

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Modulación de TDP-43: una nueva estrategia terapéutica
para la esclerosis lateral amiotrófica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Loreto Martínez González

DIRECTORES

Ana Martínez Gil
María Ángeles Martín Requero

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**MODULACIÓN DE TDP-43: UNA NUEVA ESTRATEGIA
TERAPÉUTICA PARA LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Loreto Martínez González

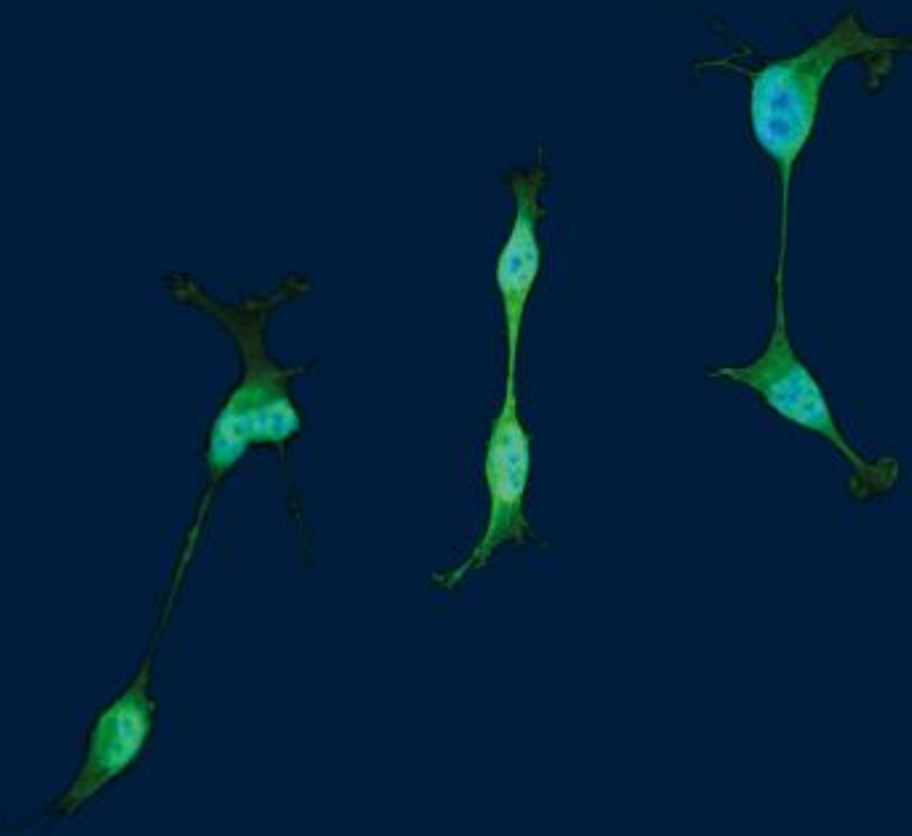
DIRECTOR: ANA MARTÍNEZ GIL

CODIRECTOR: MARÍA ÁNGELES MARTÍN REQUERO

TESIS DOCTORAL

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



Modulación de TDP-43: una nueva estrategia
terapéutica para la esclerosis lateral amiotrófica

Loreto Martínez González

Ana Martínez Gil

María Ángeles Martín Requero



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

A mi familia al completo

Agradecimientos:

Quiero agradecer personalmente a todas las personas que han participado de forma directa o indirecta en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Antes de empezar, me gustaría recalcar que me considero una persona privilegiada no solo por haber sobrevivido a los dos acontecimientos históricos que han tenido lugar durante este último año de Tesis Doctoral: la pandemia de COVID-19 y el paso de la borrasca Filomena por nuestra querida capital, sino también por haber tenido la suerte de realizar mi Tesis Doctoral probablemente en el mejor grupo de investigación que conozca, no solo por el prestigio a nivel internacional, sino también por la categoría humana de las personas que lo conforman.

Quiero agradecer a mis directoras de Tesis la Prof. Ana Martínez Gil y la Dra. Ángeles Martín Requero la oportunidad que me han dado de poder realizar el doctorado en su grupo de investigación.

En primer lugar, quería agradecer esta Tesis Doctoral a la persona que me impulsó a hacerla, a la que ante mi incertidumbre profesional después de mi vuelta de Australia me aconsejó que realizara el Máster en Investigación Biomédica para poder hacer el TFM en su laboratorio y así descubrir el maravilloso y arduo mundo de la investigación. Gracias Ana por haberme hecho un hueco en tu laboratorio, en tu grupo de investigación lleno de gente muy valiosa tanto profesional como personalmente. Gracias por fomentar mi aprendizaje multidisciplinar enviándome a diferentes grupos de investigación. Gracias por respaldar y potenciar todas las propuestas que te he hecho a lo largo de estos años. Gracias por haberme enseñado que por encima de los mejores resultados que uno pueda obtener, está la calidad humana. Gracias por el ejemplo de excelente investigadora pero sobre todo de excelente madre, ayudándonos por encima de todo a conciliar familia y trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Ángeles Martín Requero por haberme acogido con los brazos abiertos en su grupo desde el principio. Aunque he crecido en un laboratorio de químicos, he podido desarrollar todas las facetas en el mundo de la biología molecular gracias al apoyo incondicional que me has dado en todo momento. Gracias por hacerme hueco en las poyatas de tu laboratorio, por resolverme las múltiples dudas, por las grandes e interesantes discusiones de resultados que hemos tenido. Pero sobre todo, gracias por haber sido siempre tan cercana conmigo, acogiendo la llegada de mis niños como si fueran parte de tu familia. Un placer y una suerte haber aprendido de un referente en el mundo de las enfermedades neurodegenerativas. Muchas gracias.

A mi tutora la Dra. Ángeles Vicente López por haber mostrado gran interés desde el comienzo de la tesis por el trabajo que he desarrollado, gracias porque ante los obstáculos que he tenido me has ayudado a solventarlos de forma inmediata y con toda la comprensión del mundo. Un placer y una suerte que fueses la persona elegida para tutorizar mi trabajo durante estos años. Gracias.

También quiero dar las gracias a las Dras. Carmen Gil, Nuria Campillo y Ruth Pérez. Carmen, gracias por la buena acogida desde el primer día que aparecí en el laboratorio, aunque no hayamos trabajado codo con codo he aprendido muchas cosas de ti como la importancia del orden, la organización y la perfección a la hora de escribir una cita bibliográfica, ¡no se te pasa un punto!. Y no podía dejar de nombrar por supuesto el gran descubrimiento que has aportado al grupo, probablemente el más importante de la historia del laboratorio: las palmeritas de Morata de Tajuña. Nuria, aunque no he tenido la oportunidad de participar directamente en tu estupendo grupo de computación, quería darte las gracias por el buen trato que me has dado siempre, por enseñarme a gestionar los sentimientos como lo hace tu pequeña Ari y por ese cariño que transmites haga sol, nieve o truene. Ruth, gracias por estos años juntas, aunque mi tesis cambió de rumbo al poco de conocerte, para mí fue un placer compartir mis primeros años de doctorado contigo en el maravilloso mundo de las proteínas. Gracias también por tus consejos como madre y por amenizarnos el día a día con las historias de tus hijos.

También quiero dar las gracias al que fue mi mentor durante mis primeros años de doctorado. Gracias Dani por esos meses en los que me enseñaste pacientemente el ritmo y la forma de trabajar del grupo, gracias por el buen rollo que generabas constantemente con las múltiples bromas que se te ocurrían y sobre todo ¡gracias por haber fomentado los viernes de hamburguesa!

A mis doctores de referencia del grupo: Valle, Alfonso, Eva y Javi. Valle, gracias por haber sido mi mentora estos últimos años en todos los aspectos de la vida, eres una excelente profesional de la que he aprendido y aprenderé mucho. Durante este tiempo hemos compartido muchos momentos que nos han unido pero, el que definitivamente hizo que a día de hoy te considere como una hermana, fue cuando tuvimos que compartir cama de 1.50 en el ENCLAS de Francia. Alfonso, muchas gracias por haber sido mi químico referente, aunque solo haya sido para cosas como ver que reactivo podía servir para conseguir el color rosa para el matraz de la Virgen María del Belén. Gracias por todo y por tu plena disposición siempre. Eva y Javi, aunque hayamos coincidido muy poquito, también quería agradeceros el tiempo que me habéis dedicado siempre

con una sonrisa cuando he necesitado cualquier reactivo de la FDA o cualquier duda del mundo de la biología molecular, siento gran admiración por vuestra sabiduría y profesionalidad. Gracias de corazón.

Gracia, ¡qué gran descubrimiento en estos últimos años! muchísimas gracias por haber estado siempre ahí, sin ti poco hubiese hecho en el bipolar mundo de los cultivos celulares. Gracias por haberme enseñado, con paciencia y de forma desinteresada, todos los trucos para domar a nuestras queridas SH y para mimar a los linfos. Desde el primer día que empecé a trabajar contigo supe que eras una persona que tenía algo especial y así lo he comprobado con el paso del tiempo. Gracias por enseñarme tanto.

A todos mis compañeros de laboratorio, en primer lugar a todos los de mi quinta de tesis que han logrado con éxito ser doctores *cum laude*: Josefa, Carlos, Víctor y Eli. La verdad que hemos vivido mucho juntos, buenos momentos en el labo, en nuestras bodas, los viernes de hamburguesa... habéis sido una parte muy importante y motivante durante estos años.

Josefa, siempre me has transmitido ese deseo de vivir y exprimir la vida al máximo, desde el primer día que hablé contigo me hiciste ver la investigación como una carrera de fondo por la que merece la pena luchar. Gracias porque me has enseñado, como buena persona que eres, que para lograr la excelencia hay que ser más que una buena científica.

