



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

MODULACIÓN DE TDP-43 POR INHIBIDORES DE SU REGULADOR TTBK1: UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Autor/es: María Martín Redolar

Villaviciosa de Odón, *Junio 2023*

ANEXO IX

Título del Trabajo: MODULACIÓN DE TDP-43 POR INHIBIDORES DE SU REGULADOR TTBK1: UNA NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de investigación de Química Médica y Biológica traslacional dentro del centro de Investigaciones Biológicas – Margarita Salas



Tutor/es: Ana Martínez Gil y María Teresa Coiras López

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	5
II. INTRODUCCIÓN.....	6
1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	6
2. PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.....	7
3. BIOLOGÍA Y FUNCIONES FISIOPATOLÓGICAS DE TDP-43.....	8
3.1 <i>Biología y función de TDP-43.....</i>	9
3.2 <i>Patología de TDP-43.....</i>	10
4. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TDP-43.....	11
4.1 <i>Tau tubulina quinasa (TTBK).....</i>	12
III. OBJETIVOS.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES CANDIDATOS A FÁRMACO.....	15
1.1 <i>Inhibidores.....</i>	15
1.2 <i>Actividad enzimática TTBK1.....</i>	16
1.3 <i>Predicción del paso de la barrera hematoencefálica de los compuestos.....</i>	16
2. CULTIVOS CELULARES.....	18
2.1 <i>Ensayo de viabilidad celular.....</i>	18
2.2 <i>Ensayo de neuroprotección frente al ácido etacrínico.....</i>	19
2.3 <i>Ensayos de Western Blot.....</i>	19
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
V. RESULTADOS.....	21
1. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES CANDIDATOS A FÁRMACOS.....	21
1.1 <i>Evaluación enzimática de la inhibición de TTBK1.....</i>	21
1.2 <i>Predicción del paso de BHE de los inhibidores de TTBK1.....</i>	22
2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS INHIBIDORES CANDIDATOS A FÁRMACOS EN EL MODELO CELULAR SH-SY5Y.....	26
2.1 <i>Evaluación de la viabilidad celular.....</i>	26
2.2 <i>Evaluación de la neuroprotección frente al ácido etacrínico.....</i>	26
2.3 <i>Estudio de la disminución de los niveles de pTDP-43.....</i>	27
VI. DISCUSIÓN.....	28
VII. CONCLUSIONES.....	30
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	31
IX. ANEXOS.....	34

ABREVIATURAS

- ADME:** Adsorción, distribución, metabolismo y excreción
- AE:** Ácido etacrínico
- AxD:** Enfermedad de Alexander
- BHE:** Barrera hematoencefálica
- CDC7:** Quinasa del ciclo de división celular 7
- CI₅₀:** Concentración inhibitoria del 50 %
- CK:** Caseína quinasas
- DFT:** Demencia frontotemporal
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EA:** Enfermedad de Alzheimer
- ELA:** Esclerosis Lateral Amiotrófica
- ELAe:** Esclerosis Lateral Amiotrófica Esporádica
- ELAf:** Esclerosis Lateral Amiotrófica Familiar
- EN:** Enfermedades neurodegenerativas
- EP:** Enfermedad de Parkinson
- EtOH:** Etanol
- GSK3:** Glucógeno quinasa sintasa 3
- hnRNP:** Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
- LATE:** Encefalopatía predominantemente límbica relacionada con la edad y TDP-43
- NES:** Señal de exportación nuclear
- NLS:** Señal de localización nuclear
- NMI:** Neuronas motoras inferiores
- NMS:** Neuronas motoras superiores
- PBS:** Tampón fosfato salino
- Pe:** Permeabilidad efectiva
- PTM:** Modificaciones post-traduccionales
- RNP:** ribonucleoproteína
- SNC:** Sistema nervioso central
- TDP-43:** Proteína de unión al ADN/ARN de respuesta transactiva de 43 KDa

I. RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa rara que causa la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores del cerebro y de la médula espinal. Esta patología, al igual que muchas enfermedades neurodegenerativas, es de origen desconocido y multifactorial, por lo que la muerte neuronal viene desencadenada por la alteración patológica de diversos procesos celulares. Sin embargo, se han encontrado agregaciones citoplasmáticas de la proteína de unión a ADN/ARN de respuesta transactiva de 43 KDa (TDP-43) en el 97% de los pacientes con ELA, considerándose la característica principal de la enfermedad. TDP-43 es una proteína de localización nuclear encargada de regular la expresión de más de 600 ARNm, sin embargo, en condiciones patológicas, se produce la traslocación de la proteína al citoplasma donde puede sufrir distintas modificaciones post-traduccionales anómalas como la hiperfosforilación, favoreciendo el depósito de agregados y como consecuencia, la muerte neuronal. Son distintas las quinasas involucradas en los procesos de fosforilación de TDP-43, siendo TTBK1 la diana de interés en el presente trabajo. TTBK1 es una tau-tubulina quinasa que se expresa específicamente en el sistema nervioso central humano y es capaz de fosforilar *in vivo* la proteína TDP-43. En este trabajo se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de diferentes compuestos para los que se estudió su actividad inhibitoria y selectividad frente a TTBK1, su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y su efecto neuroprotector mediante la disminución de los niveles de TDP-43 fosforilados. Los resultados obtenidos parecen mostrar un efecto neuroprotector de los inhibidores selectivos frente a TTBK1 y como consecuencia, validan la posibilidad de abordar una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la ELA.

II. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) son un conjunto de patologías que constituyen un problema en el ámbito de la salud pública global. Hoy en día, debido al aumento de la esperanza de vida, se ha observado un incremento de casos de este tipo de enfermedades, pues se estima que 46 millones de personas a nivel mundial presentan algún tipo de trastorno neurodegenerativo(1). Además, debido a los grandes avances de la medicina, se prevé que el número de personas de avanzada edad siga aumentando en las próximas décadas, hecho que irá acompañado de un mayor número de afectados en este tipo de enfermedades.

Estas neuropatologías se caracterizan por causar la degeneración de determinadas clases de neuronas, produciendo distintas sintomatologías clínicas dependiendo del tipo de enfermedad. Dentro de las EN más frecuentes se encuentra la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La ELA, también conocida como Enfermedad de Charcot en Francia, fue descrita en 1870 por el neurobiólogo Jean-Martin Charcot. No obstante, la condición ganó notoriedad a nivel social en 1939 después de que el jugador de béisbol Lou Gehrig fuera diagnosticado con dicha enfermedad. Por ello, en conmemoración del jugador, también se conoce como Enfermedad de Lou Gehrig en Estados Unidos (2).

Esta EN rara se caracteriza por la degeneración de neuronas motoras superiores (NMS) y neuronas motoras inferiores (NMI) generando una parálisis muscular progresiva. Las motoneuronas se encargan de producir la transmisión del impulso nervioso desde el cerebro hasta los músculos. Por ello, la afectación de las NMS produce una serie de síntomas entre los que se incluye rigidez muscular, espasmos, hiperflexia y reflejos patológicos, y, por otro lado, la afectación de las NMI provoca atrofia y debilidad muscular. Esta enfermedad produce discapacidad y dependencia total en los pacientes y, además, suele progresar a gran velocidad, causando la muerte de los enfermos por insuficiencia cardiorrespiratoria entre el tercer y el quinto año después del diagnóstico de la enfermedad (3).

Actualmente no hay ningún tratamiento eficaz para la ELA. Por ello, existe gran necesidad y urgencia en llevar a cabo estrategias terapéuticas efectivas, no solo para retrasar la progresión de la enfermedad, sino también para poder hacer frente a todas las consecuencias que produce, como, por ejemplo, deterioro cognitivo, insuficiencia respiratoria, disfagia (dificultad para tragar), calambres musculares, espasticidad, debilidad o atrofia musculares.

2. PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La ELA se caracteriza por ser una enfermedad muy heterogénea con causa aún desconocida y cuyos principales factores son genéticos, ambientales y de estilo de vida. Hoy en día, los pacientes se agrupan en dos tipos de ELA. En la mayoría de los enfermos, la causa patológica de la enfermedad es desconocida (ELA esporádica, ELAe) y alrededor del 5% de los casos tienen antecedentes familiares (ELA familiar, ELAf), lo cual está asociado principalmente a mutaciones en distintos tipos de genes entre los que se encuentra *TARDBP* (codifica a TDP43), *SOD1* (codifica a la superóxido dismutasa), *C9orf72* (codifica a la proteína de marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9) y *FUS* (codifica a la proteína de unión al ARN FUS) (4).

Independientemente de la causa de la enfermedad, ambos grupos comparten los mecanismos celulares alterados que subyacen en la ELA. Dentro de los principales mecanismos patológicos de la ELA se encuentra el metabolismo aberrante del ARN, la agregación proteica, la disfunción mitocondrial y un aumento en el estrés oxidativo. Además, hay otros mecanismos de la ELA que pueden alterar directamente la función neuronal y disfunción de células gliales, como, por ejemplo, el deterioro de la exportación nuclear, la falta de regulación en el transporte vesicular y el deterioro de la reparación del ADN. Por otro lado, la hiperexcitabilidad neuronal y la disfunción axónica también forman parte de los mecanismos celulares alterados en la enfermedad (Figura 1) (5).

