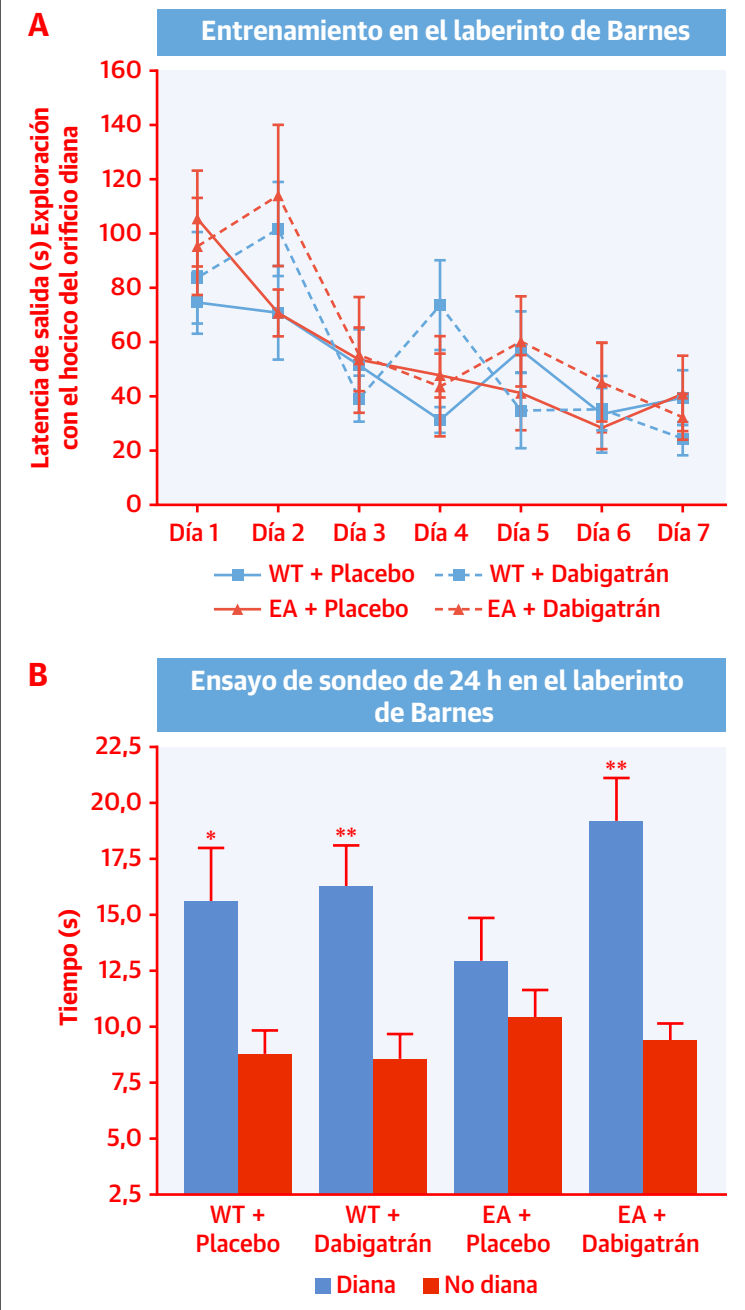
**EL TRATAMIENTO CON DABIGATRÁN REDUCE LA CARGA DE AMILOIDE EN LOS RATONES CON EA.** El grado de patología amiloide se midió con el empleo de

inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo para A $\beta$  6E10. La tinción de 6E10 mostró una patología de amiloide cerebral amplia en los ratones TgCRND8 de 30 semanas de edad, que aumentó a la edad de 60 semanas (figura 5A). Los ratones TgCRND8 con EA tratados con dabigatrán presentaron también una patología de A $\beta$  a ambas edades (figura 5A), pero la cuantificación puso de manifiesto que la carga de amiloide cortical se reducía significativamente en un ~24% en el grupo de dabigatrán de 60 semanas en comparación con los ratones tratados con placebo (figura 5B) ( $3,2 \pm 0,2\%$  con EA/60sem/placebo frente a  $2,5 \pm 0,2\%$  con EA/60sem/dabigatrán).

Analizamos también si los oligómeros, que son una de las especies moleculares de A $\beta$  más tóxicas (31), se reducían también con el tratamiento con dabigatrán. La inmunotinción con el empleo del anticuerpo para oligómeros de A $\beta$  NAB61 (32) reveló la presencia de un halo característico de tinción oligomérica alrededor de las placas de amiloide en los ratones con EA (figura 5C) (33). Tal como se preveía, la cantidad de oligómeros de A $\beta$  aumentó con la edad en los ratones TgCRND8 tratados con placebo, pero este aumento se atenuó en un 51,8% en los ratones con EA tratados con dabigatrán (figura 5D) ( $2,1 \pm 0,5\%$  con EA/60sem/placebo frente a  $1,0 \pm 0,2\%$  con EA/60sem/dabigatrán). Estos resultados aportan una evidencia indicativa de que el tratamiento a largo plazo con dabigatrán redujo de forma significativa la carga de amiloide y la patología de oligómeros de A $\beta$  en los ratones con EA.

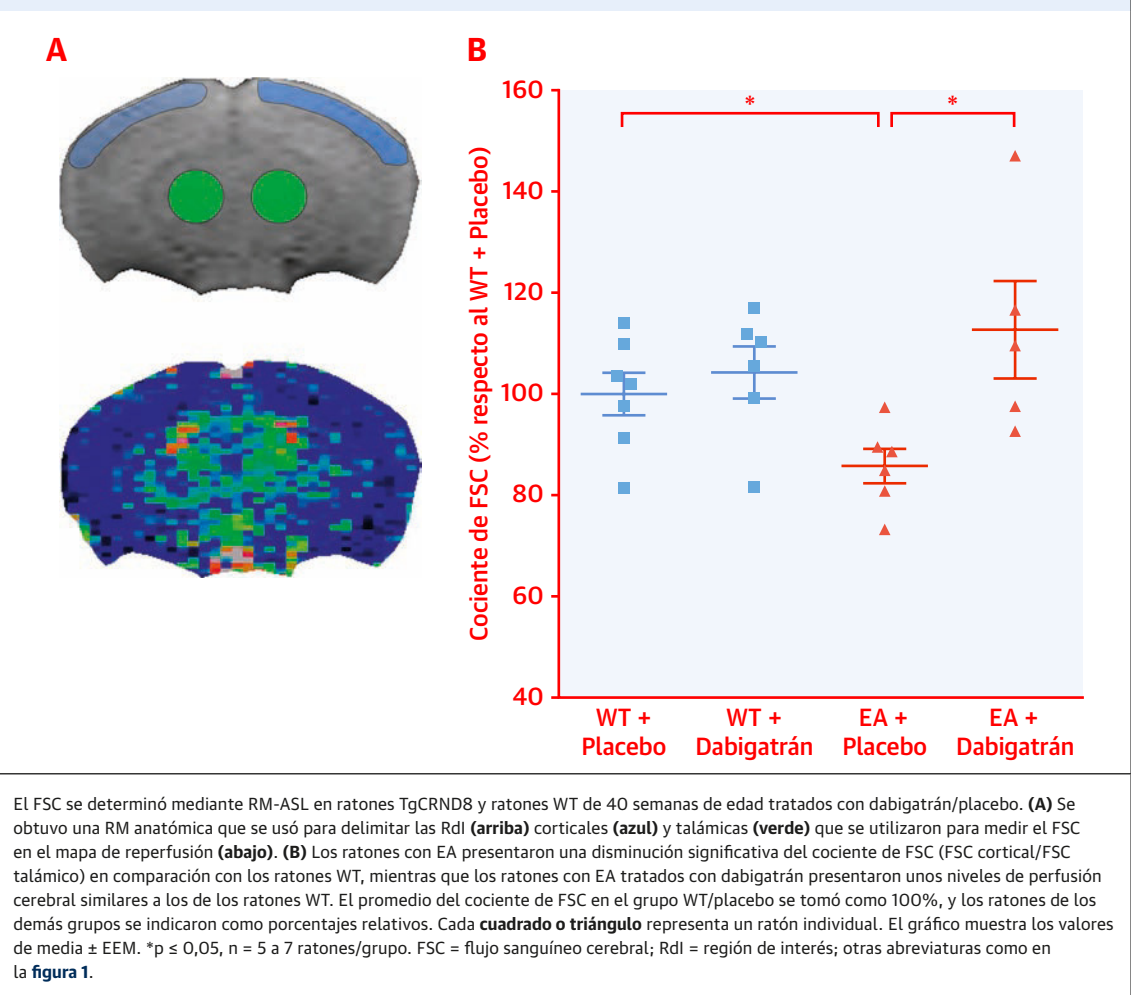
**LA ANTICOAGULACIÓN A LARGO PLAZO CON DABI-GATRÁN REDUCE LA NEUROINFLAMACIÓN.** La EA tiene un claro componente inflamatorio, orquestado principalmente por la microglía y los astrocitos (34). La inmunohistoquímica de CD68 mostró acumulaciones de microglía fagocitaria en el cerebro de los ratones TgCRND8 que aumentaban con la edad y la progresión patológica (figuras 6A y 6B) ( $0,5 \pm 0,1\%$  con EA/30sem/placebo frente a  $1,3 \pm 0,2\%$  con EA/60sem/placebo). La anticoagulación redujo la actividad neuroinflamatoria ya que hubo una disminución del 31% en los niveles corticales de CD68 en los ratones con EA tratados con dabigatrán de 60 semanas de edad, en comparación con el placebo (figuras 6A y 6B) ( $1,3 \pm 0,2\%$  con EA/60sem/placebo frente a  $0,9 \pm 0,1\%$  con EA/60sem/dabigatrán). A continuación analizamos si la astrogliosis asociada a la EA se reducía también con la anticoagulación a largo plazo. Los análisis de WB mostraron que los niveles globales de 2 marcadores que están elevados en los astrocitos reactivos, la vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), se redujeron significativamente, en un 50% y un 32,3%, respectivamente, en los ratones TgCRND8 de 60 semanas de edad tratados con dabigatrán en comparación con los tratados con el placebo (figuras 6C y 6D).