A Carlos y Víctor, mi Barsa y mi Real Madrid, que por cierto nunca lograsteis convencer a Loretito para que se asociara a ningún partido, cafres. Habéis sido un pilar muy importante estos años, nunca pensé que os iba a llegar a considerar como hermanos. Gracias por esas constantes bromas, por el buen rollo que habéis metido en el laboratorio, por haberme animado en todo momento y por haberme enseñado la grandeza de los “microsueños”, sois un tándem ganador.

A la Eli, nuestra Riri, la cantante del grupo, gracias por todos estos años, espalda con espalda hemos conseguido superar este doctorado juntas. Gracias por tu alegría diaria con ese rollo góspel que transmites, por poner un poco de color a la vida del laboratorio con esas listas de *Spoty*, por el optimismo que te caracteriza, pero sobre todo gracias porque has sido un claro ejemplo de SUPERACIÓN para todos, nada te va a parar en esta vida porque has demostrado que ante las adversidades más difíciles, con optimismo y predisposición, se puede llegar a donde uno quiera ¡gracias!

Y por supuesto, a todos los que siguen luchando como yo para ser doctores:

Vanesa, gracias por ser el motor del B.05, por estar siempre ahí. Aunque no viniste a mi boda por novata, ahora serías casi me testigo principal. Gracias por tus clases magistrales de química, por las iniciativas de divulgación científica, por otorgarme el título de doctorando del mes (aunque creo que nunca hubo reemplazo), gracias por ser mi maestra de la costura y mi costurera personal. Espero que la vida no nos separe y sigamos siempre unidas aunque sea en la distancia.

Inés, ¡quién me iba a decir a mí que íbamos a compartir tanto en tan poco tiempo! Gracias por los cafés exprés, por los desayunos de los viernes, por esos ratos en cultivos, por la comprensión en los momentos más difíciles y saturantes, por quitarle hierro a las cosas y por hacerme ver la necesidad de despertar ese espíritu aventurero que llevamos dentro y que tanto te caracteriza.

Carlota, aunque no tuve la suerte de compartir tus inicios en el laboratorio, ya me llegaban comentarios de lo simpática y válida que era la del TFM que estaba con Valle. Que suerte haberte conocido y que suerte haber podido compartir contigo campana, laboratorio y grandes conversaciones animantes y de desahogo. Gracias por introducirme en el fascinante mundo de la inmuno y por ser la autora oficial de la contraportada de mi tesis.

¡A las tres os deseo mucho ánimo con la recta final!

Carlos Requena, el futuro FIR, muchas gracias por haberme animado estos últimos meses, gracias por los cafés y por hacerme compañía durante la escritura, ¡un placer haber compartido contigo esta última etapa! Te deseo todo lo mejor.

Andrea gracias por haberme acogido en tu laboratorio durante la escritura de la tesis, ¡ha sido un placer haber compartido estos últimos meses la mesa contigo!. Gracias por tu predisposición para ayudarme con cualquier duda/problema que me ha ido surgiendo, gracias por dejarnos ese huequillo en la poyata a las caóticas de biología y por tu paciencia con las invasiones que te hemos hecho... ¡gracias!.

Roció, una gran alumna a la vez que maestra. Un placer haber estado juntas en tu TFM y una suerte haberte tenido como compañera de cultivos. Gracias por el inmenso cariño que trasmites cada vez que apareces por el CIB. Te deseo toda la suerte del mundo para esta recta final de escritura de la tesis, mucho ánimo y ¡que no decaiga ese espíritu alegre que esto ya está hecho!.

Marcos, que suerte tengo de haber coincidido contigo, a parte de las conversaciones sobre ciencia, me ha encantado tener al comentarista oficial de OT y de Mask Singer. Gracias por tu simpatía y por esos buenos ratos.

A la última adquisición del B.05, Enrique, gracias por esa chispa diaria que aportas al grupo, creo que lo más importante para poder disfrutar de la vida es ese humor que te caracteriza, así que ¡gracias por hacérmelo ver y por hacernos la vida más alegre!.

Paula, una excelente TFG, TFM y por fin pre-doc, muchas gracias por todo el trabajo que has sacado adelante, la verdad que aparte de ser una persona buena y comprometida tienes unas manos increíbles, hecho que se refleja en los buenos resultados que has obtenido. ¡Mucha suerte con tu doctorado!.

Mi agradecimiento también va a todos los grupos de investigación en los que he tenido la suerte de trabajar.

A la Dra. Eva de Lago, al Prof. Javier Fernández Ruiz y a todo su grupo: Carmen, Laura, Irene, Claudia y Marta. Muchas gracias por haberme acogido como una más, por haberme enseñado con paciencia el manejo de los ratones, por haberme ayudado con el punto final de los *in vivos* y con el procesamiento de muestras. Habéis sido una parte importante de este trabajo. Un placer haber trabajado con vosotras, os deseo todo lo mejor, ¡gracias!.

A la Prof. Bárbara Monti por haberme permitido realizar una estancia internacional en su grupo de investigación en la Universidad de Bolonia. Gracias por el gran recibimiento, por haberme tutorizado y haberme enseñado tanto. Gracias a Emiliano y a Sabrina por haber estado tan pendientes de mí y por haberme enseñado todo lo relacionado a los cultivos primarios de ratas y el procesamiento que ello conlleva.

A la Dra. María José Sánchez Barrena. Aunque el trabajo que realicé con ella no forma parte del proyecto reflejado en la Tesis Doctoral, quería agradecerle todo lo que me ha enseñado en lo referente a la expresión y cristalización de proteínas.

Por supuesto a la Dra. Alicia Mansilla del Instituto Cajal en aquel entonces, muchas gracias por enseñarme con paciencia y dedicación la co-inmunoprecipitación. Gracias por el ánimo y la motivación que me transmitiste desde el principio.

También quería agradecer a la red de ELA-Madrid (financiada por la Comunidad de Madrid y la Unión Europea, ELA-MADRID.B2017/BMD-3813), gracias a la cual he podido realizar la Tesis Doctoral, y a la fundación COST por haberme concedido la beca STSM con la que pude realizar la estancia internacional en la Universidad de Bolonia.

A su vez quería agradecer a todos los servicios del CIB que han permitido el desarrollo de este trabajo, en especial al servicio de cultivos celulares, a la Dra. Carmen Doñoro a la cual le dedico en parte esta tesis.

Por otro lado, quiero dar las gracias a todas aquellas personas que han participado de forma indirecta en este trabajo bien sea porque han aportado tiempo, ánimo, interés, buen rollo, etc.

A todos mis amigos que han vivido de forma más cercana esta última etapa: Ana, Dane, Santi, Pepino, Nacho, Ana, Pete... a mis "tronadas" y en especial a mis "cenas necesarias" por ofrecerse a ayudarme con los niños en momentos de saturación. Gracias en particular a Pau Alesanco, mi arquitecta de confianza y autora de la portada, por su ayuda incondicional y por aportar ese toque estético a la tesis. Gracias también a Paci por ese retoque necesario de última hora que claramente solo ella iba a saber hacer a la perfección.

A Carlos y Paulita por todo el tiempo que habéis invertido y por la cobertura que tantas veces nos habéis hecho para que pudiera sacar este trabajo adelante. Gracias de corazón.

A mis cuatro abuelos y a mi madrina Rosalía, que desde aquí o desde el cielo han estado de algún modo presentes durante el desarrollo de este trabajo. Un agradecimiento especial a mi abuelo Mario, un gran astrónomo e historiador que ha mostrado desde el principio gran interés por esta Tesis Doctoral.

A mi familia al completo: papá, mamá, Javi, Ali, Maca, Bea, Álvaro, Borja y Jimmy y a mis súper cuñados Ara, Gabo, José y Anita. Gracias por vuestros ánimos, por interesaros de vez en cuando por la Tesis, pero sobre todo gracias por el equipazo que formamos, la unión hace la fuerza por eso nos comemos el mundo a base de música y buen rollo y ante las dificultades... apoyo máximo y a luchar. Os animo a que sigamos luchando juntos para que esto no decaiga y seamos siempre el familión que hemos sido.

A mis padres, por su puesto, les hago una mención especial porque como dice mi primo Juan, autor del libro *De tarde en tarde un elefante blanco*, "Solo tengo una deuda con ellos, que se llama, muy acertadamente, deuda de gratitud. Y se llama así porque se ha contraído gratis y, además, porque nunca podré saldarla". Dicho esto, millones de gracias por todo lo que me habéis inculcado y ensañado en esta vida, por haberme hecho una persona fuerte anímica y mentalmente, por haberme dado el mayor regalo que me habéis dado nunca: mis 7 hermanos, por toda la formación y los valores que me habéis transmitido, por educarme en la Fe y por

hacerme ver que esta vida es mucho más fácil si caminas a Su lado y que cual muelle que fue comprimido... llegarás sin comparación más lejos que nunca soñaste. Gracias, gracias, gracias.