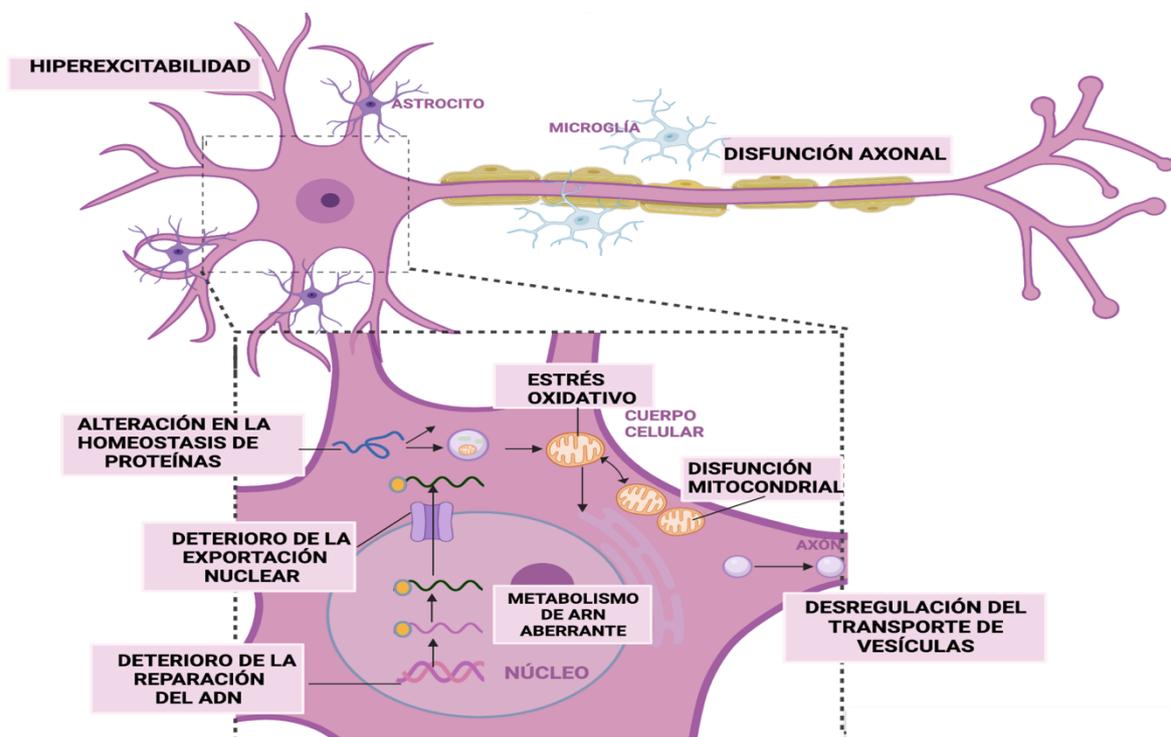


Figura 1: Principales mecanismos patológicos de la ELA. Imagen creada con BioRender.com (6).

3. BIOLOGÍA Y FUNCIONES FISIOPATOLÓGICAS DE TDP-43

Los mecanismos fisiopatológicos fundamentales de la ELA descritos previamente, todavía no se conocen bien, sin embargo, se sabe que la agregación y acumulación de inclusiones proteicas en las motoneuronas son el sello patológico de la enfermedad. Dichas inclusiones no solo ocurren en la ELA, sino que también aparecen en otras EN como en la demencia frontotemporal (DFT), en la encefalopatía predominantemente límbica relacionada con la edad y TDP-43 (LATE) y en la enfermedad de Alexander (AxD), entre otras.

Este tipo de patología se denomina proteinopatía y hace referencia a la acumulación de proteínas específicas en el sistema nervioso central (SNC). En condiciones normales, dichas proteínas no están estructuradas y son monoméricas en el cerebro, mientras que en condiciones patológicas se producen cambios conformacionales en las mismas dando lugar a la formación de estructuras agregadas.

En la mayoría de los tipos de ELA, TDP-43 es el principal constituyente de dichas inclusiones. El 97% de los pacientes tienen características de una proteinopatía TDP-43 produciéndose un agotamiento de la proteína en el núcleo y la formación de agregados citoplasmáticos con morfología compacta (5). Por este motivo, la ELA es considerada actualmente como una TDP-43-patía.

3.1 Biología y función de TDP-43

TDP-43 es una proteína nuclear de 414 aminoácidos que forma parte de la familia de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP). Esta proteína expresada de manera ubicua y con unión a ADN y ARN, se encuentra codificada por *TARDBP*, gen localizado en el cromosoma 1.

En cuanto a su estructura, TDP-43 se caracteriza por tener una región N-terminal (1-102 aa) con una señal de localización nuclear (NLS) (82-98 aa). Además, contiene dos motivos, RRM1 (104-176 aa) y RRM2 (192-262 aa), que aportan a la proteína la capacidad de unirse a ARN con elevada especificidad y un motivo con una secuencia señal de exportación nuclear (NES) (239-250 aa) que ayuda al transporte del ARNm al citoplasma. Por último, el extremo C-terminal (274-414 aa) con una región rica en glutamina/asparagina muy similar al de un prión y un dominio rico en glicina (366-414 aa) que interviene en la interacción entre proteínas. En este último dominio es donde se produce la mayor parte de las mutaciones de TDP-43 y consecuentemente, los cambios en su estructura y formación de agregaciones proteicas (Figura 2) (6).

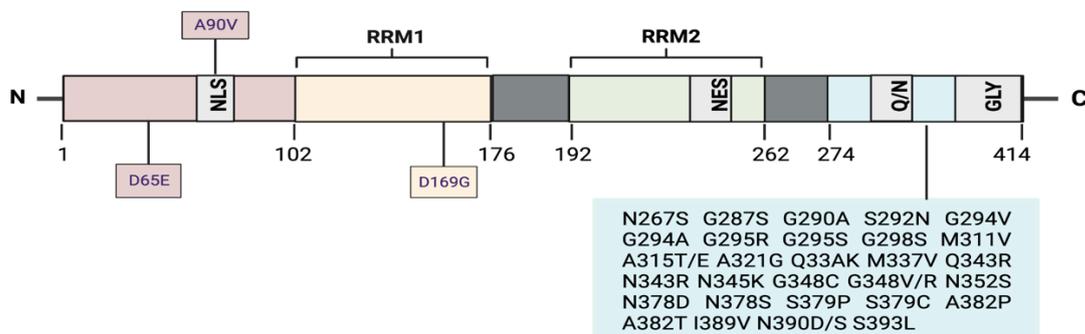


Figura 2: Representación de la estructura de TDP-43 y descripción de las principales mutaciones que se pueden dar en cada dominio de la proteína en la ELA. Imagen creada con BioRender.com (6).

TDP-43 está implicada en diversos procesos celulares ya que participa en el metabolismo de diferentes tipos de ARN. A nivel nuclear, realiza varias funciones relacionadas con el ARNm como la transcripción y el proceso de *splicing*. Esta proteína también parece estar involucrada en la biosíntesis de microARN, moléculas cortas de ARN no codificante que median la regulación epigenética de la expresión génica a nivel post-transcripcional. TDP-43 es predominantemente una proteína nuclear, pero puede desplazarse al citoplasma. A nivel citoplasmático, está implicada en el transporte, estabilidad y traducción de ARNm, y en la formación de gránulos de transporte de ribonucleoproteína (RNP). Por otro lado,

participa en la regulación de la expresión génica en situaciones de estrés celular. (Figura 3)(7).

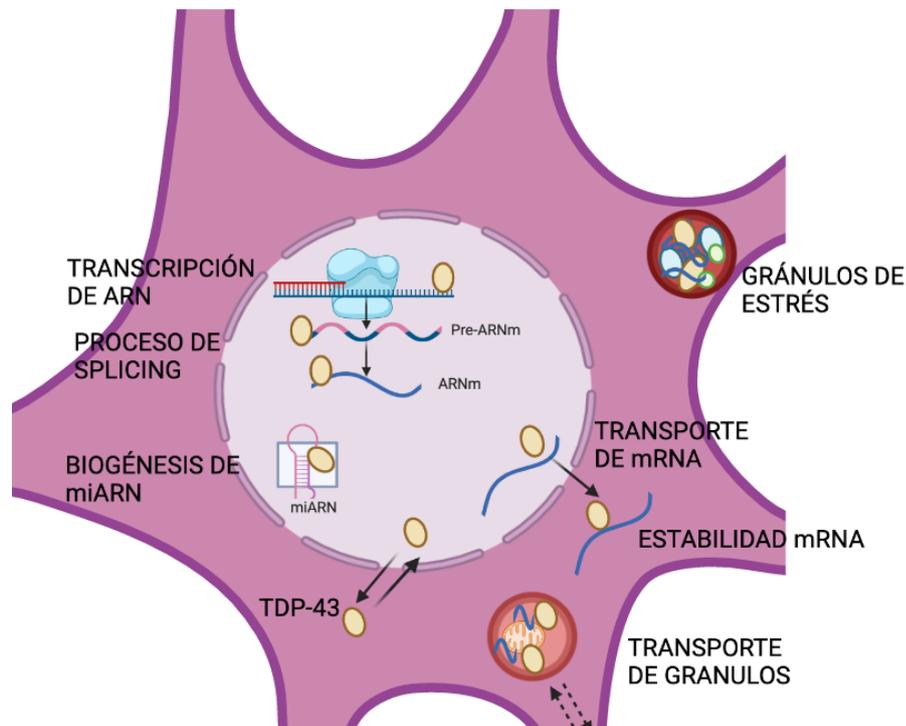


Figura 3: Funciones de TDP-43 en el núcleo y citoplasma celular. Imagen creada con BioRender.com (6).