**FIGURA 2** Los ratones con EA tratados con dabigatrán no mostraron un deterioro cognitivo



Se sometió a los ratones TgCRND8 con EA y a los controles WT tratados con dabigatrán/placebo a la tarea del laberinto de Barnes para evaluar la memoria espacial a las 25 semanas de edad. (A) Se entrenó a los ratones durante 7 días, y se determinó y representó gráficamente la latencia para explorar el orificio diana (tocarlo con el hocico). Todos los grupos aprendieron la posición de la caja de salida durante el entrenamiento. (B) Se determinó y representó gráficamente el tiempo pasado cerca de los orificios de salida y adyacentes (cuadrante diana) y el tiempo medio pasado cerca de otros orificios (cuadrantes distintos del cuadrante diana) durante el ensayo de sondeo. Los ratones EA tratados con placebo no mostraron una preferencia por el área diana, mientras que los ratones con EA tratados con dabigatrán exploraron la región diana de un modo significativamente mayor que las zonas distintas de la diana. Los gráficos muestran la media  $\pm$  EEM. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  para el cuadrante diana frente a los cuadrantes no diana en cada grupo experimental.  $n = 12$  a 16 ratones/grupo. Abreviaturas como en la figura 1.

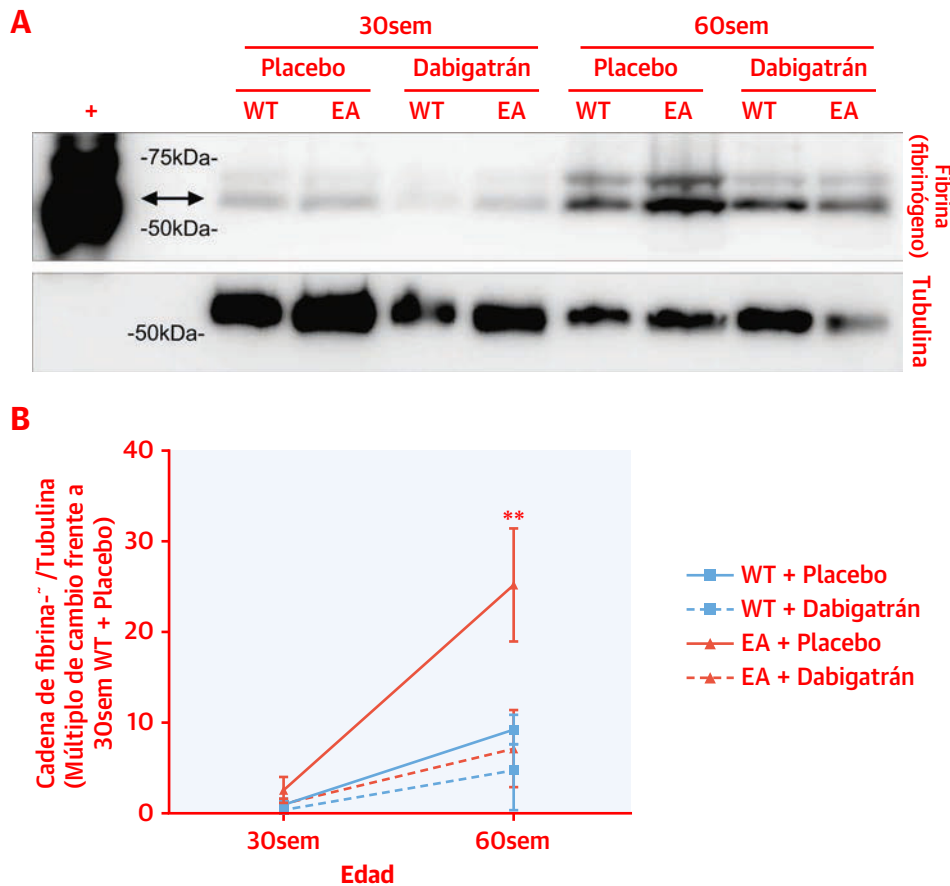


**FIGURA 3** La perfusión cerebral se mantuvo en los ratones con EA tratados con dabigatrán

La neuroinflamación en la EA se caracteriza también por una infiltración de linfocitos T de sangre periférica en el cerebro (35). Detectamos un aumento de los linfocitos CD3-positivos dentro del cerebro de los ratones TgCRND8 en comparación con los controles no transgénicos, y su número aumentó durante la progresión patológica con la edad (**figuras 6E y 6F**) ( $1,3 \pm 0,3$  linfocitos CD3+/mm<sup>2</sup> con EA/30sem/placebo frente a  $8,2 \pm 1,2$  linfocitos CD3+/mm<sup>2</sup> con EA/60sem/placebo). La mayoría de los linfocitos CD3-positivos estaban extravasados en el parénquima cerebral (**figura 6G**), y este reclutamiento hacia el cerebro se redujo en un 30% en los ratones con EA de mayor edad tratados con dabigatrán (**figuras 6E y 6F**) ( $8,2 \pm 1,2$  linfocitos CD3+/mm<sup>2</sup> con EA/60sem/placebo frente a  $5,6 \pm 0,7$  linfocitos CD3+/mm<sup>2</sup> con EA/60sem/dabigatrán). Todos estos resultados ponen de manifiesto que la anticoagulación a largo plazo con dabigatrán redujo la neuroinflamación asociada a la EA.