Y por último quería agradecer a la persona con la que he elegido desarrollar mi proyecto de vida, en el que va incluido por supuesto este proyecto de 4 años de investigación. Aunque no estés muy familiarizado con el mundo y la terminología de las enfermedades neurodegenerativas, tus fallidos intentos por entenderlo sumado a la buena intención me han llevado a dedicarte este último párrafo de la tesis. Gracias por ayudar sin que se vea, gracias por escuchar sin que entiendas, gracias por el tiempo de calidad, gracias por las horas de familia que has invertido para que yo pudiese avanzar en la recta final, gracias por tu buena cara ante mis momentos de desesperación y sobre todo gracias por tu inmensa (y espero que eterna) paciencia. Tal y como he dicho al principio de este apartado, me siento muy afortunada por haber sobrevivido con creces a dos acontecimientos históricos, pero sobre todo me siento muy afortunada por la familia en la que he crecido y por la familia que hemos formado; Carlos, Loretito, Pepe y los que vengan.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	7
III. INTRODUCCIÓN	15
1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: ESCLEROSIS LARETAL AMIOTRÓFICA	17
2. BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD	19
2.1. Mecanismos patológicos	19
2.2. Alteraciones genéticas.....	22
2.2.1. Superóxido dismutasa 1 Cu/Zn	24
2.2.2. FUS	24
2.2.3. C9orf72.....	25
2.2.4. Proteína TAR de unión al ADN de 43 KDa	26
3. PATOLOGÍA DE TDP-43	26
3.1. Estructura de TDP-43.....	27
3.2. Función fisiológica	28
3.3. Modificaciones patológicas de TDP-43.....	30
3.3.1. Alteración en la localización celular	30
3.3.2. Fragmentación de TDP-43.....	30
3.3.3. Agregación de TDP-43	31
3.3.4. Modificaciones post-traduccionales	31
4. MODELOS EXPERIMENTALES	33
4.1. Modelos celulares	33
4.2. Modelos animales	38
4.2.1. Modelos ambientales.....	38
4.2.2. Modelos genéticos	39
5. FÁRMACOS ACTUALES	41
6. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS.....	43
6.1. Estrategias en clínica	43
6.2. Estrategias preclínicas	45
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1. PROPIEDADES TIPO FÁRMACO	63
1.1. Predicción del paso de la BHE de los candidatos a fármaco.....	63

1.1.1. Metodología PAMPA	63
2. MODELOS CELULARES	64
2.1. Cultivos neuronales SH-SY5Y.....	64
2.1.1. Ensayo de viabilidad celular.....	65
2.1.2. Ensayo de neuroprotección frente al ácido etacrínico	65
2.2. Muestras sanguíneas de pacientes y controles	65
2.2.1. Extracción e inmortalización de linfocitos de los individuos de estudio	66
2.2.2. Caracterización de linfoblastos.....	67
2.2.3. Estudio del efecto de los inhibidores de quinasas en los linfoblastos.....	68
2.3. Cultivos primarios de células de ratas Wistar	68
2.3.1. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (CGNs)	68
2.3.2. Ensayo de viabilidad celular en CGNs	69
2.3.3. Cultivos primarios de microglía	69
2.3.4. Ensayo del efecto inmunomodulador con LPS	71
2.4. Otras técnicas.....	71
2.4.1. Ensayo del MTT.....	71
2.4.2. Western blot.....	71
2.4.3. Inmunocitoquímica.....	72
3. MODELOS ANIMALES	73
3.1. Ensayo <i>in vivo</i> con el ratón transgénico TDP-43 ^{A315T}	73
3.1.1. Genotipado de las crías	74
3.1.2. Tratamiento y extracción de muestras	74
3.1.3. Pruebas comportamentales	75
Prueba del Rotarod.....	75
Prueba de Clasping	76
3.2. Procesamiento de muestras	76
3.2.1. Análisis histológicos	76
Tinción de Nissl	76
Inmunohistoquímica	77
3.2.2. Análisis bioquímico	77
Western blot.....	78
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
1. SELECCIÓN DE LOS CANDIDATOS A FÁRMACO PARA EL ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA DE TDP-43 ..	85
1.1. Elección de los compuestos	86

1.1.1. Inhibidores de CK-1	87
1.1.2. Inhibidores de GSK-3 β	88
1.1.3. Inhibidores de CDC7	90
1.1.4. Inhibidores de TTBK1	91
1.2. Evaluación de las propiedades tipo fármaco.....	93
1.2.1. Predicción del paso de BHE de los inhibidores de CDC7	96
1.2.2. Predicción del paso de BHE de los inhibidores de TTBK1	98
2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS CANDIDATOS A FÁRMACO EN MODELOS CELULARES	105
2.1. Modelo de neuroprotección frente a la hiperfosforilación de TDP-43	105
2.1.1. Estudio de los inhibidores de CDC7.....	108
2.1.2. Estudio de los inhibidores de TTBK1	112
2.2. Desarrollo de un modelo celular de ELA basado en muestras humanas	114
2.2.1. Caracterización de las líneas de linfocitos de pacientes con ELA esporádica	115
2.2.2. Caracterización de los linfocitos de pacientes con ELA familiar (SOD-1)	122
2.2.3. Estudio de los inhibidores de quinasas en los linfoblastos de pacientes con ELAe	127
2.3. Estudio del potencial inmunomodulador en un modelo de neuroinflamación	133
2.3.1. Estudio de la viabilidad en cultivos primarios de neuronas de cerebelo de rata.....	135
2.3.2. Estudio del potencial inmunomodulador en cultivos primarios de microglía de rata	136
3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS CANDIDATOS A FÁRMACO EN EL MODELO TRANSGÉNICO DE RATÓN TDP-43^{A315T}	143
3.1. Descripción del modelo	143
3.2. Evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores de CK-1 <i>in vivo</i>	146
3.3. Evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores de CDC7 y TTBK1 <i>in vivo</i>	156
3.3.1. Resultados de la evaluación de la inhibición de CDC7	157
3.3.2. Resultados de la evaluación de la inhibición de TTBK1.....	163
4. REPOSICIONAMIENTO DE TIDEGLUSIB COMO TRATAMIENTO PARA LA ELA	173
4.1. GSK-3 β y ELA.....	174
4.2. Antecedentes de Tideglusib	178
4.3. Evaluación del potencial terapéutico de Tideglusib en modelos celulares de ELA	181
4.4. Evaluación del potencial terapéutico de Tideglusib en el modelo murino de TDP-43 ^{A315T}	187
VII. CONCLUSIONES	193
VIII. BIBLIOGRAFÍA	199
IX. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	221
X. ANEXO	227

I. ABREVIATURAS

ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción

ADN: ácido desoxirribonucleico

AE: ácido etacrínico

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ALSFRS-R: escala revisada de valoración funcional de la ELA, del inglés *Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

CaMKII: quinasa II dependiente de calcio/calmodulina, del inglés *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*

CDC7: quinasa del ciclo de división celular 7, del inglés *cell división cycle 7*

ChAT: colina aciltransferasa

CI₅₀: concentración inhibitoria del 50%

CK-1: caseína quinasa 1, del inglés *casein kinase 1*

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

cRNP: complejo ribonucleoprotéico

DFT: demencia frontotemporal

DMC: distrofia miotónica congénita

DMEN: del inglés *dulbecco's modified eagle medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

EA: enfermedad de Alzheimer

EH: enfermedad de Huntington

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

ELAe: esclerosis lateral amiotrófica esporádica

ELAf: esclerosis lateral amiotrófica familiar

ELA-PDC: esclerosis lateral amiotrófica y parkinsonismo-demencia

ELAF-SOD1: esclerosis lateral amiotrófica familiar con mutación en SOD-1

EM: esclerosis múltiple

EMA: Agencia Europea del Medicamento, del inglés *European Medicines Agency*

EP: enfermedad de Parkinson

FBS: suero fetal bovino, del inglés *fetal bovine serum*

FCT: fragmentos del extremo C-terminal

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, del inglés *Food and Drug Association*

DFT: demencia frontotemporal

FUS: proteína de fusión del sarcoma, del inglés *fused in sarcoma*

GE: gránulos de estrés

GFAP: proteína gliofibrilar ácida, del inglés *glial fibrillary acidic protein*

Glu: glutamato

GSK-3: glucógeno sintasa quinasa 3, del inglés *glycogen synthase kinase 3*

hTDP-43: TDP-43 humana

Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1, del inglés *ionized calcium-binding adapter molecule 1*

IL: interleuquina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, del inglés *inducible nitric oxide synthase*

iPSC: células madre pluripotentes inducidas, del inglés *induced-pluripotent stem cells*

KDa: KiloDalton

L-BMAA: β-metilamino-L-alanina

LCR: líquido cefalorraquídeo

LPS: lipopolisacárido de membrana bacteriano, del inglés *lipopolysaccharide*

miARN: micro ARN

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NES: señal de exportación nuclear, del inglés *nuclear export signal*

NFL: neurofilamento de bajo peso molecular

NLS: secuencia de localización nuclear, del inglés *nuclear localization signal*

PAMPA: del inglés *parallel artificial membrane permeability assay*

PBS: tampón fosfato salino, del inglés *phosphate saline buffer*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

Pe: permeabilidad efectiva

PrP: proteína priónica

PSP: parálisis suprenuclear progresiva

pTDP-43: TDP-43 fosforilada

RNPhn: ribonucleoproteínas heterogéneas

ROS: especies reactivas de oxígeno; del inglés *reactive oxygen species*

rpm: revoluciones por minuto

SEM: error estándar de la media

Ser: serina

siARN: ARN de silenciamiento

SNC: sistema nervioso central

SOD-1: superóxido dismutasa 1

SOD-1m: superóxido dismutasa 1 mutada

TARDBP: gen de la proteína de unión a ADN de respuesta transactiva, del inglés *transactive DNA binding protein*

TDP-43: proteína de unión al ADN/ARN de respuesta transactiva de 43 KDa, del inglés *TAR DNA-binding protein 43*

TEA: trastorno del espectro autista

TREM2: receptor de membrana de células mieloides, del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells 2 protein*

TTBK: tau tubulina quinasa, del inglés *tau tubulin kinase*

WB: Western blot

XPO-1: factor de exportación exportina-1, del inglés *exportin 1*

II. RESUMEN

Los grandes avances en el campo de la medicina han contribuido al aumento de la esperanza de vida media de la población. Este hecho va ligado al incremento del número de casos de enfermedades neurodegenerativas siendo las más incidentes la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La esclerosis lateral amiotrófica, conocida como ELA, es la enfermedad de neurona motora más frecuente en adultos. Aunque es una enfermedad rara, el aumento considerable del número de casos en los últimos años ha hecho que su visibilidad sea cada vez mayor. Esta patología se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas motoras que acaba derivando en una parálisis muscular de pronóstico mortal, siendo la esperanza de vida media desde el diagnóstico de 3 a 4 años. La búsqueda de terapias efectivas que consigan frenar la degeneración neuronal de esta devastadora enfermedad es de gran necesidad puesto que los dos únicos fármacos aprobados son paliativos y tan solo son capaces de alargar la vida de los pacientes de 3 a 6 meses.