3.2 Patología de TDP-43

Las mutaciones genéticas, el estrés ambiental y otros factores como el envejecimiento, pueden producir modificaciones post-traduccionales en TDP-43 y, además, alterar el equilibrio núcleo-citosólico de la proteína. Como consecuencia, se modifica su homeostasis dando lugar a la muerte neuronal (7).

La fosforilación anómala de TDP-43 es la modificación post-traducciona (PTM) más significativa en esta patología, pues se han identificado acumulaciones de la proteína hiperfosforilada (pTDP-43) en células gliales y en neuronas de un elevado número de casos de ELAf y ELAe.

TDP-43 tiene distintos tipos de residuos que pueden actuar como sitios de fosforilación, como son los 41 residuos de serina, o los 15 de treonina u 8 de tirosina. Dentro de estos residuos, predomina la fosforilación de distintas serinas como la Ser-379, Ser-403, Ser-404, Ser-409 y Ser-410. Cabe destacar la fosforilación de la Ser-409 y Ser-410 ya que está especialmente asociada a la patología del ELA.

Las proteínas que tienen la capacidad de modular y fosforilar TDP-43 son varios tipos de proteína quinasas. Dentro de estas, se incluyen la caseína quinasa 1 (CK-1), la glucógeno sintasa 3 (GSK3), la quinasa del ciclo de división celular 7 (CDC7), las proteínas quinasas activas por mitógenos (MAPK/ERK) y las tau tubulina quinasas (TTBK1 y TTBK2) (8).

Aunque no está del todo claro el significado fisiológico de la hiperfosforilación de la proteína TDP-43, numerosos estudios aseguran que tiene efectos tóxicos, debido a que se ha observado que sólo se presenta en estados patológicos y únicamente a nivel citoplasmático. Se ha podido demostrar que en la corteza cerebral de pacientes con ELA hay acumulaciones de fragmentos C-terminales fosforilados, mientras que en las células de la médula espinal predominan los agregados de pTDP-43 de longitud completa (9). Por lo tanto, la fosforilación de TDP-43 se puede asociar a una mala localización citoplasmática y agregación de la proteína, produciendo así una desregulación de la homeostasis proteica y degradación neuronal.

4. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TDP-43

TDP-43 se ha convertido en un objetivo terapéutico para desarrollar tratamientos efectivos de varias EN (7). Una estrategia clave para evitar la hiperfosforilación de TDP-43 y prevenir la formación de agregados proteicos en el citoplasma puede ser la utilización de inhibidores de proteína quinasas que producen dicha fosforilación (8). Las proteínas quinasas son capaces de transferir un grupo fosfato desde la molécula de ATP a las serinas, tirosinas o treoninas del sustrato. Con su función, ejercen un papel importante en el organismo, pues son clave para que se lleve a cabo el desarrollo normal de varios eventos fisiológicos, especialmente los relacionados con la regulación de la señalización celular. Por ello, representan un gran enfoque terapéutico para distintos tipos de enfermedades.

Durante las últimas décadas, alrededor de 80 inhibidores de quinasas han llegado al mercado para el tratamiento de diferentes trastornos como fibrosis, artritis y cáncer (10). TTBK1, GSK-3, CDC7 y CK-1 son las quinasas implicadas en la hiperfosforilación de TDP-43 que más se han estudiado como dianas terapéuticas para distintas EN, como es el caso de la ELA y de la DFT.

4.1 Tau tubulina quinasa (TTBK)

Tau tubulina quinasa (TTBK) es una tirosina y serina/treonina quinasa involucrada en diferentes mecanismos moleculares en el interior celular. Esta quinasa forma parte de la superfamilia de la caseína quinasa 1 (CK-1) y tiene dos isoformas, TTBK1 y TTBK2 (11). Ambas isoformas se localizan con inclusiones de TDP-43 en la médula espinal de pacientes con ELA y se ha demostrado que fosforilan tanto la Ser409 como la Ser410, residuos clave en el proceso de deposición de TDP-43.

Las isoformas de TTBK están codificadas a partir de distintos genes y por ello se localizan en tejidos distintos. En el caso de TTBK2 se localiza de manera ubicua por todo el cuerpo y realiza funciones fundamentales en gran cantidad de mecanismos celulares como la ciliogénesis, dinámica de microtúbulos y tráfico de neurotransmisores, por ello, su inhibición podría desencadenar efectos adversos para los pacientes(12). Por otro lado, TTBK1, se encuentra específicamente expresada en el SNC humano especialmente en el cerebro y en la corteza cerebral (13). Por ello, los inhibidores de TTBK1, pueden ser unos candidatos ideales para reducir, de manera selectiva, la fosforilación de TDP-43 (8)

TTBK1 fue descrita por primera vez en 2006 como una quinasa de neuronas responsable de fosforilar y producir agregados de tau. El gen humano que codifica para TTBK1 se encuentra localizado en el cromosoma 6 y consta de 14 exones y 15 intrones. La quinasa TTBK1 está formada por 1321 aminoácidos y posee un dominio quinasa (34-297 aa) y un dominio de poliglutamato único (733-771 aa) (14) (Figura 4).

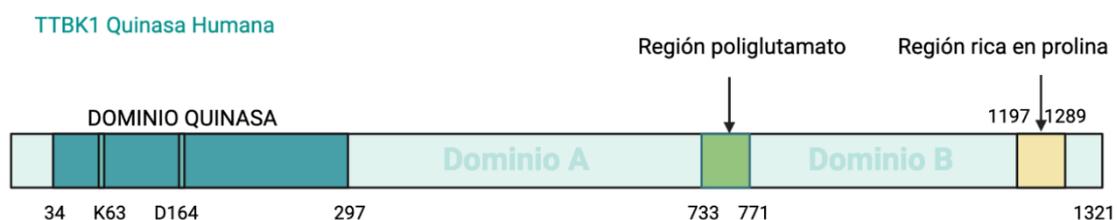


Figura 4: Esquema que representa las diferentes regiones de la estructura primaria de TTBK1. Imagen creada con BioRender.com (11).

Hoy en día, se conoce únicamente la estructura tridimensional del dominio quinasa de la proteína y se sabe que es similar a la de otras proteínas quinasas. Esta región consta de un dominio C-terminal formado por hélices α y un dominio N-terminal formado por láminas β . Ambas regiones se encuentran unidas por una larga región de bisagra (108-111 aa) en la que se localiza el sitio de unión al ATP. El dominio N-terminal contiene un

bucle P (178-202 aa) y, por otro lado, el dominio C-terminal contiene el motivo DFG (176-178 aa) y el bucle de activación flexible (178-202 aa) (Figura 5) (14).

El motivo DFG formado por aspártico, fenilalanina y glicina, es una parte importante en el sitio de unión al ATP ya que es el que produce la unión con el ión Mg^{2+} el cual es necesario para que la proteína pueda realizar su actividad catalítica (14)

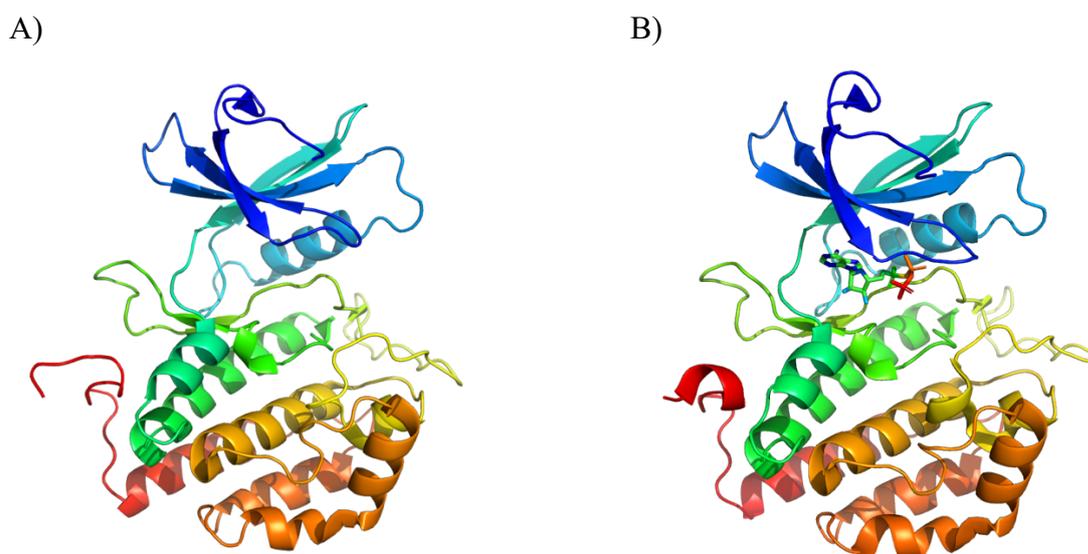


Figura 5 Estructuras cristalinas de TTBK1 depositadas en PDB. A) Estructura de la APO de TTBK1 (código PDB: 4NFM). B) Estructura de TTBK1 unida a ATP (código PDB: 4BTF)

Actualmente, hay diferentes inhibidores descritos en la literatura para TTBK. Dentro de estos se encuentran la dimetoxiquinazolina (AZ-1), la pirrolopirimidina (AZ-2), bromofenol (2KC) y por último el azaindol 31 (Figura 6). Mediante cristalografía, se ha demostrado que los cuatro compuestos se unen al mismo dominio que el ATP. Sin embargo, estos inhibidores ATP-competitivos no son selectivos para TTBK1 ya que regulan de manera muy similar las dos isoformas de TTBK (15)(16).