**EL TRATAMIENTO CON DABIGATRÁN PRESERVÓ LA INTEGRIDAD DE LA BHE EN LOS RATONES CON EA.** A continuación analizamos la expresión y la localización de la acuaporina 4 (AQP4), un canal de agua que está presente de forma selectiva en los podocitos perivasculares astrocitarios y que es esencial para la eliminación del A $\beta$  y el acoplamiento neurovascular (36). Se observó la presencia de AQP4 ubicada alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales en los ratones WT de 60 semanas de edad (**figuras 7A y 7B**). Sin embargo, en los ratones con EA de la misma edad, se observó una despolarización astrocitaria con un desplazamiento de la expresión de AQP4 de los podocitos astrocitarios que circundaban los vasos sanguíneos a áreas del neuropilo próximas a las placas de amiloide (**figura 7A**). La cuantificación mostró que la AQP4 perivascular se redujo en un 30% en los ratones con EA en comparación con los controles WT de la misma edad (**figura 7C**) ( $100,0 \pm 5,6\%$  con WT/60sem/placebo frente a  $67,4 \pm 2,5\%$  con EA/60sem/placebo). El trata-

**FIGURA 4** El tratamiento con dabigatrán previno el depósito de fibrina en el cerebro con EA



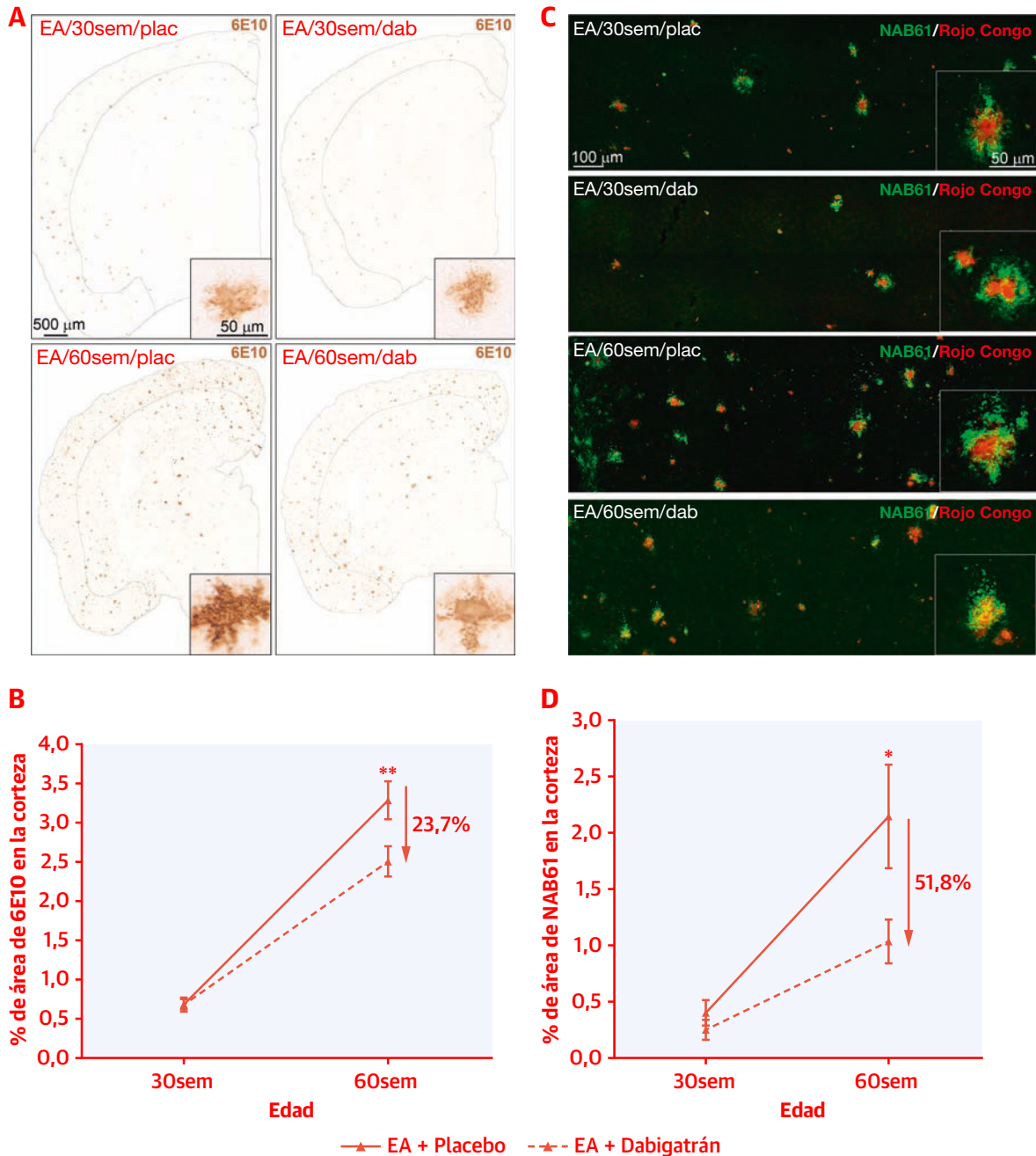
Se extrajo la fibrina de la corteza/hipocampo de ratones TgCRND8 con EA y ratones WT de 30 y de 60 semanas de edad, tratados con dabigatrán/placebo. **(A)** Se agregaron cantidades iguales de la fracción que contenía la fibrina y se analizaron mediante WB con el empleo de un anticuerpo específico para la fibrina (fibrinógeno) (**arriba**) y luego se volvieron a examinar con un anticuerpo para la tubulina como control de carga (**abajo**). Se utilizó un coágulo de fibrina *in vitro* como control positivo (+). **(B)** Se cuantificó la cantidad de cadena  $\beta$  de fibrina (**doble flecha en A**) y la de tubulina en 8 análisis de WB diferentes, se calculó el promedio y luego se representó gráficamente. El contenido de fibrina en el cerebro aumentó con la edad y con la patología de EA, pero el tratamiento con dabigatrán previno el depósito de fibrina en el cerebro en los ratones con EA de 60 semanas de edad. El gráfico muestra los valores de media  $\pm$  EEM. El efecto del tratamiento ( $p < 0,0001$ ) y el de la edad ( $p < 0,0001$ ) son significativos. \*\* $p \leq 0,01$  para EA/60sem/placebo frente a EA/60sem/dabigatrán.  $n = 5$  a 11 ratones/grupo. Abreviaturas como en la **figura 1**.

miento con dabigatrán previno en parte la redistribución de la expresión de AQP4 de los podocitos a las áreas no podocitarias en los ratones con EA (**figura 7C**) ( $67,4 \pm 2,5\%$  con EA/60sem/placebo frente a  $88,0 \pm 3,3\%$  con EA/60sem/dabigatrán).

Dado que los pericitos son también parte integrante de la unidad neurovascular, llevamos a cabo un análisis inmunohistoquímico con el empleo del marcador pericítico receptor de factor de crecimiento de origen plaquetario  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ). Observamos que los pericitos de los ratones TgCRND8 con EA presentaban unas extensiones hipertróficas anormales alrededor de los capilares (**figuras 7D**), que eran similares a lo que se ha descrito en otras líneas de ratones transgénicos con EA (37). Estas extensiones alargadas aumentaban de forma significativa el

área global positiva para PDGFR $\beta$  en la corteza de los ratones con EA de 60 semanas de edad, en comparación con los ratones WT de las mismas camadas (**figura 7E**) ( $0,11 \pm 0,006\%$  con WT/60sem/placebo frente a  $0,18 \pm 0,02\%$  con EA/60sem/placebo). El tratamiento con dabigatrán atenuó estas alteraciones en la morfología de los pericitos y normalizó la tinción de PDGFR $\beta$  en los ratones TgCRND8 con EA (**figuras 7D y 7E**) ( $0,18 \pm 0,02\%$  con EA/60sem/placebo frente a  $0,08 \pm 0,02\%$  con EA/60sem/dabigatrán).