La ELA, al igual que la mayoría de patologías neurodegenerativas, es una enfermedad multifactorial, es decir, la muerte neuronal es consecuencia de la suma de diversos procesos celulares patológicamente alterados. Un biomarcador común a todas ellas, es la presencia de agregados proteicos citoplasmáticos en las células afectadas como consecuencia de modificaciones post-traduccionales anómalas que sufren en su estructura, como es la hiperfosforilación y la ubiquitinación. La característica patológica principal presente en los tejidos de un 97% de pacientes con ELA, es la agregación citoplasmática de TDP-43 fosforilada y ubiquitinada. TDP-43 regula la expresión de más de 600 ARNm a nivel nuclear, sin embargo, en estado patológico se trasloca al citoplasma y agrega produciéndose en consecuencia una desregulación de numerosos procesos celulares. De ahí la importancia que adquiere la búsqueda de fármacos que reestablezcan la homeostasis de esta proteína tan esencial.

Así, el desarrollo de inhibidores de las proteínas quinasas implicadas en la fosforilación de TDP-43, ha adquirido gran relevancia en la comunidad científica y en concreto en este grupo de investigación, cuya práctica en el desarrollo de inhibidores de quinasas para diferentes patologías, cuenta con más de 20 años de experiencia. Con esta intención, se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral bajo el nombre: **“Modulación de TDP-43: una nueva estrategia terapéutica para la esclerosis lateral amiotrófica”**, en la que el principal objetivo ha sido la validación de las proteínas quinasas que modulan la fosforilación de TDP-43 como dianas terapéuticas, así como el desarrollo de sus inhibidores como candidatos a fármacos para la ELA y aquellas patologías que cursen con esta proteinopatía.

Concretamente se ha llevado a cabo el desarrollo preclínico de pequeñas moléculas de la quimioteca MBC del grupo de investigación, que presentan actividad inhibitoria frente a las quinasas que modulan la fosforilación de TDP-43: CK-1, CDC7, TTBK1 y GSK-3 β . Para ello, se realizó en primer lugar una selección en base a la selectividad y a la actividad inhibitoria que presentan dichos compuestos, evaluando posteriormente la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a su órgano diana: el sistema nervioso central.

Una vez seleccionados los mejores agentes farmacológicos, se evaluó su potencial terapéutico en diferentes modelos celulares y animales que recapitulan la proteinopatía de TDP-43. En primer lugar se validó el efecto neuroprotector frente a la hiperfosforilación de TDP-43 en un ensayo fenotípico desarrollado en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A continuación, se procedió a la immortalización y caracterización de células mononucleares de sangre periférica procedente de donantes sanos y de pacientes con ELA, estableciéndose como modelo para evaluar el potencial terapéutico de los compuestos, puesto que recapitulan las características patológicas de la enfermedad. Por último, y dado que la ELA es una enfermedad multifactorial, se evaluó el efecto inmunomodulador de determinados compuestos en un modelo de neuroinflamación desarrollado en cultivos primarios de microglía murina.

Ante los prometedores resultados obtenidos en los ensayos celulares, se evaluó el potencial neuroprotector de un inhibidor representativo de cada quinasas en el modelo de ratón transgénico que sobreexpresa TDP-43 con la mutación A315T. Todos los candidatos a fármaco mostraron una eficacia significativa a la hora de modular la fosforilación patológica de TDP-43 *in vivo*, presentando a su vez un efecto neuroprotector y antiinflamatorio observado a nivel histológico y/o comportamental en función del inhibidor de estudio.

Todo este procedimiento de desarrollo de un fármaco es un proceso de larga duración y con un elevado coste económico. Sin embargo, existe lo que se conoce como “reposicionamiento de fármacos”, es decir, la búsqueda de nuevas aplicaciones terapéuticas a fármacos cuya seguridad ha sido probada en humanos bien porque están en ensayos clínicos o porque ya han sido aprobados por las agencias reguladoras. Por ello, se propuso el reposicionamiento de Tideglusib, un inhibidor ATP-no competitivo de GSK-3 β diseñado en el grupo de investigación, como la aproximación más rápida para la búsqueda de terapias efectivas para esta enfermedad, puesto que su seguridad y eficacia ha sido evaluada en humanos para otras patologías neurológicas.

El significativo efecto neuroprotector que presento Tideglusib en los modelos celulares y animales establecidos para el estudio de la ELA, ha llevado al diseño de un ensayo clínico fase II, que se iniciará en Suiza en cuanto el protocolo sea aprobado.

En conclusión, los inhibidores de las cuatro quinasas propuestas han mostrado una eficacia significativa a la hora de recuperar la homeostasis de TDP-43 reduciendo la hiperfosforilación y fragmentación, y en consecuencia recuperando la localización nuclear de esta proteína en los modelos celulares y animales establecidos para el estudio de la ELA. Estos resultados son prometedores y avalan la inhibición de las quinasas que modulan la fosforilación patológica de TDP-43, descrita en la mayoría de pacientes, como una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de esta proteinopatía y en concreto de la ELA.

The prevalence of neurodegenerative diseases increases daily due to the longer life expectancy of the population as there are age-dependent diseases. The most common disorders by the number of patients are Alzheimer's disease, Parkinson's disease and in a lower range amyotrophic lateral sclerosis commonly known as ALS. ALS is a lethal motor neuron disease characterized by the progressive muscle paralysis due to the upper and lower motor neuron degeneration being the average survival from onset to death between 3-4 years. The unknown etiology and the lack of effective treatment highlighted the urgent need to discover effective disease-modifying targets and therefore effective treatments to prevent and stop disease progression.

ALS is considered as a multifactorial disorder where a combination of environmental and genetic factors contributes to motorneuron degeneration. Protein aggregates with different posttranslational modifications such as hyperphosphorylation and ubiquitination, is one of the most common biomarkers among neurodegenerative diseases. The main pathological hallmark in almost 97% of ALS patients is the presence of TDP-43 protein aggregates in the cytoplasm of the affected cells promoted by the aberrant phosphorylation and other post-translational modifications. TDP-43 is a nuclear protein involved in the regulation of multiple cellular processes as it regulates the transcription and transport of more than 600 mRNA. The dynamic equilibrium of TDP-43 between nucleus and cytoplasm is altered in disease-affected neurons causing a dysregulation of several mechanisms. Therefore, the inhibition of protein kinases involved in the abnormal phosphorylation of TDP-43 has emerged as a promising therapeutic approach for ALS in order to recover TDP-43 homeostasis and therefore multiple signalling pathways.

With this purpose, we have carried out a medicinal chemistry program where the thesis **“TDP-43 modulation: a novel therapeutic approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis”** have taken place, whose the main goal has been the validation of protein kinases as new therapeutic targets and the develop of protein kinases inhibitors as valuable drugs to treat ALS and TDP-43 proteinopathy disorders.

Firstly, we have performed a screening in our in-house MBC chemical library, selecting small molecules with potent and selective activity against protein kinases involved in the hyperphosphorylation of TDP-43 (CK-1, CDC7, TTBK1 and GSK-3 β), with high permeable ability to cross the blood brain barrier.

To assess the neuroprotective properties of these compounds, we used different in vitro and in vivo models. Potential modulation of TDP-43 pathology was first evaluated in a human neuroblastoma cell line model where most of the compounds showed ability to decrease TDP-43 phosphorylation upon ethacrynic acid treatment. We next stablished a human cellular model based on the immortalization and characterization of lymphocytes from ALS patients and healthy subjects. Altered TDP-43 homeostasis observed in ALS immortalized lymphocytes was recovered after treatment with selected compounds by decreasing TDP-43 phosphorylation, truncation and normalizing TDP-43 nuclear localization.

The involvement of different mechanism in ALS pathogenesis highlighted the need for a therapeutic approach targeted to multiple aspects. Therefore, we have tested selected drugs in an LPS-induced neuroinflammation model developed in rat primary microglial cultures.

Finally, the best pharmacological agents were tested in TDP-43 transgenic mice, where we observed in all cases a reduction in TDP-43 phosphorylation and a neuroprotective and/or anti-inflammatory effect in the lumbar spinal cord of transgenic mice when treated with protein kinases inhibitors.

Given the high failure rates and the length of time required for new drug development, we consider the “drug repurposing strategy” as the best approach to accelerate drug discovery process and therefore find an effective treatment for diseases that lack of it. Find new applications that are outside the scope of the original medical indications of a drug, is what we have made with Tidegluib, an in-house designed ATP-non-competitive GSK-3 β inhibitor, that have shown good safety and tolerability in patients with different neurological disorders. With this aim we have

tested its neuroprotective effect in several in vitro and in vivo models. The promising results obtained propose the repurposing of Tideglusib as a good therapeutic strategy for ALS treatment.