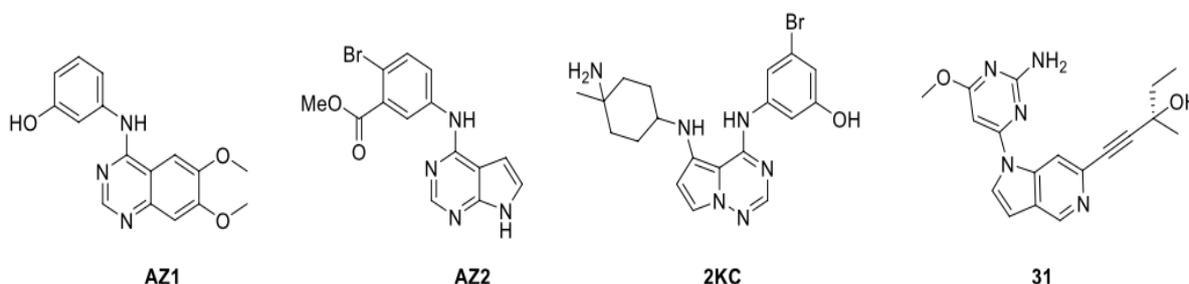


Figura 6: Estructura química de los inhibidores de TTBK1 y TTBK2 (15)

Por otro lado, el grupo de Química Médica y Biológica Traslacional ha sintetizado una familia de moléculas pequeñas que resultan ser inhibidores muy potentes y 20 veces selectivos en TTBK1 frente a la isoforma TTBK2 (Figura 7). Se ha demostrado que estos compuestos derivados de pirrolopirimidina disminuyen la fosforilación de TDP-43. Así mismo estos compuestos reducen los niveles citosólicos de TDP-43 con recuperación de su localización a nivel nuclear tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (17)

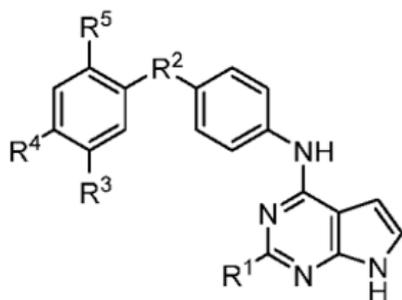


Figura 7: Estructura química de los inhibidores de TTBK1 (17)

Estos compuestos selectivos en TTBK1 podrían llegar a considerarse fármacos nuevos para el tratamiento de la ELA y otras TDP-43-patías y por ello, este grupo de investigación ha sintetizado nuevos compuestos a partir de modificaciones estructurales en dichos inhibidores, con el objetivo de incrementar la selectividad y potencia de inhibición de TTBK1 (Figura 8).

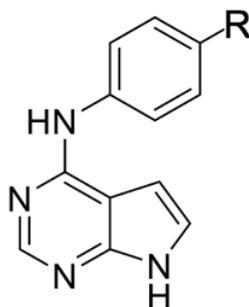


Figura 8: Estructura química común de todos los compuestos sintetizados para este estudio.

III. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es demostrar la potencialidad terapéutica de nuevos inhibidores selectivos de la quinasa TTBK1 como grandes candidatos a fármacos para el tratamiento de la ELA y otras TDP-43-patías.

Para ello, se van a tratar los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad enzimática de los posibles candidatos a fármacos previamente sintetizados.
2. Estudiar el paso de inhibidores de TTBK1 a través de la barrera hematoencefálica (BHE) con el fin de seleccionar aquellos capaces de llegar al Sistema Nervioso Central.
3. Estudiar la viabilidad en cultivos celulares de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
4. Evaluar la neuroprotección de los inhibidores candidatos a fármaco en la línea celular SH-SY5Y después de su exposición frente al ácido etacrínico (AE).
5. Demostrar la disminución de los niveles de pTDP-43 tras el tratamiento con inhibidores de TTBK1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES CANDIDATOS A FÁRMACO

1.1 Inhibidores

Los compuestos utilizados a partir de un stock de 10 mM son inhibidores específicos de TTBK1, quinasa involucrada en la ELA. Estos compuestos han sido sintetizados previamente en el grupo de investigación de Química Médica y Biológica Traslacional del Centro de Investigaciones Biológicas-Margarita Salas.

Para la realización de este estudio se parte de nueve compuestos (VNG-3.15, VNG-3.56, VNG-3.58, VNG-3.65, VNG-3.67, CSS-1.32, CSS-1.32N, CSS-1.37 y CSS-1.38) a los que se les ha realizado previamente un cribado donde se ha observado que a 10 μ M podían inhibir, al menos, el 50% de la actividad enzimática de TTBK1.

1.2 Actividad enzimática TTBK1

En un primer estudio, se realiza un ensayo de actividad enzimática utilizando el Kit de Kinase-Glo (Promega V3771) con el objetivo de determinar la concentración a la cual los compuestos seleccionados son capaces de inhibir el 50% de la actividad enzimática (CI₅₀).

En un ensayo típico, se utilizan placas de 96 pocillos blancas. A cada pocillo se añaden 10 ng de enzima TTBK1 expresada y purificada en este grupo de investigación. Además, se adiciona el sustrato (0,2 µg/µL de caseína), el ATP (1 µM) y el inhibidor a 5 concentraciones distintas de compuesto, siendo el volumen final de la reacción de 40µL. Tras un periodo de incubación de una hora a temperatura ambiente y agitación, se detiene la reacción enzimática con 40 µL del reactivo Kinase-Glo, que interacciona con el ATP restante del pocillo mediante una reacción que emite luz. La luminiscencia, que será proporcional a la cantidad de ATP, se mide utilizando el lector de microplacas Glowmax Promega (ThermoScientific™) después de un periodo de 10 min de incubación. La actividad inhibitoria de cada compuesto se calcula con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

Los estudios de actividad enzimática de TTBK2 se realizaron en la Universidad de Dundee (Escocia, Reino Unido). Los datos de estos estudios serán utilizados en el presente trabajo para poder determinar la selectividad de los compuestos hacia TTBK1.

1.3 Predicción del paso de la barrera hematoencefálica de los compuestos

Para predecir el paso de la BHE de los fármacos se hizo uso de la metodología basada en membranas artificiales PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assays).

Esta metodología simula la BHE empleando un sistema artificial basado en dos placas paralelas separadas por una membrana que contiene un lípido procedente de cerebro porcino(18). La placa donante es una placa de filtrado de 96 pocillos (membrana PDVF de placa estéril, IP Multiscreen®, tamaño de poro de 0,045M) y la placa aceptora se trata de una placa de 96 pocillos (Multiscreen® catalog no. MAMCS9610), ambas dos de Millipore.

En este ensayo se incluyen como controles diez fármacos comerciales de referencia utilizados clínicamente y con permeabilidad cerebral conocida en humanos: Atenolol, cafeína, desiparamina, enoxacina, hidrocortisona, ofloxacina, verapamilo, testosterona,

promazina y piroxicam. Tanto los controles como los fármacos a estudiar, en una cantidad de 2 mg, se disuelven en 5 mL de una solución 70:30 compuesta por tampón fosfato salino (PBS) y etanol (EtOH), respectivamente. Posteriormente, se utilizan unidades de membrana de filtro PDVF de 30nm de diámetro (Symta) para filtrar las muestras y a continuación, se usa un lector de ultravioleta (UV) Varioskan™ (ThermoFisher) de placa de 96 pocillos para realizar un barrido desde una longitud de onda de 220 nm a 400 nm y obtener un espectro de absorción para cada uno de los compuestos.

Una vez conocidas las longitudes de onda a las que absorbe cada compuesto, se lee la absorbancia inicial de los mismos. A continuación, la placa donante de 96 pocillos (Millipore) se recubre con 5 μ L de lípido de cerebro porcino (PBL, Avanti Polar Lipids) disuelto en dodecano (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se añaden 180 μ L de cada muestra. Por otro lado, la microplaca aceptora (Millipore) se llena con 180 μ L de PBS y EtOH (70:30). La placa donante se coloca encima de la aceptora y se deja en reposo por un tiempo de 2 h y 30 min a 25°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se retira la placa donante y el lector de placas UV determina la concentración de los fármacos comerciales y los compuestos en la placa donante y aceptora. Cada muestra se analiza de tres a cinco longitudes de onda, en dos ensayos independientes. Los resultados se detallan como la media y su desviación estándar y se informa del promedio de ambas ejecuciones.

Con los datos obtenidos durante el proceso, se determina la permeabilidad efectiva (Pe) de los compuestos y se establece de manera directa una correlación con la Pe de los 10 fármacos de referencia (Tabla 1). Así se determina la Pe de los candidatos a fármaco según la bibliografía (19). Los compuestos con una Pe superior al valor de la ecuación de la recta, donde $x=4$, se consideran que tienen la capacidad de penetrar al SNC (SNC+) y los compuestos con una Pe inferior al valor de la ecuación de la recta, donde $x=2$, no tienen la capacidad de penetrar al SNC por difusión pasiva (SNC-). Por otro lado, no se puede predecir con certeza si los compuestos cuya Pe se encuentra entre los valores de 2 y 4, son capaces de atravesar la BHE (SNC+/SNC-).