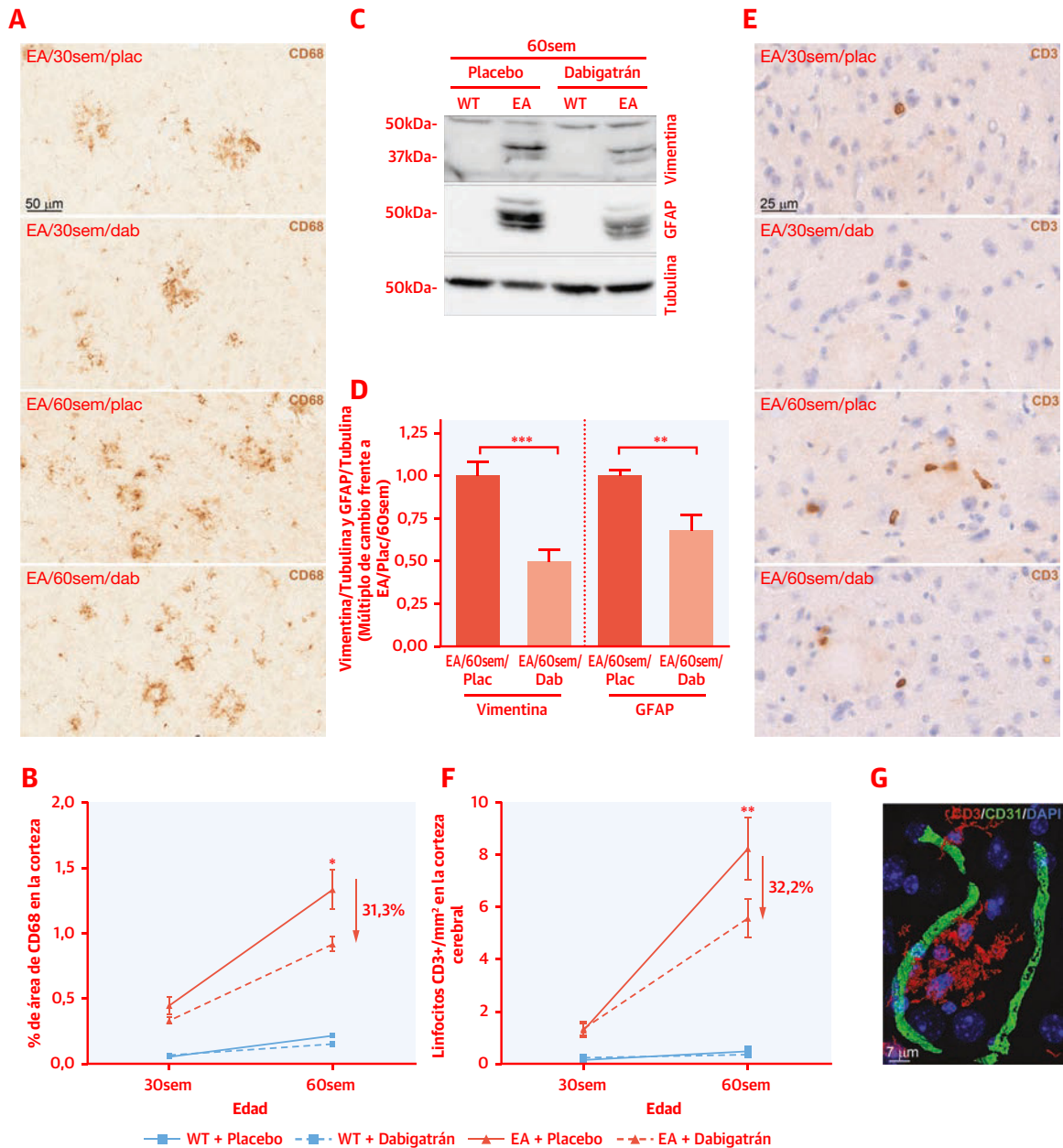
Considerados conjuntamente, nuestros resultados indican que los efectos beneficiosos observados tras la anticoagulación a largo plazo con dabigatrán podrían deberse en parte a una mejor preservación de la estructura y la integridad de la BHE.

**FIGURA 5** La anticoagulación a largo plazo con dabigatrán redujo la carga de amiloide en los ratones con EA

Se analizó la patología cerebral de A $\beta$  en ratones TgCRND8 y en ratones WT tratados con dabigatrán (dab)/placebo (plac). **(A)** La inmunohistoquímica de A $\beta$  (6E10) mostró una patología de amiloide extensa en todo el cerebro de los ratones TgCRND8 con EA de 30 y de 60 semanas de edad (en los **recuadros** se muestran a mayor aumento las placas de amiloide corticales). Para mayor claridad se presentan los cortes y las áreas corticales cuantificadas. **(B)** Las áreas corticales positivas para 6E10 se redujeron en un 23,7% en los ratones TgCRND8 tratados con dabigatrán de 60 semanas de edad en comparación con los tratados con placebo. **(C)** El análisis de inmunofluorescencia de oligómeros de A $\beta$  (NAB61 [**verde**]) mostró una tinción alrededor de las placas de amiloide fibrilares (rojo Congo [**rojo**]) en el cerebro de los ratones TgCRND8 (véase a mayor aumento en los **recuadros**). Se obtuvieron imágenes de apilamiento de enfoque Z (*Z-stack*) para el examen de placas (*tile-scan*) confocal de la corteza parietal, y la cuantificación del área positiva para NAB61 mostró que el tratamiento con dabigatrán redujo en un 51,8% la cantidad de oligómeros de A $\beta$  en la corteza cerebral de los ratones con EA de 60 semanas **(D)**. Los gráficos muestran la media  $\pm$  EEM. El efecto del tratamiento ( $p = 0,0089$  para el 6E10 y  $p = 0,0083$  para el NAB61) y el de la edad ( $p < 0,0001$  para ambos) son significativos. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  para EA/60sem/placebo frente a EA/60sem/dabigatrán.  $n = 5$  a 11 ratones/grupo. Abreviaturas como en la **figura 1**.