In view of these results, the inhibition of protein kinases involved in the aberrant TDP-43 phosphorylation by small molecules with brain high-permeable ability could be a novel strategy for the treatment of ALS as they recover TDP-43 homeostasis, the main hallmark of the disease.

III. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: ESCLEROSIS LARETAL AMIOTRÓFICA

Los grandes avances en el campo de la medicina en las últimas décadas han favorecido el crecimiento exponencial del número de personas mayores de 65 años, y en consecuencia, el aumento de la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas. Las más relevantes por el número de casos registrados son la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y en menor medida la esclerosis lateral amiotrófica conocida como ELA. En todas ellas se espera un crecimiento exponencial que triplicaría el número de casos actuales en los próximos 30 años.¹ De ahí la importancia de la búsqueda de nuevas terapias efectivas para este tipo de patologías.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas motoras en la corteza motora primaria, tronco encefálico y médula espinal, provocando una parálisis muscular progresiva de pronóstico mortal.² La ELA es un término que engloba también el espectro de síndromes caracterizados por la pérdida de motoneuronas (enfermedad de neurona motora) como la esclerosis lateral primaria, la atrofia muscular progresiva, la parálisis bulbar progresiva y la parálisis pseudobulbar.³

Terminológicamente, «esclerosis lateral» hace referencia al endurecimiento o gliosis de las fibras nerviosas que conforman el tracto corticoespinal lateral y ventral como consecuencia de la muerte de las neuronas que componen esa vía nerviosa. «Amiotrófica» (*a*: 'negación'; *mio*: 'musculo'; *trófico*: 'nutrición') se refiere a la atrofia de las fibras musculares como resultado de la falta de estímulo y por lo tanto pérdida de la capacidad de contracción.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1869 por el neurólogo Jean-Martin Charcot.⁴ Sin embargo, no fue hasta 1939 con el diagnóstico del famoso jugador de béisbol Lou Gehrig en Estados Unidos, cuando socialmente se conoció. De ahí que se denomine también enfermedad de Charcot o enfermedad Lou Gehrig.²

La baja prevalencia de esta enfermedad en la población hace que a día de hoy se siga considerando una enfermedad rara. Un estudio publicado en 2017 analizó el número de casos registrados a nivel mundial en 2010 en el que 1-2 de cada 100.000 personas estaban afectadas, siendo más incidente en hombres que en mujeres (1.41:1).⁵ Aunque un 5% de los casos tiene menos de 30, la edad media de afectación oscila entre los 50 y 70 años. Esta enfermedad es tan devastadora debido a la alta tasa de mortalidad, siendo la esperanza de vida media desde el diagnóstico de entre 3 y 5 años.⁶

En determinadas poblaciones, como en el oeste del pacífico (principalmente en la isla de Guam) existe una forma de ELA asociada a un *loci* geográfico, en donde la prevalencia de la enfermedad es de 50 a 100 veces mayor que en otras partes del mundo.⁷ La principal hipótesis está relacionada con la influencia de factores ambientales, concretamente a la presencia de la toxina L-BMAA (β -metilamino-L-alanina) en las raíces de las cicadáceas producida por cianobacterias simbióticas, presentes en estas áreas geográficas.⁸ Este aminoácido tiene un potencial neurotóxico muy elevado ya que aquellas personas que mantienen contacto directo con esta toxina desarrollan la patología característica de la ELA.

Estudios epidemiológicos a lo largo de las últimas décadas han ido identificando otros factores de riesgo como puede ser la exposición a agentes químicos relacionados con la agricultura, metales pesados, solventes, la exposición a campos electromagnéticos, el tipo de dieta, la actividad física y el tabaco.⁹

El riesgo de padecer enfermedades neurológicas concomitantes como depresión, demencia, enfermedad de Parkinson y epilepsia aumenta posiblemente debido a factores genéticos comunes. Sin embargo, disminuye la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares así como el factor de riesgo de padecerlas en pacientes con ELA.¹⁰

A día de hoy no existe tratamiento efectivo para esta enfermedad, posiblemente debido a la heterogeneidad que existe entre pacientes. Con el objetivo de poder diseñar estrategias terapéuticas efectivas se han agrupado a los pacientes en dos grupos en función de la carga genética. El 90-95% de los casos no tiene ningún antecedente familiar por lo que se les engloba dentro del grupo de ELA esporádica (ELAe). El 5-10% restante son personas que tiene al menos un familiar afectado y por tanto se les considera que tienen ELA de tipo familiar (ELAf) (**Figura 1**).¹¹

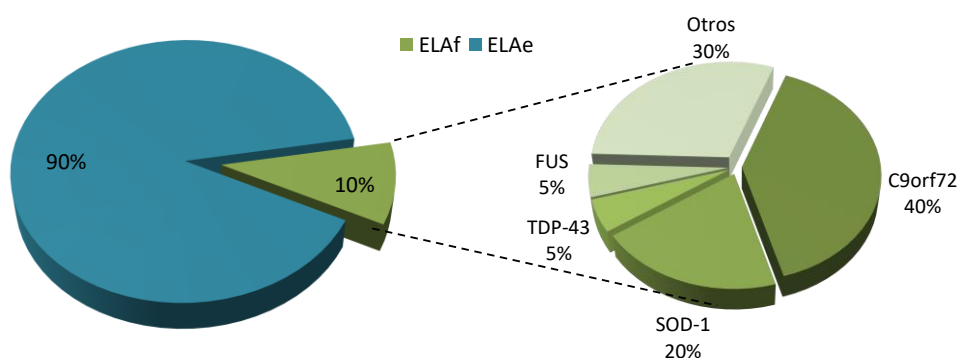


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de casos de ELA esporádica (azul) y ELA familiar (verde) con el desglose de las principales mutaciones asociadas a la ELAf.

2. BASES MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD

Los mecanismos moleculares patológicos que subyacen en la ELA son múltiples. Hasta el momento se han caracterizado numerosas variaciones genéticas y una serie de alteraciones en importantes procesos celulares relacionados con la aparición de la enfermedad.

2.1. Mecanismos patológicos

Ambos tipos de ELA independientemente de la presencia o no de mutaciones son indistinguibles desde el punto de vista sintomático lo cual sugiere una patogénesis común. La sinergia de la alteración de diversos mecanismos celulares contribuye a la muerte de la motoneurona. Entre ellos destacan el de estrés oxidativo, la alteración en el procesamiento de los ARN, alteraciones en la homeostasis proteica, disfunción mitocondrial, alteración en el transporte axonal, procesos de inflamación crónica y un aumento de la excitotoxicidad (**Figura 2**). La mayoría de estos mecanismos también se ven alterados en otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal (DFT), la EA y la EP entre otras.¹²

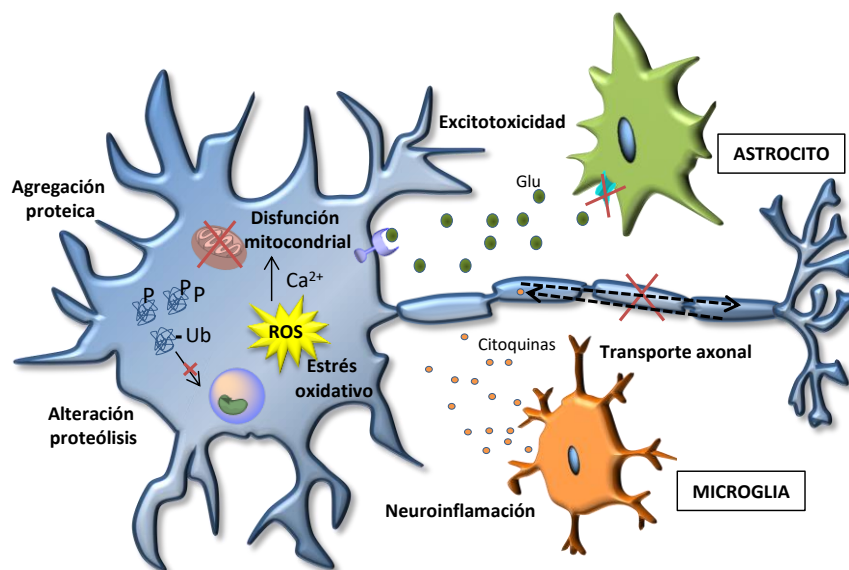


Figura 2. Representación de los principales mecanismos celulares alterados en las enfermedades neurodegenerativas.