Tabla 1: Permeabilidad efectiva de los diez fármacos de referencia descrita en la bibliografía (19)

Compuesto	<i>Pe</i> Bibliografía (10⁻⁶ cm s⁻¹)	Predicción
Atenolol	0.8	CNS+
Cafeína	1.3	CNS-
Desipramina	12	CNS+
Enoxacina	0.9	CNS-
Hidrocortisona	1.9	CNS-
Ofloxacina	0.8	CNS-
Piroxicam	2.5	CNS+/CNS-
Promazina	8.8	CNS+
Testosterona	17	CNS+
Verapamilo	16	CNS+

2. CULTIVOS CELULARES

Para la realización del estudio, se utiliza la línea celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y. Este tipo de células contienen propiedades adherentes que se deben de tener en cuenta para la realización de los experimentos.

Las células se cultivan en un incubador a 37°C y 5% de CO₂ con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) al cual se le ha añadido previamente un 1% de penicilina/estreptomina y un 10% de suero fetal bovino (FBS). Cuando las células consiguen una confluencia óptima, se siembran en placas de 96 pocillos.

2.1 Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular se lleva a cabo con el objetivo de determinar la concentración óptima del compuesto para los estudios posteriores de neuroprotección. Para ello, se cultivan 50.000 células/pocillo en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂. Cuando consiguen una buena confluencia, se tratan con distintas concentraciones de los compuestos (1 µM, 2,5 µM y 5 µM) disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich). Veinticuatro horas después se procede a estudiar la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio).

El MTT se encuentra formando parte de la familia de las sales de tetrazolio y se presenta como un compuesto de gran solubilidad y color amarillento. Este ensayo se basa en la

reducción mitocondrial del MTT a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales. El formazán es un compuesto de la familia de los formazanos y se acumula en el interior de las células formando precipitados insolubles y de coloración violeta (20). De esta manera se puede evaluar a través de la funcionabilidad mitocondrial, el porcentaje de viabilidad celular en presencia de los distintos tratamientos. Para llevar a cabo el proceso, se debe añadir a cada pocillo 0.5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) por un tiempo de 3 h. Una vez pasado este tiempo, se retira el medio y se añade 180 μ L de DMSO por pocillo para lisar las células y favorecer la solubilidad de los cristales de formazán. La absorbancia se mide a 560nm con el lector de microplacas Glowmax Promega (ThermoScientific™).

2.2 Ensayo de neuroprotección frente al ácido etacrínico

Con el fin de determinar la neuroprotección de los posibles fármacos, se utiliza un modelo celular que imita un proceso patológico causante de la ELA, como es el incremento de pTDP-43. Para lograr este efecto, se emplea el ácido etacrínico (AE), que genera una disminución de glutatión, lo que resulta en un incremento del estrés oxidativo y como consecuencia fomenta la fosforilación de la serina en las posiciones 403/404 y 409/410 del extremo C-terminal de TDP-43 (21).

Para la realización del experimento, las células se cultivan a 37 °C y 5 % de CO₂ en placas de 96 pocillos y cuando alcanzan la confluencia óptima, son tratadas con las concentraciones determinadas de los compuestos (1 μ M y 5 μ M). Después de una hora de haber tratado las células con los compuestos, se adiciona AE (stock 70 μ M) capaz de producir un 50 % de muerte celular. Posteriormente se incuban veinticuatro horas y se evalúa la viabilidad celular con el ensayo de MTT.

2.3 Ensayos de Western Blot

Se utiliza la técnica de Western Blot para analizar el efecto neuroprotector a nivel de expresión proteica. Para ello, se cultivan 2x10⁶ células por pocillo en una placa de 6 pocillos (Falcon™) y posteriormente, se realiza el mismo proceso detallado en el apartado 2.2. Una vez incubadas las células con o sin tratamiento durante veinticuatro horas, se procede a retirar el medio y lavar con 500 μ L/pocillo de PBS 1X (Sigma-Aldrich). Posteriormente, se usa un rascador para despegar y recoger las células adheridas en los pocillos y se centrifugan a 1000 rpm, a 4 °C durante 10 min, quedando las células en el pellet. Cada muestra se trata con 50 μ L del tampón de lisis (RIPA) (50 mM Tris pH 7.4;

150 mM NaCl; 0,1 % SDS; ácido desoxicólico 0,5 %; 1 % Nonidet P-40) (Sigma-Aldrich) al cual se le añade previamente una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche, Mannheim, Germany). Tras 30 min, se centrifugan a 13000 rpm, a 4 °C durante 10 min, quedando en el sobrenadante la fracción proteica.

Posteriormente, se cuantifica la cantidad de proteína utilizando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) y el lector de microplacas Glowmax Promega (ThermoScientific™) para medir la absorbancia a 560 nm.

Para separar las proteínas por su peso molecular se realiza una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 10 % cargando 50 µg de muestra por pocillo. La transferencia se realiza a una membrana de polivinilo difluorado (PVDF) (Millipore Billerica, MA, Estados Unidos) mediante el equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) durante 14 min. La membrana se bloquea por un tiempo de una hora con albumina de suero bovino (BSA) (Roche) disuelta al 5 % en TBS-T (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) (Sigma-Aldrich). Se incuba toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (Anexo 1) y en el caso del anticuerpo secundario (Anexo 1) se incuba a temperatura ambiente durante una hora. Mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific) se realiza la amplificación de señal del anticuerpo secundario. La cuantificación de las bandas se produce con el equipo ChemiDoc (Bio- Rad) y como control de carga se utiliza GADPH.

Para el densitometrado de bandas se hace uso del Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) un software libre de procesamiento de imagen digital.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realiza con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). Para los análisis cuantitativos se realizan más de tres experimentos biológicamente independientes representando la media ± desviación estándar de la media (SEM) y evaluando los datos mediante la prueba de T de Student en el caso de comparar 2 grupos, o el análisis de varianza ANOVA de un factor para comparar 3 o más grupos.

V. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LOS INHIBIDORES CANDIDATOS A FÁRMACOS

1.1 Evaluación enzimática de la inhibición de TTBK1

En un primer lugar, se realizó una evaluación de la capacidad inhibitoria de los compuestos a estudiar frente al dominio quinasa de TTBK1. Para ello, se calculó el valor de CI_{50} realizando curvas de dosis-respuesta a 5 concentraciones distintas de compuesto mediante el ensayo de Kinase-Glo. En este ensayo se produce la unión específica de los compuestos ATP-competitivos al sitio de unión del ATP, impidiendo la entrada de este en la enzima y consecuentemente, la fosforilación del sustrato. La actividad inhibitoria de cada compuesto se determina a partir de la reacción de luminiscencia, siendo proporcional a la variación del ATP total y el consumido.

Una vez obtenido el valor del CI_{50} para la quinasa TTBK1, se definió la selectividad de los compuestos como el cociente entre el valor de CI_{50} de TTBK1 y el valor de CI_{50} de TTBK2 (Tabla 2).

Tabla 2: Evaluación enzimática de los compuestos con sus CI_{50} y su selectividad. Los resultados se muestran con el valor de la desviación estándar.

Compuesto	TTBK1 $CI_{50}(\mu M)$	TTBK2 $CI_{50}(\mu M)$	Selectividad TTBK1/TTBK2
VNG-3.15	0.30 ± 0.10	>100	>0.01
VNG-3.56	0.40 ± 0.01	1.94 ± 0.65	0.21
VNG-3.58	0.93 ± 0.24	6.51 ± 1.03	0.14
VNG-3.65	1.05 ± 0.04	0.29 ± 0.04	3.62
VNG-3.67	0.72 ± 0.12	5.40 ± 1.14	0.13
CSS-1.32	2.01 ± 0.14	7.45 ± 0.45	0.27
CSS-1.32N	0.45 ± 0.01	5.37 ± 1.50	0.08
CSS-1.37	1.12 ± 0.03	5.11 ± 0.10	0.22
CSS-1.38	1.91 ± 0.45	>100	0.02

Como puede observarse en la tabla 2, todos los compuestos estudiados mostraron valores de CI_{50} para TTBK1 en el rango bajo micromolar, con valores entre 0.3 y 2.01 μM . Además, todos ellos presentaron mayor selectividad por TTBK1 que por TTBK2 exceptuando el compuesto VNG-3.65.

Por ello, en este primer cribado se descartó el compuesto VNG-3.65 al mostrar una mayor actividad inhibitoria sobre TTBK2. El resto de los compuestos fueron seleccionados para los posteriores ensayos preclínicos, donde se procedió a realizar la evaluación del perfil farmacológico midiendo su capacidad de penetrar la BHE y llegar a su diana en el SNC.

1.2 Predicción del paso de BHE de los inhibidores de TTBK1

La caracterización de la actividad biológica de un fármaco es un aspecto clave para su desarrollo, sin embargo, hay otros procesos relacionados con la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) que son igual de importantes para poder llegar a ser un medicamento.