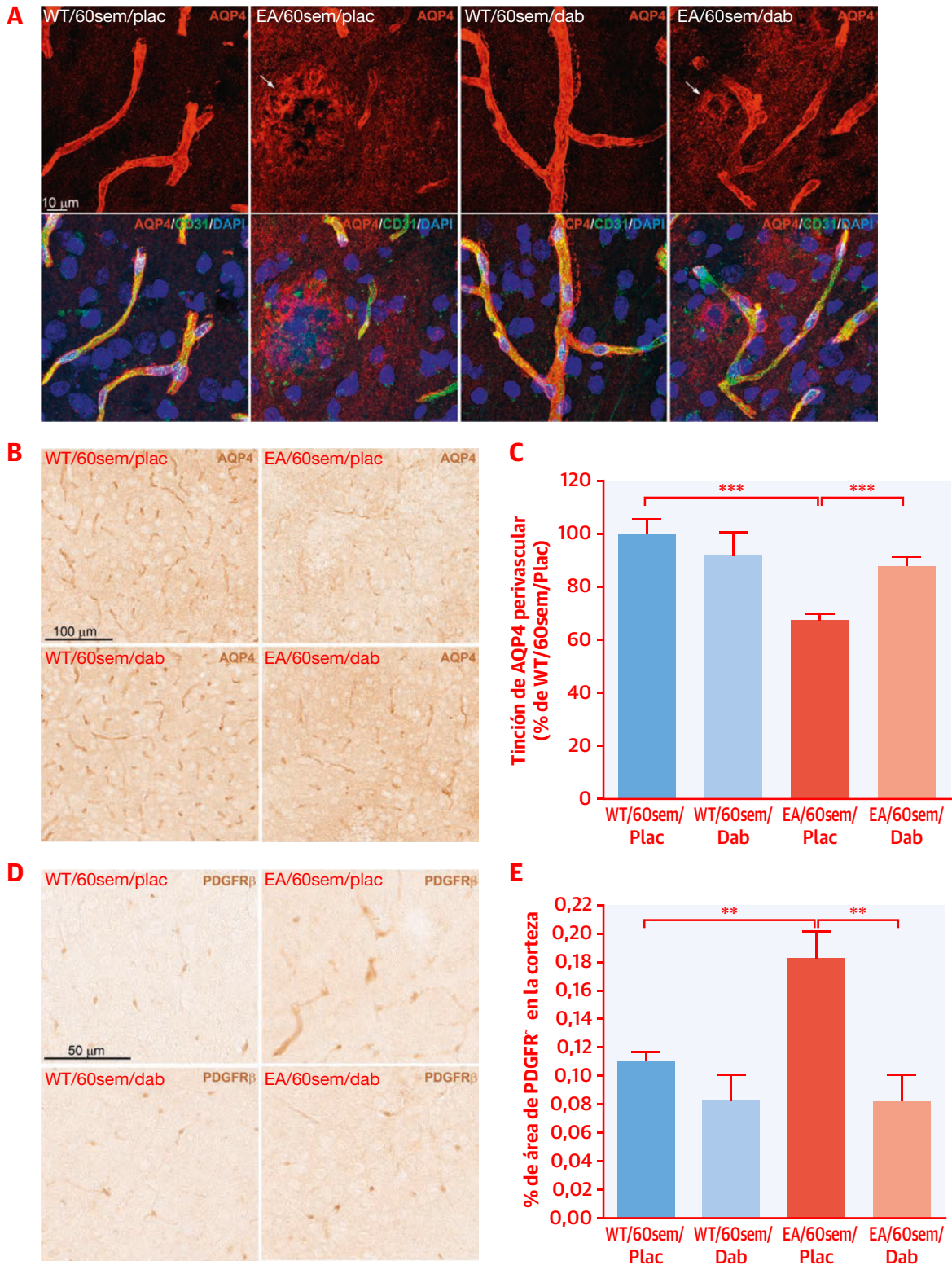


**FIGURA 6** El tratamiento con dabigatrán redujo la neuroinflamación en los ratones con EA



(A) El análisis inmunohistoquímico mostró acumulaciones de microglía positivas para CD68 en los ratones con EA de 30 semanas de edad y más numerosas en los de 60 semanas de edad. (B) La cuantificación del área cortical positiva para CD68 mostró un reducción del 31,3% en la cantidad de microglía fagocítica en los ratones con EA tratados con dabigatrán de 60 semanas de edad, en comparación con los tratados con placebo. (C) Se extrajeron las proteínas solubles de los ratones de 60 semanas de edad, se agruparon y se sometieron a WB con el empleo de un anticuerpo para la vimentina (arriba) y luego se volvieron a examinar con un anticuerpo para la GFAP (centro) y un anticuerpo para la tubulina (control de carga, abajo). Se cuantificaron seis WB diferentes, que se promediaron y presentaron gráficamente (D). Los productos de degradación de los marcadores astrocitarios vimentina y GFAP aumentaron de forma drástica en los ratones con EA en comparación con los ratones WT (53) pero sus niveles se redujeron en los ratones con EA tratados con dabigatrán en un 50% y un 32,3%, respectivamente. (E) La tinción inmunohistoquímica mostró la presencia de linfocitos CD3-positivos dispersos en el cerebro de los ratones con EA de 30 semanas de edad, que aumentaban con la edad y con la patología. (F) La cuantificación de los linfocitos CD3-positivos en la corteza mostró que los linfocitos T infiltrantes se redujeron de forma significativa en un 32,2% en los ratones con EA tratados con dabigatrán en comparación con los tratados con placebo. (G) La doble inmunofluorescencia puso de manifiesto que los linfocitos CD3-positivos (rojo) no se encontraban en el interior de los vasos sanguíneos (CD31, verde) sino que se habían extravasado al parénquima cerebral. (B y F) El área cortical cuantificada fue similar a la mostrada en las imágenes de baja resolución en la figura 5A. Los gráficos muestran la media  $\pm$  EEM. El efecto del tratamiento y el de la edad fueron significativos ( $p < 0,0001$  en ambos casos). \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  para EA/60sem/placebo frente a EA/60sem/dabigatrán.  $n = 5$  a 11 ratones/grupo (A a F) y  $n = 5$  a 6 ratones/grupo (C y D). GFAP = proteína ácida fibrilar glial; otras abreviaturas como en las figuras 1 y 5.

**FIGURA 7** El tratamiento con dabigatrán preservó la expresión de AQP4 y la morfología de los pericitos en la BHE



Continúa en la página siguiente

## DISCUSIÓN

Cada vez es mayor la evidencia que respalda la presencia de un estado procoagulante crónico en la EA, lo cual tiene importantes consecuencias por lo que respecta a la aparición y la progresión de la enfermedad. Presentamos aquí la evidencia conductual, fisiológica y molecular que indica que abordar el componente trombótico de este trastorno con un AOD produce una mejora en varias características distintivas patológicas de la EA en un modelo de la EA en el ratón (**ilustración central**). El tratamiento con dabigatrán preservó la perfusión cerebral y previno el deterioro de la memoria en los ratones TgCRND8 con EA. Estas mejoras funcionales se acompañaron a largo plazo de una inhibición de los depósitos de fibrina, una reducción de la carga de amiloide y de la actividad neuroinflamatoria y una mejora de la preservación de la BHE en el cerebro de los ratones con EA.

La acumulación patológica de fibrina cerebral en el parénquima del cerebro y en el interior de los vasos sanguíneos cerebrales desempeña un papel en la patogenia de la EA (10, 11, 38). El tratamiento con dabigatrán previno el depósito anormal de fibrina (**figura 4**), lo cual puede haber facilitado la circulación cerebral en el cerebro de los ratones con EA (**figura 3**). Este resultado es importante ya que las alteraciones del FSC preceden a la aparición de la demencia (39). Además, la anticoagulación a largo plazo redujo las placas de amiloide, y lo que es más importante, redujo a la mitad los niveles de oligómeros de A $\beta$  (**figura 5**), que son las especies moleculares de A $\beta$  tóxicas que se ha identificado que constituyen el principal factor que contribuye a producir la disfunción sináptica en la EA (31). Dado que el A $\beta$  muestra una intensa interacción con la fibrina (15) y el fibrinógeno (13), y puesto que esta interacción induce la formación de coágulos de sangre que son resistentes a la degradación (10, 15), la reducción de la cantidad de fibrina mediante una anticoagulación a largo plazo puede haber prevenido la unión del A $\beta$  y su posterior atrapamiento en los coágulos resistentes a la degradación.

Es probable que hubiera mecanismos hemostáticos y no hemostáticos que intervinieran en la reducción de la

neuroinflamación de la EA que produjo el dabigatrán (**figura 6**). La disminución en la formación de coágulos de fibrina, y la consiguiente mejora del FSC, pueden haber permitido un aporte adecuado de nutrientes y oxígeno al cerebro para respaldar la salud y la función neuronales. Además, el dabigatrán inhibe también el efecto de la trombina en la agregación plaquetaria (23), con lo que contribuye a reducir la hemostasia primaria y el reclutamiento de leucocitos hacia el cerebro con EA. Por otra parte, la trombina, la fibrina y el A $\beta$  actúan como mediadores proinflamatorios en la EA (9, 34, 40, 41). Así pues, la inhibición de la trombina y el consiguiente descenso de la acumulación de fibrina y A $\beta$  en los ratones con EA tratados con dabigatrán contribuyeron a reducir la neuroinflamación. Los estudios realizados con el empleo de otros modelos de la EA en el ratón han mostrado que la inhibición de la trombina reduce la respuesta neuroinflamatoria (40, 42), lo cual respalda también el papel de la trombina en la inflamación asociada a la EA.