- Estrés oxidativo:

El proceso de respiración celular que tiene lugar en las mitocondrias genera como producto especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas especies tienen un potencial de oxidación muy alto. En condiciones normales los mecanismos antioxidantes de nuestro organismo tienen la capacidad de reducir este exceso de ROS manteniendo la homeostasis celular. Sin embargo, en estado

patológico como en las enfermedades neurodegenerativas, la alteración de estos mecanismos compensatorios genera un desequilibrio que se traduce en la oxidación anómala de biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN que resultan tóxicas para la célula.¹³

- Disfunción mitocondrial:

La mitocondria tiene como principal función la producción de ATP y la regulación de los niveles intracelulares de calcio (Ca^{2+}). Es susceptible a daño por estrés oxidativo, ROS y acumulación de proteínas tóxicas.¹⁴ El transporte de las diferentes moléculas a lo largo del axón de gran longitud hace que el requerimiento energético de las motoneuronas sea bastante alto. Por tanto, una alteración en la maquinaria encargada de producir la energía va a impedir que mecanismos como el del transporte se den con normalidad. Se han descrito en pacientes con ELA alteraciones en la morfología y funcionalidad de las mitocondrias así como un aumento de los niveles de calcio intracelular.^{15,16} Las mutaciones en el ADN mitocondrial registradas en pacientes con ELA desencadenan también el estado patológico.¹⁷

- Excitotoxicidad:

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (SNC). Las células gliales previenen su acumulación en la hendidura sináptica mediante unos sistemas de captación del glutamato presentes en los astrocitos (EAAT2/GLU1), evitando así un efecto tóxico. Un aumento en el flujo de Glu durante la sinapsis, así como una alteración en su retirada de la hendidura sináptica provocan la sobreactivación de los receptores de glutamato (AMPA, NMDA) en la neurona post-sináptica y por consiguiente un exceso de calcio intracelular dañino para la célula (**Figura 3**). Esta toxicidad neuronal mediada por glutamato se denomina excitotoxicidad, y es una de las características comunes de las enfermedades neurodegenerativas que contribuye a la muerte neuronal.¹⁸

- Neuroinflamación:

Aunque la ELA se caracteriza principalmente por la pérdida de neuronas motoras, existe de manera concomitante una activación crónica de la respuesta inflamatoria. En condiciones normales, cuando se produce un daño en el SNC se va a inducir la activación de las células gliales con el correspondiente aumento intercelular de los niveles de citoquinas inflamatorias y con la infiltración de linfocitos T. Sin embargo, cuando el estímulo nocivo es persistente, como sucede en las enfermedades neurodegenerativas, la sobreactivación de la microglía y los astrocitos va a generar un proceso de inflamación crónica y severa que contribuye a la degeneración de las

neuronas. A su vez, esta neurodegeneración se ve potenciada por el llamado evento “muerte celular no-autónoma”, es decir, la presencia de agregados proteicos y otros marcadores patológicos en las células gliales, va a producir una disfunción en este tipo celular favoreciendo de esta forma la muerte neuronal.¹² Estudios histológicos de muestras de pacientes confirman la presencia de microglía reactiva, astrocitosis e infiltrados linfocíticos en la médula espinal. Esta respuesta inflamatoria aparece al inicio de la enfermedad y va agravándose a medida que transcurre el tiempo.¹⁹

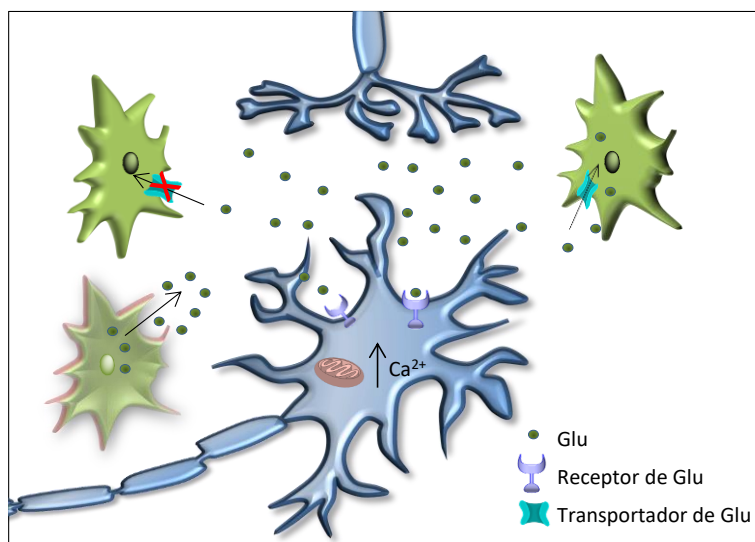


Figura 3. Representación del proceso de excitotoxicidad, en donde la expresión anómala del transportador en astrocitos (verde), el aumento de la sensibilidad de los receptores y la liberación anómala de este neurotransmisor al espacio intercelular por parte de neuronas y células gliales muertas amplifica la toxicidad mediada por glutamato.

- Alteración en el transporte axonal:

Las motoneuronas son células que se caracterizan por su axón de gran longitud cuya función es la de transmitir el impulso nervioso y transportar biomoléculas (proteínas, ARNm, lípidos, organelas...) al terminal pre-sináptico. Esta estructura está compuesta por microtúbulos y proteínas motoras como las dineínas y quinesinas implicadas en el mantenimiento de la estructura y transporte celular.

Las mutaciones presentes en proteínas que forman parte del citoesqueleto y de la maquinaria del transporte como la tubulina 4A o la dineína son una de las causas de la ELA. Por otro lado, se han detectado alteraciones del transporte axonal tanto en modelos experimentales como en muestras *post mortem* de pacientes.²⁰ Esta alteración es secundaria a otros procesos patológicos como la presencia de agregados proteicos que interfieren con las dineínas y quinesinas impidiendo el transporte retrógrado y anterógrado de endosomas y de orgánulos celulares, así

como el mal funcionamiento de las mitocondrias y por lo tanto el déficit en la producción de ATP necesario para que el transporte de biomoléculas a lo largo del axón sea óptimo.²⁰

- Agregados proteicos:

A pesar de la heterogeneidad entre pacientes, una característica patológica consistente y común en la mayoría de ellos es la presencia de agregados de proteínas aberrantes o mal plegadas en el citoplasma celular.²¹ La funcionalidad, formación y toxicidad de estos agregados es una pregunta que a día de hoy sigue sin resolverse. No se sabe si la neurodegeneración se está produciendo en parte por la toxicidad de estas inclusiones o, si por el contrario, son un mecanismo de defensa celular frente a proteínas dañadas.

El principal componente de los agregados presentes en los pacientes de ELA y en un alto porcentaje de los pacientes con DFT, es la proteína TDP-43 que aparece con diferentes modificaciones post-traduccionales en su estructura (**Figura 4**).²²

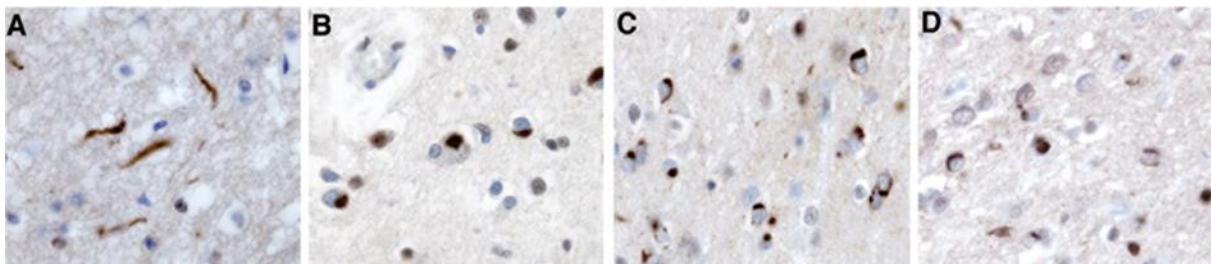


Figura 4. Muestras de la corteza frontal de 4 pacientes (A-D) con la proteinopatía de TDP-43. Las inclusiones citoplasmáticas corresponden a los agregados de la proteína TDP-43 (marrón) (*adaptada de Ref. 22*).

Por otro lado, existe una alteración de los principales mecanismos que participan en el aclaramiento/eliminación de proteínas como son el sistema ubiquitina-proteosoma y el lisosomal-autofágico en pacientes con ELA.²⁰ La disfunción de estos mecanismos favorece la pérdida de la homeostasis neuronal y en consecuencia la muerte celular. Las mutaciones en proteínas implicadas en estas vías de degradación como la optineurina (OPTN) y ubiquilina 2 (UBQLN2), también contribuyen a este desequilibrio.²³

2.2. Alteraciones genéticas

Aproximadamente un 10% de todos los casos de ELA tienen historial familiar, siendo el patrón de herencia mayoritariamente autosómico dominante. Un 5% de los pacientes con ELA

esporádica presentan también mutaciones en genes asociados a la enfermedad sin embargo no tienen ningún antecedente familiar que la haya padecido.²

El primer gen identificado fue el de la enzima superóxido dismutasa 1 Cu/Zn (SOD-1) en el año 1993.²⁴ Desde entonces, el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación del genoma ha permitido el descubrimiento de múltiples genes implicados en la ELA.²⁵ A día de hoy se han descrito más de 120 variaciones genéticas.²³ De todas ellas hay 25 mutaciones que se repiten con mayor frecuencia. Estos genes se pueden agrupar en 3 categorías en función de si codifican para proteínas involucradas en a) la homeostasis proteica, b) la estabilidad, función y metabolismo del ARN o c) en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del citoesqueleto (**Figura 5**).²

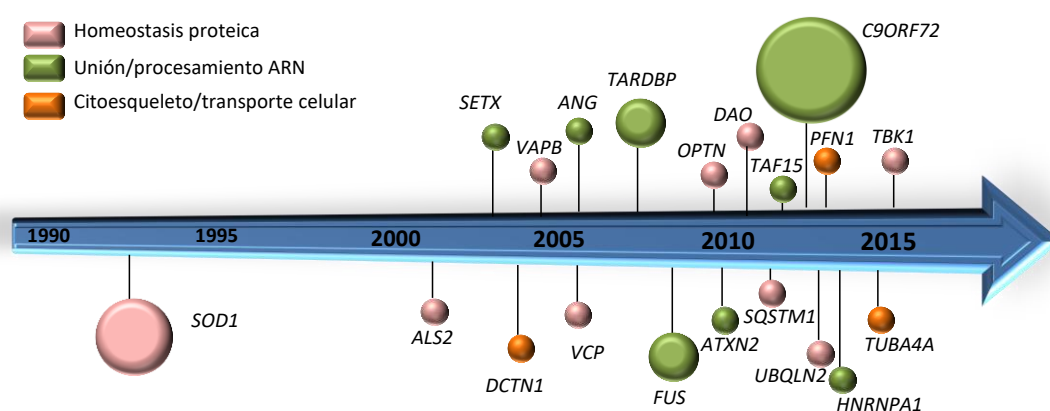


Figura 5. Representación en la línea del tiempo de los genes asociados a la patogénesis de la ELA y su implicación en los diferentes procesos celulares.