Una de las características esenciales que deben de tener los fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas es la capacidad para poder atravesar la barrera hematoencefálica a una concentración óptima y así ejercer el efecto terapéutico en el SNC. El estudio de esta propiedad farmacocinética se ha realizado durante años en las últimas fases del proceso de evaluación de un fármaco, haciendo que muchos compuestos con buena actividad biológica no hayan podido llegar al mercado. Por ello, se han desarrollado diferentes métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, con el objetivo de determinar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos durante las etapas tempranas de su desarrollo (18).

La mayoría de los fármacos atraviesan la BHE mediante difusión pasiva y por ello, una de las técnicas *in vitro* más utilizadas para determinar la distribución de los compuestos en una etapa temprana a su desarrollo es la metodología basada en membranas artificiales paralelas (PAMPA). Con este método experimental se predice la permeabilidad efectiva (Pe) en humanos de los fármacos que son capaces de penetrar al SNC.

En este estudio se llevó a cabo el cálculo de la permeabilidad efectiva de los compuestos de inhibición de TTBK1 mediante la realización de un ensayo donde se analiza de manera experimental la Pe de diez fármacos control de uso en clínica humana cuya capacidad de

atravesar la BHE se conoce. En este caso, se determinó una buena correlación lineal entre los datos de Pe experimentales y los reportados en la literatura para los diez fármacos de referencia ($R^2:0,9682$) (Figura 9).

Tabla 3: Pe experimental y Pe bibliográfica de los diez fármacos de uso en clínica humana utilizados como control en el ensayo de PAMPA. Los resultados se muestran con el valor de la desviación estándar.

Compuesto	Pe Bibliografía ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Pe Experimental ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)
Atenolol	0.8	0.1 ± 0.0
Cafeína	1.3	1.1 ± 0.1
Desipramina	12	14.5 ± 0.9
Enoxacina	0.9	1.0 ± 0.5
Hidrocortisona	1.9	1.9 ± 0.2
Ofloxacina	0.8	0.4 ± 0.1
Piroxicam	2.5	2.0 ± 0.4
Promazina	8.8	9.8 ± 2.8
Testosterona	17	21.6 ± 0.1
Verapamilo	16	15.1 ± 0.2

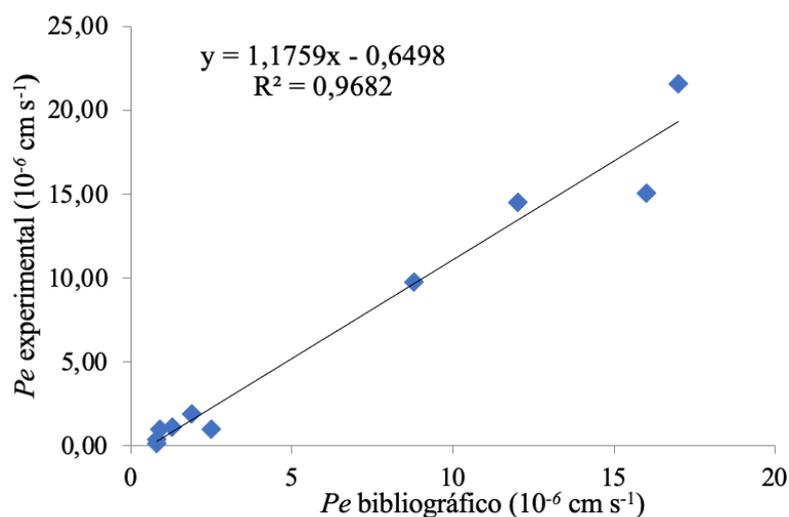


Figura 9: Correlación lineal entre la Pe experimental y la Pe reportada en la literatura para los diez fármacos de uso en clínica utilizados como control en el ensayo de PAMPA.

Una vez obtenida la recta, se evaluó la capacidad de atravesar la BHE de los inhibidores de TTBK1. Para ello, se calculó experimentalmente la Pe de los compuestos de estudio y, a continuación, se utilizó la ecuación de correlación (Figura 10) con el objetivo de determinar la capacidad de los distintos compuestos para llegar al SNC. Siendo $x=4$, se determinó un valor de $Pe > 4.05 \times 10^{-6}$ (cm s^{-1}) para los compuestos capaces de atravesar la BHE (SNC+), y para $x=2$, se determinó un valor de $Pe < 1.702 \times 10^{-6}$ (cm s^{-1}) para los compuestos que no atraviesan la BHE (SNC-). Los compuestos cuya Pe se encontró entre los dos valores obtenidos, no se pudo determinar su capacidad para llegar a la diana TTBK1 en el SNC (SNC+/SNC-).

Tabla 4: Pe experimental y capacidad de atravesar la BHE para los inhibidores de TTBK1. Los resultados se muestran con el valor de la desviación estándar.

Compuesto	Pe Experimental ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Predicción
VNG 3.15	8.0 ± 0.1	CNS+
VNG 3.56	2.5 ± 0.1	CNS+ /CNS-
VNG 3.58	5.8 ± 0.6	CNS+
VNG 3.67	3.7 ± 0.6	CNS+ /CNS-
CSS 1.32	3.2 ± 0.1	CNS+ /CNS-
CSS 1.32N	3.2 ± 0.1	CNS+ /CNS-
CSS 1.37	24.8 ± 2.4	CNS+
CSS 1.38	22.8 ± 1.3	CNS+

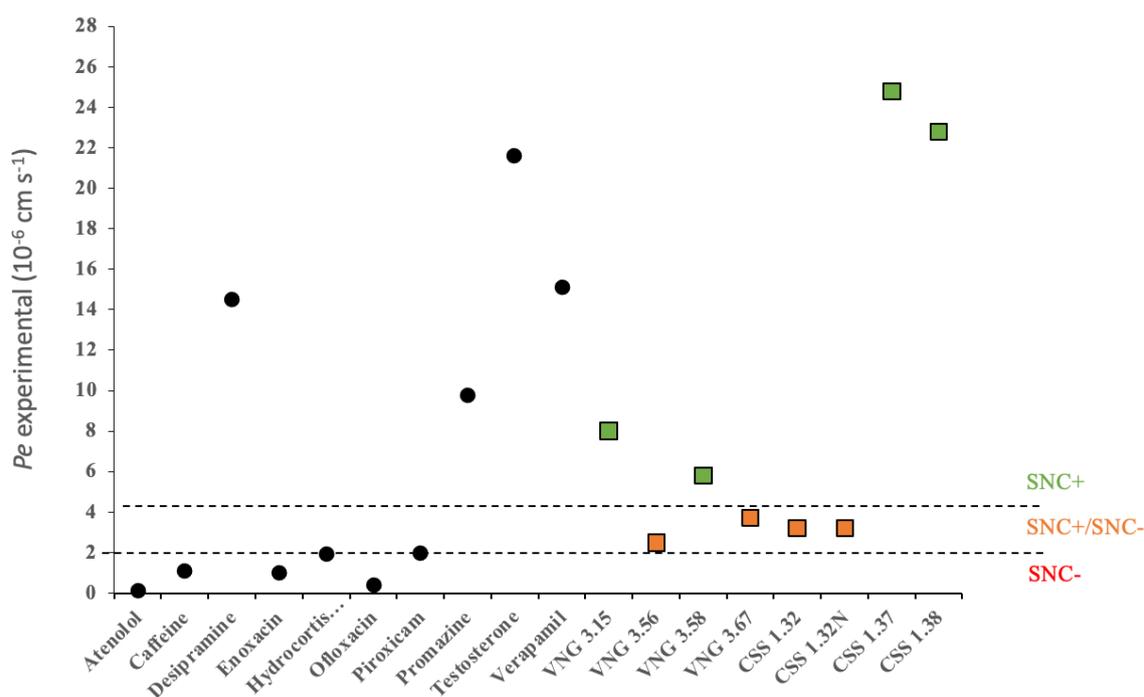


Figura 10: Representación gráfica de la Pe experimental a través de la BHE de los diez compuestos comerciales y los inhibidores de TTBK1 estudiados en el ensayo de PAMPA (SNC- no permeables; SNC+ permeables; SNC+/SNC- no se puede determinar con certeza su permeabilidad).

En cuanto a los resultados obtenidos se observa como de los ocho candidatos a fármaco, cuatro de ellos (VNG-3.15, VNG-3.58, CSS-1.37 y CSS-1.38) con $Pe > 4.05 \times 10^{-6}$ (cm s⁻¹) tienen una elevada probabilidad de atravesar la BHE por difusión pasiva y llegar a su diana terapéutica. Los otros cuatro compuestos (VNG 3.56, VNG 3.67, CSS 1.32 y CSS 1.32N) se encuentran en una zona de incertidumbre con valores de Pe entre 4.05×10^{-6} y 1.70×10^{-6} (cm s⁻¹), por lo que no se puede predecir si son capaces de penetrar en el SNC.

Por ello, se decidió seguir adelante con todos los compuestos y evaluar su potencial neuroprotector en un modelo celular con un fenotipo que simula las características patológicas de las neuronas de pacientes de ELA.

2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS INHIBIDORES CANDIDATOS A FÁRMACOS EN EL MODELO CELULAR SH-SY5Y

2.1 Evaluación de la viabilidad celular

Antes de proceder a los ensayos de actividad biológica, se realizaron estudios de viabilidad celular con los compuestos de estudio. Se evaluó la seguridad de los inhibidores de TTBK1 en una línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y con concentraciones crecientes de los compuestos (1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M). El objetivo es definir la dosis del tratamiento posterior. Los resultados de la viabilidad celular a las distintas concentraciones se recogen en la figura 11.