La BHE está comprometida en la EA, y ello se traduce en un desacoplamiento neurovascular (6), junto con una fuga de componentes del plasma (por ejemplo, trombina y fibrina) hacia el parénquima cerebral, una falta de eliminación adecuada de los productos de desecho (por ejemplo, A $\beta$ ) y una infiltración de células inmunitarias de sangre periférica en el cerebro (5). La anticoagulación a largo plazo con dabigatrán redujo todas estas manifestaciones patológicas, posiblemente a través de la preservación de los pericitos y los podocitos astrocitarios, que son parte integrante de la unidad neurovascular (**figura 7**). El dabigatrán previno específicamente la redistribución de la AQP4 perivascular, que es uno de los factores clave que intervienen en la captación, eliminación y transporte activo del A $\beta$  a través de la BHE (36), lo cual puede haber facilitado el drenaje del A $\beta$  y haber contribuido a reducir con ello la carga de amiloide (**figura 5**). El tratamiento con dabigatrán previno también las alteraciones pericitarias en el cerebro de los ratones con EA. Teniendo en cuenta que, en la EA, la degeneración de los pericitos contribuye a producir la alteración de la BHE (43), la extravasación de la fibrina (44) y la despolarización de los podocitos astrocitarios (45), la preservación de la estructura y/o la

### FIGURA 7 Continúa

Se realizó una inmunotinción en cortes de cerebro de ratones TgCRND8 con EA y ratones WT de 60 semanas de edad tratados con dabigatrán/placebo con objeto de detectar la expresión y la localización de la AQP4 y del PDGFR $\beta$ . (A) La doble inmunofluorescencia mostró que había una expresión de AQP4 (**rojo**) alrededor de los vasos sanguíneos (CD31 [**verde**]) en los podocitos astrocitarios de los ratones WT. Sin embargo, la tinción para la AQP4 se desplazaba de su ubicación perivascular a las áreas de neuropilo alrededor de las placas de amiloide en los ratones con EA (**flechas**). (B) Se realizó un análisis inmunohistoquímico para segmentar y cuantificar la cantidad de AQP4 perivascular en todos los grupos experimentales (C). Los ratones con EA tratados a largo plazo con dabigatrán presentaron una tinción de AQP4 perivascular significativamente superior a la de los ratones con EA tratados con un placebo. (D) La inmunohistoquímica de PDGFR $\beta$  puso de manifiesto la presencia de extensiones pericitarias hipertróficas que recubrían los capilares en los ratones TgCRND8 con EA. (E) La cuantificación mostró un aumento robusto del área positiva para PDGFR $\beta$  en la corteza cerebral de los ratones con EA de 60 semanas de edad, en comparación con los ratones WT. Esta tinción anormal de los pericitos se normalizó con el tratamiento de dabigatrán. Los gráficos muestran la media  $\pm$  EEM. \*\*p  $\leq$  0,01, \*\*\*p  $\leq$  0,001. n = 5 a 6 ratones/grupo. AQP4 = acuaporina 4; PDGFR $\beta$  = receptor de factor de crecimiento de origen plaquetario  $\beta$ ; otras abreviaturas como en las **figuras 1 y 5**.

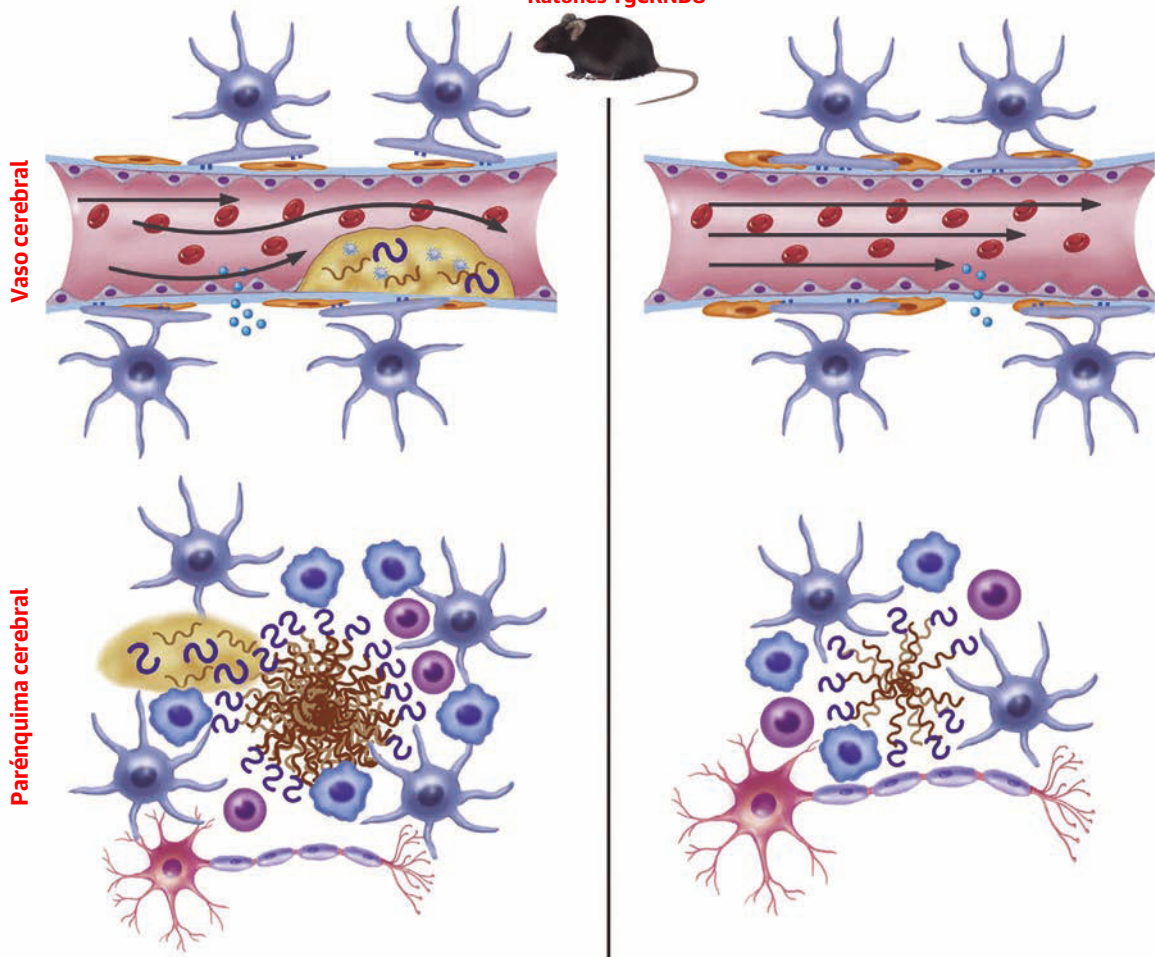


**ILUSTRACIÓN CENTRAL** El tratamiento con dabigatrán proporciona una mejoría en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer en el modelo en ratones TgCRND8

Enfermedad de Alzheimer + Placebo

Enfermedad de Alzheimer + Dabigatrán

Ratones TgCRND8



Cortes-Canteli, M. et al. J Am Coll Cardiol. 2019;74(15):1910-23.