- Proteínas involucradas en la homeostasis proteica como SOD-1 (*SOD-1*) relacionada con el estrés oxidativo, o la enzima D-amino-ácido-oxidasa o DAO (*DAO*) con la excitotoxicidad. También se incluyen proteínas implicadas en los mecanismos de proteólisis, ya sea por la vía de la ubiquitina-proteosoma o autofágica. Las más relevantes son la quinasa 1 de unión a TANK (*TBK1*), la ubiquilina 2 (*UBQLN2*), la optineurina (*OPTN*), la proteína con contenido en valosina (*VCP*), la proteína VAPB; del inglés «VAMP-Associated Protein B» (*VAPB*), sequestosoma 1 (*SQSTM1*) y alsina (*ALS2*).²
- Proteínas de unión/procesamiento del metabolismo del ARN como la proteína de unión al ADN/ARN de respuesta transactiva de 43 KDa conocida como TDP-43 (*TARDBP*), la proteína FUS; del inglés «Fused in sarcoma» (*FUS*), la expansión de un hexanucleótido en la región no codificante del gen *C9orf72*, la ataxina 2 (*ATXN2*), la proteína TAF15; del

inglés «TATA binding protein associated factor 15» (*TAF15*), la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1 (*HNRNPA1*), la angiogenina (*ANG*) y la senataxina (*SETX*).²

- Proteínas implicadas en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad del citoesqueleto como la dinactina 1 (*DCTN1*), la tubulina 4A (*TUBA4A*) cuya integridad es fundamental para preservar estructura del axón y la profilina 1 (*PFN1*).²

Las mutaciones en los genes *SOD-1*, *C9orf72*, *FUS* y *TARDBP* son las más frecuentes y tienen la característica común de estar presentes tanto en casos de ELA familiar como esporádica (**Figura 6**).

2.2.1. Superóxido dismutasa 1 Cu/Zn

La proteína SOD-1 es una enzima que juega un papel muy importante en la defensa antioxidante de las células catalizando la conversión del superóxido en peróxido de hidrogeno y oxígeno. Entre un 15-20% de los pacientes con ELA familiar y un 2-3% de los casos esporádicos poseen mutaciones en este gen (**Figura 6**).²⁶ Actualmente hay descritas más de 150 variaciones genéticas de SOD-1; la mayoría son mutaciones sin sentido. Las más incidentes son A4V, D90A y G93C. El fenotipo que produce cada una de ellas es variable siendo el de los pacientes que poseen la mutación A4V el más agresivo con una esperanza de vida menor que el resto. Por el contrario, aquellos que presentan las mutaciones G93C y D90A tienen mejor pronóstico al ser más lento el desarrollo de la enfermedad.²⁷

Las variaciones patológicas de SOD-1 producen una disminución en torno al 50-80% de su actividad enzimática.²⁸ Sin embargo, esta pérdida de función no se correlaciona con la duración y la severidad sintomatológica de la enfermedad.²⁹ Ejemplo de ello es el modelo de ratón que se desarrolló en 1996 en donde el silenciamiento del gen de *SOD-1* no desarrolló el fenotipo motor característico de la ELA.³⁰ Por consiguiente, la toxicidad que se produce cuando la proteína sufre cambios conformacionales y funcionales está relacionada con la interacción patológica de esta con otras proteínas y otros mecanismos fisiológicos produciendo estrés oxidativo, agregados, disfunción mitocondrial, estrés a nivel de retículo endoplásmico, excitotoxicidad y alteración del transporte axonal entre otros.³¹

2.2.2. FUS

La proteína de fusión del sarcoma (FUS) (del inglés «Fused in sarcoma») es una proteína de unión al ARN que fue por primera vez identificada en pacientes con ELA en 2009.³² En condiciones

normales se localiza principalmente en el núcleo regulando la expresión génica y participando en los mecanismos de reparación del ADN.³³ Hay descritas más de 50 variaciones autosómicas dominantes que afectan a un 5% de pacientes con ELAf y a un 0.5% de los esporádicos (**Figura 6**).²⁶ La mayoría son mutaciones que alteran la señal de localización nuclear por lo que en condiciones patológicas se acumula en el citosol formando agregados.³⁴ Al igual que en otras proteínas, no se sabe si la degeneración de las neuronas motoras se debe a la pérdida de la función que ejerce FUS en el núcleo o a la ganancia de función tóxica en el citoplasma. Cabe resaltar que la sintomatología motora en los pacientes que tienen esta mutación suele aparecer antes de los 40 años.³⁵

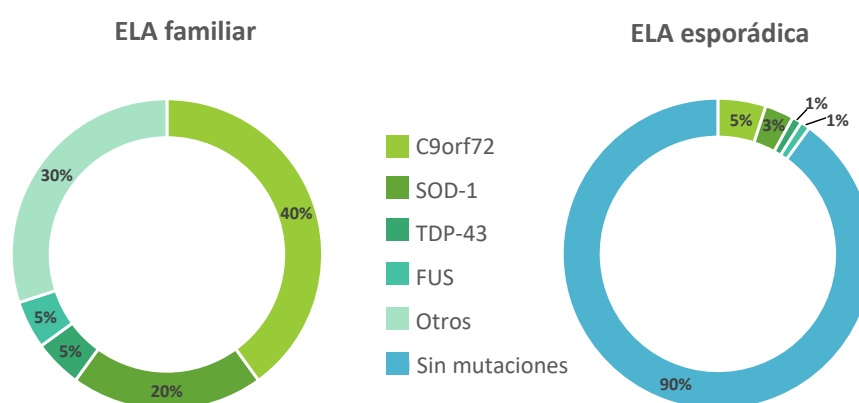


Figura 6. Representación del porcentaje de las principales mutaciones (SOD-1, C9orf72, TDP-43 y FUS) asociadas a la ELAf y a la ELAe.

2.2.3. *C9orf72*

La causa genética más común de la ELA y DFT de tipo familiar son las mutaciones en el gen *C9orf72* (del inglés «Chromosome 9 open reading frame 72»). Es tal el desconocimiento sobre la función fisiológica de esta proteína que se sigue manteniendo su nomenclatura como “marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9”. El gen *C9orf72* contiene una secuencia hexanucleótida (GGGGCC) que se localiza en una región no codificante del gen (intrón). En la mayoría de individuos sanos esta secuencia se repite entre 2 y 5 veces pero nunca más de 30. Sin embargo, en pacientes con ELA se han registrado cientos e incluso miles de repeticiones en un mismo sujeto.²⁰ Un 40% de los pacientes con ELAf y un 5% de los esporádicos presentan una expansión anormal de esta secuencia (**Figura 6**).²⁶

Los mecanismos por los cuales la repetición del hexanucleotido produce la degeneración neuronal se desconocen, sin embargo se han planteado tres hipótesis; puede ser por la pérdida de función de la proteína C9orf72, por la ganancia de función tóxica de los ARN que se obtienen de la transcripción del hexanucleotido o incluso por la ganancia de función de proteínas dipeptídicas repetidas o DPRs (del inglés «dipeptide repeat proteins») que se producen a partir de la traducción de estos ARN.³⁶ Estudios recientes han asociado esta anomalía con la alteración de algunos mecanismos celulares como el metabolismo del ARN por un arresto de las proteínas de unión al ARN así como una alteración en la regulación de los procesos de autofagia.³⁷

2.2.4. Proteína TAR de unión al ADN de 43 KDa

TDP-43 es una proteína de unión al ADN/ARN de respuesta transactiva de 43 KDa, codificada por el gen *TARDBP* que actúa principalmente regulando el metabolismo del ARN. En 2006 se describió por primera vez la presencia de agregados de TDP-43 en neuronas de pacientes con ELA y DFT.²² Sin embargo, no fue hasta 2008 cuando se identificó la primera mutación de TDP-43.³⁸ A día de hoy hay más de 50 mutaciones registradas con una incidencia del 5% en pacientes con ELA y un 1% en pacientes con ELAe (**Figura 6**).²⁶ Las más estudiadas son A315T, Q331K, M337V y G348C. Se localizan mayoritariamente en el extremo C-terminal de la proteína causando modificaciones a nivel funcional y en el transporte de la misma.³⁹

Estas inclusiones de TDP-43 se han descrito también en otras enfermedades y síndromes neurodegenerativos como la DFT tanto esporádica como familiar,⁴⁰ enfermedad de Alexander,⁴¹ síndrome de Perry,⁴² esclerosis hipocampal⁴³ y traumatismo encefalopático crónico.⁴⁴ Recientemente se han descrito también acúmulos de TDP-43 en la enfermedad de Alzheimer y en la encefalopatía predominantemente límbica relacionada con la edad y TDP-43 conocida como LATE.^{45,46}

Dada la evidente implicación de TDP-43 en el proceso patológico de estos trastornos englobados dentro de lo que se conoce como “proteinopatía de TDP-43”, se ha querido ahondar más en el estudio del papel fisiológico y el mecanismo por el cual TDP-43 está contribuyendo a la degeneración de las neuronas.