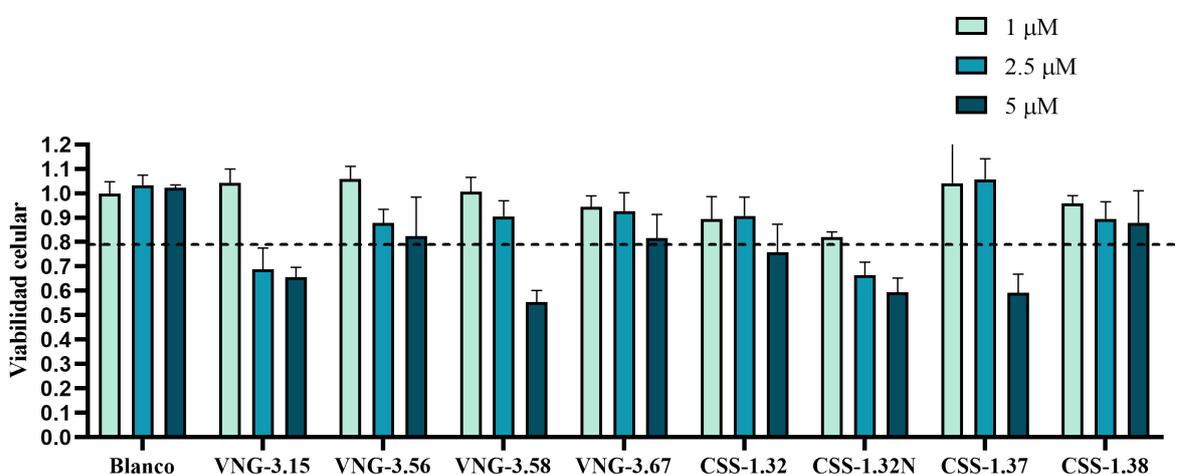


Figura 11: Estudio de citotoxicidad en la línea celular SH-SY5Y tras ser tratadas con los compuestos a 1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos mostraron que únicamente los compuestos VNG-3.56, VNG-3.67 y CSS-1.38 tienen altos valores de viabilidad celular a las tres concentraciones evaluadas. Sin embargo, al bajar la dosis de los compuestos se observa como todos los candidatos a fármacos llegan a alcanzar niveles de viabilidad $>80\%$ para la concentración de 1 μ M. En base a estos resultados, los siguientes ensayos de neuroprotección se realizaron para todos los compuestos a la concentración de 1 μ M.

2.2 Evaluación de la neuroprotección frente al ácido etacrínico

Para validar a los inhibidores de TTBK1 como posibles fármacos para la ELA y otras TDP-43-patías se llevó a cabo la evaluación del efecto neuroprotector de los compuestos frente al daño causado por el ácido etacrínico, compuesto que produce la depleción de

glutación e inhibe el ciclo de fosfatasa produciendo un aumento en la fosforilación de TDP-43 (21).

En este ensayo se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SHSY5Y y se evaluó la capacidad de los inhibidores para proteger a las células de la muerte provocada por el ácido etacrínico a la concentración de 1 μ M (Figura 12)

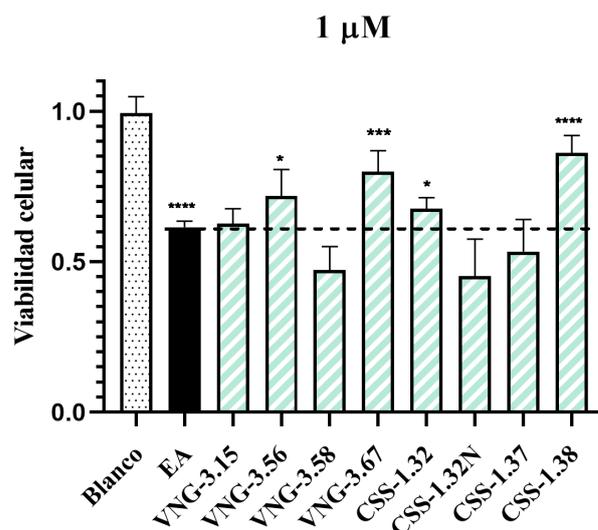


Figura 12: Evaluación de la capacidad de los candidatos a fármacos para producir la reversión del efecto del AE a concentración de 1 μ M. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 3 experimentos independiente (para * p <0.05 existen diferencias significativas con respecto al control con ácido etacrínico).

Con los resultados de este estudio se pudo determinar los compuestos VNG-3.56, VNG-3.67, CSS-1.32 y CSS-1.38 son capaces de proteger frente al AE de manera significativa.

2.3 Estudio de la disminución de los niveles de pTDP-43

La segunda etapa de este estudio es determinar si la neuroprotección ejercida por los compuestos VNG-3.56, VNG-3.67, CSS-1.32 y CSS-1.38 se debe a la disminución de los niveles de TDP-43 fosforilados. Para ello se emplea la técnica de Western-Blot utilizando anticuerpos específicos (Figura 13).

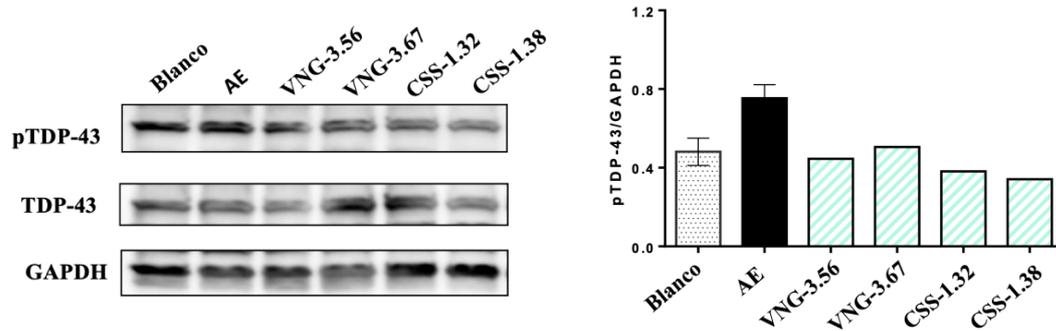


Figura 12: Análisis de los niveles de pTDP-43 en presencia de los inhibidores de TTBK1 en células SH-SY5Y tratadas con AE.

Como se puede ver en la figura 12, todos los inhibidores de TTBK1 evaluados mostraron reducir la fosforilación de TDP-43 inducida por el ácido etacrínico.

VI. DISCUSIÓN

TDP-43 es una proteína nuclear vital para la salud celular debido a sus numerosas e importantes funciones en la regulación del ARN y la plasticidad neuronal. En estado patológico, el equilibrio homeostático de esta proteína se rompe produciendo una traslocación al citoplasma, donde puede sufrir distintos cambios post-traduccionales como la hiperfosforilación, ubiquitinación o fragmentación. Estas alteraciones favorecen la formación de agregados proteicos y depósitos citoplasmáticos responsables de la degeneración neuronal. En las últimas décadas, los agregados de TDP-43 se han asociado a un creciente número de enfermedades neurodegenerativas, llegando a considerarse uno de los factores patogénicos más evidentes en la enfermedad de la ELA. Sin embargo, los mecanismos patológicos a través de los cuales TDP-43 causa demencia progresiva o disfunción motora, son bastante complejos y aún no se comprenden completamente. Por ello, gran cantidad de investigaciones se han centrado en estudiar la hiperfosforilación de TDP-43, modificación postraduccionales que influye en la agregación citoplasmática de la proteína. Recientemente, se ha descrito un modelo transgénico de *C. elegans* con una TDP-43-patía, donde se han mostrado resultados de neurodegeneración por la fosforilación de la proteína. Con este modelo se han identificado las distintas quinasas (CK-1, CDC7, TTBK1 y TTBK2) involucradas en la hiperfosforilación de TDP-43 (22–24).

En cuanto a TTBK1 y TTBK2, se conoce que son quinasas que pertenecen a la familia de CK-1. En estudios realizados por Liachko *et al.* se determinó como estas quinasas fosforilan inequívocamente a TDP-43 y colocalizan con esta proteína fosforilada en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (25). Asimismo, Jackson *et al.* demostraron que ambas proteínas fosforilan residuos clave (Ser409 y Ser410) en el proceso de agregación de TDP-43 (26). Por otro lado, se determinó que TTBK1 se expresa únicamente en el SNC, mientras que TTBK2 es ubicua y está implicada en una gran cantidad de funciones cruciales dentro de la célula como la estabilización de microtúbulos, ciliogénesis y neurotransporte de transmisores (27). Por ello, es importante el diseño de compuestos que inhiban de manera selectiva TTBK1, ya que puede ser una diana farmacológica prometedora para reducir la hiperfosforilación de TDP-43 en estas enfermedades. Hasta la fecha, las únicas moléculas que se han descrito como inhibidores selectivos para TTBK1 son los compuestos recientemente publicados por este grupo de investigación. Se trata de una familia de moléculas pequeñas derivadas de pirrolopirimidina que resultan ser inhibidores muy potentes y 20 veces selectivos en TTBK1 frente a la isoforma TTBK2 (17). En el presente trabajo, las moléculas estudiadas pertenecen a una optimización de estos compuestos y tratan de aumentar la potencia y principalmente, la selectividad en TTBK1 frente a TTBK2. Los diferentes resultados obtenidos, mostraron como los compuestos estudiados derivados de pirrolopirimidina presentan valores similares de CI_{50} para TTBK1, siendo así activos para inhibir a dicha enzima. Además, se observó que los compuestos VNG-3.15 y CSS-1.38 tienen un CI_{50} frente a TTBK2 mayor de 100 μM por lo que se consideran muy selectivos para la isoforma TTBK1. El resto de los compuestos mostraron una selectividad similar a los inhibidores recientemente publicados (17).