El tratamiento a largo plazo con dabigatrán previene el depósito de fibrina en el cerebro con enfermedad de Alzheimer, reduciendo la patología amiloide y la neuroinflamación y preservando la integridad de la barrera hematoencefálica y del flujo sanguíneo central. Aβ = amiloide β; BHE = barrera hematoencefálica.

función de los pericitos aportada por el dabigatrán puede haber contribuido a producir la reducción observada del contenido de fibrina en el cerebro con EA (figura 4) y el mantenimiento de la AQP4 en los podocitos astrocitarios (figura 7). Se considera que el desequilibrio entre la producción y la eliminación del A $\beta$  como consecuencia de una alteración de la BHE es uno de los principales procesos patológicos que subyace en la EA (1). Nuestros resultados aportan un nuevo respaldo a la hipótesis de que la fibrina y la alteración de la hemostasia pueden ser uno de los eslabones que faltan por establecer en la cadena que une la EA con la patología vascular (8, 17).

Se observó que la reducción de la neuroinflamación asociada a la EA, la carga de amiloide y la disfunción de la BHE era significativa tan solo tras una anticoagulación a largo plazo. Dado que el estado procoagulante existente en la EA es un proceso crónico y sostenido, y puesto que el depósito de fibrina se acumula en el cerebro a medida que avanza la patología con la edad (figura 4 y Cortes-Canteli et al. [11]), el efecto del tratamiento con dabigatrán fue más robusto tras una administración prolongada. De hecho, algunos estudios epidemiológicos recientes han indicado una reducción de la incidencia de demencia en los pacientes con fibrilación auricular que han recibido una anticoagulación de larga duración (46). Tiene interés señalar que observamos también que el tratamiento con dabigatrán se acompañó de una preservación de la capacidad cognitiva (figura 2), lo cual es esencial para que una molécula pueda considerarse prometedora como abordaje terapéutico de la EA.

Nuestros resultados indican que la normalización del estado protrombótico existente en la EA con el empleo de dabigatrán produjo una mejora en la patogenia de la EA. Prevemos que otros AOD, como los inhibidores de factor Xa, pueden tener un efecto beneficioso similar en la EA. La reorientación del objetivo de un fármaco ya autorizado, como un AOD, para la indicación en una nueva enfermedad, como la EA, se traduce en una transición más rápida de la experimentación a la cabecera de los pacientes y en una mayor repercusión clínica.

La EA es una enfermedad multifactorial, y los esfuerzos para controlarla deben centrarse en el desarrollo de tratamientos personalizados con múltiples fármacos dirigidos a los diferentes mecanismos que contribuyen a producir la patología de cada individuo, en vez de en un enfoque de "1 diana, 1 tratamiento", que no ha dado buenos resultados hasta el momento. Nuestros estudios indican que un mecanismo patológico que merece la pena abordar en la EA es el estado procoagulante, aunque también hay otros factores contribuyentes que deben tratarse en consecuencia.

**LIMITACIONES DEL ESTUDIO.** Una de las limitaciones de la anticoagulación en la EA es el aumento de la inci-

dencia de hemorragias intracerebrales en los pacientes con EA debido a la presencia de microhemorragias cerebrales (47) y al depósito de A $\beta$  en los vasos, como en la angiopatía amiloide cerebral (AAC) (48). La incidencia de estas dos vasculopatías está relacionada también con una peor función cognitiva y se está debatiendo el uso apropiado de fármacos antitrombóticos en esta población (49). El dabigatrán presenta un riesgo bajo de hemorragia intracraneal (24, 25) y no fomenta la formación de microhemorragias cerebrales en los ratones con EA (50). Además, no observamos hemorragias ni incidentes de hemorragia intracerebral en ninguno de nuestros animales (datos no presentados). No obstante, el uso de dabigatrán u otros fármacos antitrombóticos en pacientes con EA y una AAC amplia y microhemorragias cerebrales requerirá una evaluación cuidadosa por parte de un equipo de expertos en corazón-cerebro para asegurarse de que su uso aporta un beneficio superior al riesgo hemorrágico causado (49). Sin embargo, si el dabigatrán se utiliza en una fase temprana del curso de la enfermedad, es posible que el A $\beta$  se elimine de manera más eficiente a través de la BHE, y que con ello se reduzca su depósito en los vasos corticales y leptomeníngeos que forma la AAC. Además, dado que el aumento de formación de coágulos en la EA es un proceso crónico, es posible que un tratamiento a largo plazo con dosis bajas de dabigatrán sea suficiente para producir un efecto terapéutico en la EA. La dosis empleada en este estudio es inferior a la que se ha utilizado en otros estudios realizados en animales (26, 42, 51). Dado que la semivida del dabigatrán etexilato en los ratones es breve (~15 min) y puesto que el dabigatrán es 2 veces menos eficaz en la inhibición de la trombina en el ratón que en la humana (23), en los ratones es necesaria una dosis supraterapéutica para alcanzar unas concentraciones plasmáticas similares a las del fármaco en el ser humano. Aunque serán necesarios más estudios para extrapolar cuidadosamente la anticoagulación a largo plazo alcanzada en nuestros ratones con EA al ser humano, la dosis que nosotros utilizamos produjo unas concentraciones del dabigatrán en plasma similares a las que se han descrito en pacientes tratados con anticoagulación a largo plazo (52). Además, a pesar de que el dabigatrán presenta un perfil farmacocinético predecible (22), la anticoagulación a largo plazo en la población con EA frágil, envejecida y con comorbilidades puede obtener un beneficio con un programa de medicación individualizado.

## CONCLUSIONES

La anticoagulación a largo plazo con dabigatrán inhibe la trombina y el depósito anormal de fibrina en el cerebro con EA, con lo que preserva el flujo sanguíneo y facilita el aporte de oxígeno y nutrientes al cerebro. A su vez, este



fármaco ejerce un efecto beneficioso en el control de la neuroinflamación, manteniendo la integridad y la funcionalidad de la BHE y facilitando la eliminación del A $\beta$  (**ilustración central**). Así pues, los tratamientos destinados a normalizar el entorno protrombótico existente en la EA, en combinación con otros compuestos modificadores de la enfermedad, podrían proporcionar una mejora en la patogenia de la EA.

**AGRADECIMIENTOS** Los autores dan las gracias al Centre for Research in Neurodegenerative Diseases de la University of Toronto (Toronto, Ontario, Canadá) y al Center for Neurodegenerative Disease Research de la University of Pennsylvania (Filadelfia, Pennsylvania, Estados Unidos) por haberles proporcionado amablemente los ratones TgCRND8 y el anticuerpo NAB61, respectivamente. El escáner de RM de 7-T utilizado forma parte del ReDiB de Infraestructuras Científico-Técnico Singulares (ICTS). Los autores dan las gracias también al Dr. Jay L. Degen por haberles proporcionado el anticuerpo para la fibrina (fibrinógeno), a los Drs. Ashley Goss y Joanne Van Ryn de Boehringer Ingelheim Pharma por haberles proporcionado el alimento de los animales e información sobre el mecanismo de acción del dabigatrán, a Marina Saiz por su ayuda durante el proyecto de verano CICERONE, a Carlos Galán-Arriola por su inestimable ayuda en la realización de la **ilustración central** y a las Unidades de Histo-

patología y de Microscopía del CNIC por su apoyo en la tinción del tejido cerebral.

**DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:** Dr. Marta Cortes-Canteli, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029, Madrid, España. Correo electrónico: mcortes@cnic.es. Twitter: @mcartescanteli.

## PERSPECTIVAS

### COMPETENCIAS EN CONOCIMIENTO MÉDICO:

La EA tiene una etiología multifactorial y la trombosis es uno de los mecanismos que intervienen en ella. En un modelo de la EA en ratones transgénicos, la anticoagulación a largo plazo con dabigatrán redujo el depósito de fibrina, la neuroinflamación, el depósito de amiloide y el deterioro cognitivo.

### PERSPECTIVA TRASLACIONAL:

Los resultados concordantes de otros estudios realizados en modelos animales respaldarían la realización de ensayos clínicos del tratamiento antitrombótico en la prevención o la mejora de la EA.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 2018;25:59-70.
- Iadecola C, Gottesman R. Cerebrovascular alterations in Alzheimer disease: incidental or pathogenic? *Circ Res* 2018;123:406-8.
- Picano E, Bruno RM, Ferrari GF, Bonuccelli U. Cognitive impairment and cardiovascular disease: so near, so far. *Int J Cardiol* 2014;175:21-9.
- de la Torre JC. Alzheimer's Turning Point. A Vascular Approach to Clinical Prevention. 1st edition. New York, NY: Springer International Publishing, 2016.
- Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 2018;14:133-50.
- Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2017;18:419-34.
- Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* 2013;80:844-66.
- Cortes-Canteli M, Zamołodchikov D, Ahn HJ, Strickland S, Norris EH. Fibrinogen and altered hemostasis in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012;32:599-608.
- Zamołodchikov D, Strickland S. A possible new role for Abeta in vascular and inflammatory dysfunction in Alzheimer's disease. *Thromb Res* 2016;141 Suppl 2:S59-61.
- Cortes-Canteli M, Paul J, Norris EH, et al. Fibrinogen and beta-amyloid association alters thrombolysis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease. *Neuron* 2010;66:695-709.
- Cortes-Canteli M, Mattei L, Richards AT, Norris EH, Strickland S. Fibrin deposited in the Alzheimer's disease brain promotes neuronal degeneration. *Neurobiol Aging* 2015;36:608-17.
- Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, et al. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2017;39:231-8.
- Ahn HJ, Zamołodchikov D, Cortes-Canteli M, Norris EH, Glickman JF, Strickland S. Alzheimer's disease peptide {beta}-amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:21812-7.
- Zamołodchikov D, Berk-Rauch HE, Oren DA, et al. Biochemical and structural analysis of the interaction between  $\beta$ -amyloid and fibrinogen. *Blood* 2016;128:1144-51.
- Zamołodchikov D, Strickland S. Abeta delays fibrin clot lysis by altering fibrin structure and attenuating plasminogen binding to fibrin. *Blood* 2012;119:3342-51.
- Paul J, Strickland S, Melchor JP. Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *J Exp Med* 2007;204: 1999-2008.
- Strickland S. Blood will out: vascular contributions to Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 2018; 128:556-63.
- Walsh AC, Walsh BH, Melaney C. Senile-presenile dementia: follow-up data on an effective psychotherapy-anticoagulant regimen. *J Am Geriatr Soc* 1978;26:467-70.
- Ratner J, Rosenberg G, Kral VA, Engelsmann F. Anticoagulant therapy for senile dementia. *J Am Geriatr Soc* 1972;20:556-9.
- Bergamaschini L, Rossi E, Storini C, et al. Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004;24:4181-6.
- Timmer NM, van Dijk L, van der Zee CE, Kiliaan A, de Waal RM, Verbeek MM. Enoxaparin treatment administered at both early and late stages of amyloid beta deposition improves cognition of APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice with differential effects on brain Abeta levels. *Neurobiol Dis* 2010;40:340-7.
- Shameem R, Ansell J. Disadvantages of VKA and requirements for novel anticoagulants. *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26:103-14.
- van Ryn J, Goss A, Huel N, et al. The discovery of dabigatran etexilate. *Front Pharmacol* 2013;4:12.
- Garnock-Jones KP. Dabigatran etexilate: a review of its use in the prevention of stroke and systemic embolism in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011;11:57-72.

25. Hart RG, Diener HC, Yang S, et al. Intracranial hemorrhage in atrial fibrillation patients during anticoagulation with warfarin or dabigatran: the RE-LY trial. *Stroke* 2012;43:1511-7.
26. Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Nietert PJ, Akter T, van Ryn J, Silver RM. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 2011;63:1416-25.
27. Pollack CV Jr., Reilly PA, van Ryn J, et al. Idarucizumab for dabigatran reversal—full cohort analysis. *N Engl J Med* 2017;377:431-41.
28. Chishti MA, Yang DS, Janus C, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 2001;276:21562-70.
29. Cortes-Canteli M, Luna-Medina R, Sanz-Sancristobal M, Alvarez-Barrientos A, Santos A, Perez-Castillo A. CCAAT/enhancer binding protein beta deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 2008;121:1224-34.
30. Stangier J, Clemens A. Pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009;15 Suppl 1:9S-16S.
31. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:101-12.
32. Lee EB, Leng LZ, Zhang B, et al. Targeting amyloid-beta peptide (Aβ) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Aβ precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem* 2006;281:4292-9.
33. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, et al. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4012-7.
34. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2015;14:388-405.
35. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, et al. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* 2008;28:11650-61.
36. Yang C, Huang X, Huang X, et al. Aquaporin-4 and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2016;52:391-402.
37. Park L, Zhou J, Zhou P, et al. Innate immunity receptor CD36 promotes cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:3089-94.
38. Canobbio I, Visconte C, Oliviero B, et al. Increased platelet adhesion and thrombus formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Signal* 2016;28:1863-71.
39. Wierenga CE, Hays CC, Zlatar ZZ. Cerebral blood flow measured by arterial spin labeling MRI as a preclinical marker of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014;42 Suppl 4:S411-9.
40. Tripathy D, Sanchez A, Yin X, Luo J, Martinez J, Grammas P. Thrombin, a mediator of cerebrovascular inflammation in AD and hypoxia. *Front Aging Neurosci* 2013;5:19.
41. Petersen MA, Ryu JK, Akassoglou K. Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat Rev Neurosci* 2018;19:283-301.
42. Marangoni MN, Braun D, Situ A, et al. Differential effects on glial activation by a direct versus an indirect thrombin inhibitor. *J Neuroimmunol* 2016;297:159-68.
43. Winkler EA, Sagare AP, Zlokovic BV. The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol* 2014; 24:371-86.
44. Sengillo JD, Winkler EA, Walker CT, Sullivan JS, Johnson M, Zlokovic BV. Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2013;23:303-10.
45. Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010; 468:557.
46. Friberg L, Rosenqvist M. Less dementia with oral anticoagulation in atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2018;39:453-60.
47. Martinez-Ramirez S, Greenberg SM, Viswanathan A. Cerebral microbleeds: overview and implications in cognitive impairment. *Alzheimers Res Ther* 2014;6:33.
48. Banerjee G, Carare R, Cordonnier C, et al. The increasing impact of cerebral amyloid angiopathy: essential new insights for clinical practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017;88:982-94.
49. DeSimone CV, Graff-Radford J, El-Harasis MA, Rabinstein AA, Asirvatham SJ, Holmes DR Jr. Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis, clinical implications, and management strategies in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:1173-82.
50. Marinescu M, Sun L, Fatar M, et al. Cerebral microbleeds in murine amyloid angiopathy: natural course and anticoagulant effects. *Stroke* 2017;48:2248-54.
51. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, et al. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice: dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012;26:367-74.
52. Reilly PA, Lehr T, Haertter S, et al. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *J Am Coll Cardiol* 2014;63:321-8.
53. Porchet R, Probst A, Bouras C, Draberova E, Draber P, Riederer BM. Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Proteomics* 2003;3:1476-85.

---

**PALABRAS CLAVE** modelos animales de enfermedad humana, deterioro cognitivo, neuroinflamación, anticoagulación oral, trombina, trombosis

---

**APÉNDICE** Consúltense el apartado de Métodos ampliado en la versión online de este artículo.