Por otro lado, con este proyecto se ha demostrado la importancia en la relación entre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas para poder conseguir un buen candidato a fármaco. En este caso, al tratarse de inhibidores de una enzima que actúa exclusivamente a nivel del SNC, se determinó la capacidad de estos para atravesar la barrera hematoencefálica humana mediante la metodología PAMPA. De esta manera los compuestos que contienen una $Pe > 4.05 \times 10^{-6}$ ($cm\ s^{-1}$) tienen una elevada probabilidad de llegar por difusión pasiva a su diana en el SNC. Los resultados de este experimento mostraron como varios compuestos son permeables al SNC, destacando entre ellos a VNG-3.15 y CSS-1.38, los dos inhibidores con elevada selectividad. El resto de los

compuestos, se encontraron en una zona de incertidumbre por lo que no se pudo predecir con certeza su capacidad para pasar la BHE. Por ello, se continuó con todos los candidatos a fármaco para evaluar su potencial neuroprotector frente al ácido etacrínico en la línea celular de neuroblastoma humano. En cuanto a los resultados obtenidos, se demostró como VNG-3.56, VNG-3.67, CSS-1.32 y CSS-1.38 son capaces de proteger frente al AE de manera significativa, sin embargo, se pudo observar que el compuesto selectivo VNG-3.15 no es capaz de producir un efecto neuroprotector en las células. Por último, mediante la realización de Western-Blots, se corroboró como la neuroprotección producida por estos cuatro compuestos es debida a una disminución en los niveles de fosforilación de TDP-43, probablemente producida por la inhibición de TTBK1.

En base a los resultados obtenidos en el estudio, se destaca la acción del compuesto CSS-1.38, debido a que es el único inhibidor de todos los estudiados que presenta alta selectividad por TTBK1, elevada permeabilidad efectiva para atravesar la barrera hematoencefálica, gran viabilidad y un elevado efecto neuroprotector. En estudios posteriores, se deberá de probar la efectividad del fármaco en células de pacientes con ELA y en modelos de ratón que simulen esta TDP-43patía.(28)

VII. CONCLUSIONES

Con la realización de esta investigación, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

1. Los compuestos estudiados son inhibidores específicos de TTBK1, siendo dos de ellos muy selectivos.
2. El 50% de los compuestos tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica de manera efectiva.
3. Cuatro de los compuestos protegen a la línea de neuroblastoma humano SHSY5Y frente a la muerte inducida por el ácido etacrínico disminuyendo la hiperfosforilación de TDP-43.
4. De manera preliminar, se considera al compuesto CSS-1.38 como un potencial candidato a fármaco debido a que posee elevada selectividad frente a TTBK1, buenas propiedades farmacocinéticas y gran capacidad neuroprotectora. Para comprobar esta propuesta, se encuentran en curso diferentes estudios.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377(2):162–72.
2. González N, Barrios E, Escamilla C. Esclerosis lateral amiotrófica. Monografía.
3. Yang X, Ji Y, Wang W, Zhang L, Chen Z, Yu M, Shen Y, Ding F, Gu X, Sun H. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Molecular Mechanisms, Biomarkers, and Therapeutic Strategies. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1012
4. Posa D, Martínez-González L, Bartolomé F, Nagaraj S, Porras G, Martínez A, Martín-Requero Á. Recapitulation of Pathological TDP-43 Features in Immortalized Lymphocytes from Sporadic ALS Patients. *Mol Neurobiol*. 2019;56(4):2424-2432.
5. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, Shaw PJ, Simmons Z, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3(1):1–19.
6. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2019; 12(25).
7. Palomo V, Tosat-Bitrian C, Nozal V, Nagaraj S, Martin-Requero A, Martinez A. TDP-43: A Key Therapeutic Target beyond Amyotrophic Lateral Sclerosis. *ACS Chem Neurosci*. 2019 Mar 20;10(3):1183-1196
8. Palomo V, Nozal V, Rojas-Prats E, Gil C, Martinez A. Protein kinase inhibitors for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Br J Pharmacol*. 2021;178(6):1316-1335.
9. Neumann M, Kwong LK, Lee EB, Kremmer E, Flatley A, Xu Y, Forman MS, Troost D, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol*. 2009;117(2):137-49.
10. Hernández-Flórez D, Valor L. Los inhibidores de las proteínas-cinasas en enfermedades autoinmunes e inflamatorias: Presente y futuro de nuevas dianas terapéuticas. *Reumatol Clin*. 2016;12(2):91–9.
11. Nozal V, Martinez A. Tau Tubulin Kinase 1 (TTBK1), a new player in the fight against neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*. 2019 Jan 1;161:39-47.

12. Jackson PK. TTBK2 kinase: linking primary cilia and cerebellar ataxias. *Cell*. 2012;151(4):697-699.
13. Sato S, Cerny RL, Buescher JL, Ikezu T. Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *J Neurochem*. 2006;98(5):1573-84
14. Kiefer SE, Chang CJ, Kimura SR, Gao M, Xie D, Zhang Y, Zhang G, Gill MB, Mastalerz H, Thompson LA, Cacace AM, Sheriff S. The structure of human tau-tubulin kinase 1 both in the apo form and in complex with an inhibitor. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014;70(Pt 2):173-81.
15. Nozal V, Martínez-González L, Gomez-Almeria M, Gonzalo-Consuegra C, Santana P, Chaikuad A, Pérez-Cuevas E, Knapp S, Lietha D, Ramírez D, Petralla S, Monti B, Gil C, Martín-Requero A, Palomo V, de Lago E, Martinez A. TDP-43 Modulation by Tau-Tubulin Kinase 1 Inhibitors: A New Avenue for Future Amyotrophic Lateral Sclerosis Therapy. *J Med Chem*. 2022;27;65(2):1585-1607.
16. Halkina T, Henderson JL, Lin EY, Himmelbauer MK, Jones JH, Nevalainen M, Feng J, King K, Rooney M, Johnson JL, Marcotte DJ, Chodaparambil JV, Kumar PR, Patterson TA, Murugan P, Schuman E, Wong L, Hesson T, Lamore S, Bao C, Calhoun M, Certo H, Amaral B, Dillon GM, Gilfillan R, de Turiso FG. Discovery of Potent and Brain-Penetrant Tau Tubulin Kinase 1 (TTBK1) Inhibitors that Lower Tau Phosphorylation In Vivo. *J Med Chem*. 2021;64(9):6358-6380
17. Nozal V, Martínez-González L, Gomez-Almeria M, Gonzalo-Consuegra C, Santana P, Chaikuad A, et al. TDP-43 Modulation by Tau-Tubulin Kinase 1 Inhibitors: A New Avenue for Future Amyotrophic Lateral Sclerosis Therapy. *J Med Chem*. 2022;65(2):1585–607.
18. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*. 1998;26;41(7):1007-10.
19. Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem*. 2003;38(3):223-32.
20. Van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. 2011;237–45.

21. Rizzardini M, Lupi M, Bernasconi S, Mangolini A, Cantoni L. Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. *J Neurol Sci.* 2003;15;207(1-2):51-8.
22. Alquezar C, Salado IG, de la Encarnación A, Pérez DI, Moreno F, Gil C, de Munain AL, Martínez A, Martín-Requero Á. Targeting TDP-43 phosphorylation by Casein Kinase-1 δ inhibitors: a novel strategy for the treatment of frontotemporal dementia. *Mol Neurodegener.* 2016;30;11(1):36.
23. Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;1;382(2):405-9.
24. Moujalled D, James JL, Parker SJ, Lidgerwood GE, Duncan C, Meyerowitz J, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Grubman A, Liddell JR, Crouch PJ, White AR. Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS One.* 2013;8(6):e67433.
25. Liachko NF, McMillan PJ, Strovas TJ, Loomis E, Greenup L, Murrell JR, Ghetti B, Raskind MA, Montine TJ, Bird TD, Leverenz JB, Kraemer BC. The tau tubulin kinases TTBK1/2 promote accumulation of pathological TDP-43. *PLoS Genet.* 2014;10(12):e1004803.
26. Jackson PK. TTBK2 kinase: linking primary cilia and cerebellar ataxias. *Cell.* 2012 Nov 9;151(4):697-699.
27. Schitteck B, Sinnberg T. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Molecular Cancer.* 2014;13(1):1–14.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Descripción de los Anticuerpos empleados en la técnica de Western Blot.

Anticuerpo primario	Dilución en BSA 5%	Casa comercial (Referencia)
p-TDP-43 (Ser409/410)	1:1000	Proteintech (223309-1-AP-RABBIT)
TDP-43	1:1000	Proteintech (18280-1-AP-RABBIT)
GADPH	1:10000	Proteintech (66031-1-AP-MOUSE)

Anticuerpo secundario	Dilución en TBS-T	Casa comercial (Referencia)
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:5000	Bio-Rad
Goat Anti-mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:5000	Bio-Rad