3. PATOLOGÍA DE TDP-43

A pesar de la heterogeneidad que existe entre los pacientes de ELA, llamativamente un 97% de los pacientes tanto esporádicos como familiares presentan agregados citoplasmáticos de TDP-

43.⁴⁷ Por este motivo las inclusiones citosólicas de TDP-43 se consideran hoy uno de los principales marcadores patológicos de la ELA.

TDP-43 es una proteína altamente conservada que pertenece a la subfamilia de las ribonucleoproteínas heterogéneas (RNPhn).⁴⁸ Esta proteína de expresión ubicua se localiza principalmente en el núcleo aunque existe un tránsito bidireccional entre el núcleo y el citosol.⁴⁹ TDP-43 está implicada en la transcripción, maduración y estabilidad del ARN de una gran variedad de proteínas que intervienen en diferentes procesos fisiológicos necesarios para el buen funcionamiento celular, como la sinapsis o la respuesta al estrés.³³ Sin embargo, todavía está por elucidar la relación entre los mecanismos moleculares en los que interviene TDP-43 y la neurodegeneración propia de la enfermedad.

En estado patológico, el equilibrio homeostático de TDP-43 se rompe concentrándose mayoritariamente en el citoplasma en donde sufre diferentes modificaciones post-traduccionales (fosforilación, ubiquitinación, fragmentación). Esta acumulación citoplasmática resulta ser tóxica para la célula bien porque la proteína deja de ejercer su función a nivel del núcleo o por la ganancia de función que adquiere en el citosol al formar agregados o al establecer nuevas interacciones proteicas.⁴⁹

3.1. Estructura de TDP-43

TDP-43 es una proteína de 414 aminoácidos codificada por el gen *TARDBP* localizado en el cromosoma 1p36. Contiene 7 exones de los cuales 5 son codificantes y 2 no codificantes (**Figura 7b**). En función del procesamiento post-transcripcional se producen 11 isoformas de TDP-43.⁵⁰ La expresión completa de la proteína es la principal isoforma detectada en tejidos de pacientes y modelos experimentales de esta proteinopatía.⁵¹

La estructura primaria presenta dos dominios altamente conservados de reconocimiento del ARN (RRM1 y RRM2) en el extremo N-terminal, así como una secuencia de localización nuclear o NLS (del inglés «nuclear localization signal») y una señal de exportación nuclear o NES (del inglés «nuclear export signal») necesarias para el tránsito de TDP-43 entre el núcleo y el citosol.⁴⁹ El extremo C-terminal se caracteriza por presentar un dominio rico en glicinas implicado en el reconocimiento de otras proteínas que contiene un “dominio prión” muy similar al específico de las proteínas prión, que favorece la propagación de las formas patológicas de la proteína hacia otros tejidos o células sanas (**Figura 7c**). Este dominio alberga la mayoría de mutaciones descritas

en TDP-43 por lo que está implicado en las modificaciones patológicas que sufre la estructura de la proteína y consecuentemente en la formación de agregados (**Figura 7a**).⁴⁹

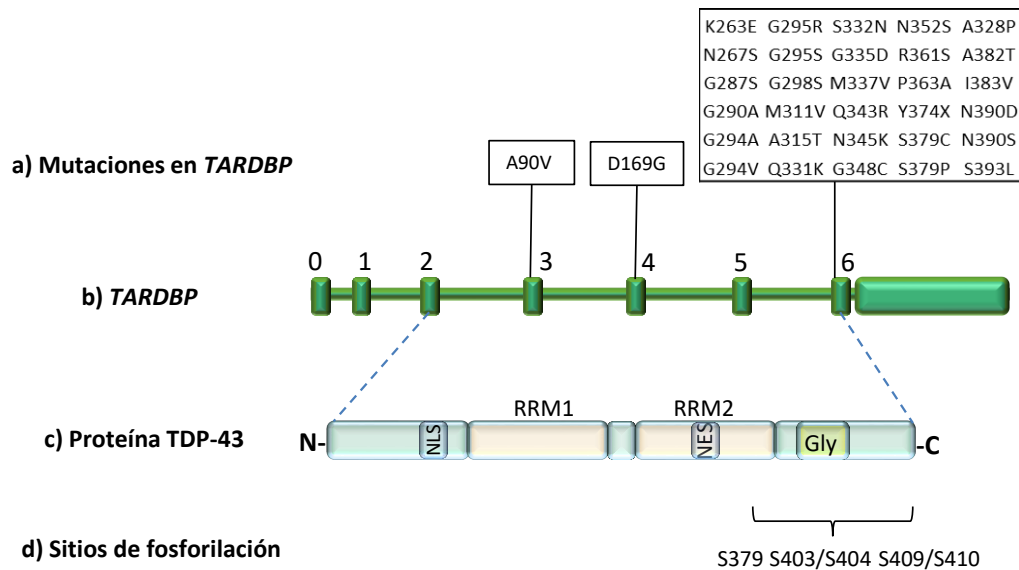


Figura 7. Estructura de TDP-43. Representación de las mutaciones (a), la estructura del gen (b), la estructura de la proteína (c) y los principales sitios de fosforilación (d).

3.2. Función fisiológica

TDP-43 está implicada directa o indirectamente en una amplia variedad de procesos celulares al controlar el metabolismo de más de 600 ARN mensajeros (ARNm).⁵²

A nivel nuclear regula la **transcripción**, **splicing** y el **procesamiento post-transcripcional** de los genes confiriendo estabilidad a los ARNm (**Figura 8**).³³ Entre las primeras dianas de TDP-43 que fueron descritas se encuentran los neurofilamentos humanos de bajo peso molecular (NFL)⁵¹ y la histona deacetylasa 6 (*HDAC6*)⁵³ ambas muy importantes para la viabilidad neuronal dada su implicación en la estabilidad de microtúbulos y en la agregación proteica, respectivamente. Otra diana de gran relevancia de TDP-43 es el transcrito de su propio gen al que se une en el extremo 3`UTR impidiendo la traducción del ARNm produciéndose una autorregulación de los niveles de TDP-43.⁵⁴

Por otro lado, esta proteína participa en la **biogénesis de microARN** (miARN); fragmentos de ARN no codificante de pequeño tamaño que regulan la expresión génica actuando como mecanismo de represión de la traducción (**Figura 8**).⁵⁵

La señal de exportación nuclear permite la salida de TDP-43 al citoplasma en donde participa en la estabilización, transporte y traducción de ARNm a través de los llamados complejos ribonucleoprotéicos (cRNP). Estos complejos están formados por ARNm, ARN no codificante y otras proteínas de unión al ARN (como FUS) las cuales controlan la localización, estabilidad y traducción del ARN que contienen. Los cRNP más destacados son los gránulos de estrés, cuerpos de procesamiento (conocidos como “P-bodies”) y gránulos de transporte (**Figura 8**).⁵⁶

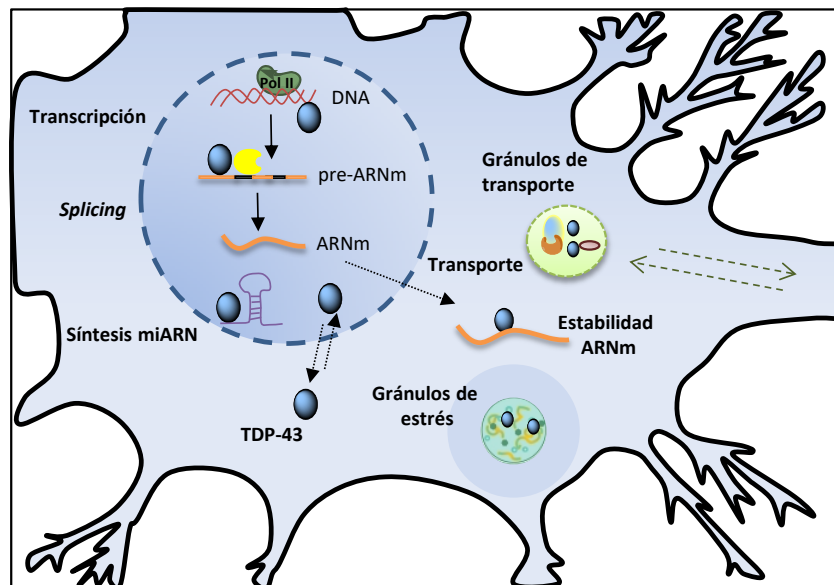


Figura 8. Función fisiológica de TDP-43 a nivel nuclear y citoplasmático.

En células altamente polarizadas como las neuronas, el transporte de determinados ARNm a través del axón y a las dendritas es indispensable para la actividad neuronal y la plasticidad sináptica. Un estudio realizado en cultivos de motoneuronas primarias en 2012 observó la presencia de TDP-43 co-localizada junto a otras proteínas de unión al ARN en unos gránulos altamente móviles que se transportaban a lo largo del axón y las dendritas de las motoneuronas,⁵⁷ por lo que una alteración en el metabolismo de TDP-43 estaría estrechamente relacionada con la disfunción sináptica.

Por otro lado, TDP-43 regula también la expresión génica en situaciones de estrés celular a través de **los gránulos de estrés (GE)**. Los GE son estructuras citoplasmáticas dinámicas y reversibles que aparecen como respuesta a un estímulo estresante. Están formadas por factores de traducción y múltiples proteínas de unión al ARN, incluyendo TDP-43. Estos gránulos secuestran los ARNm no implicados en la respuesta al estrés impidiendo su traducción, o por el contrario promoviendo la expresión de proteínas que actúan en respuesta a estos estímulos. Una

vez que el estímulo cesa estos gránulos se disuelven, la expresión de proteínas se normaliza y TDP-43 retorna al compartimento nuclear.⁵⁸

3.3. Modificaciones patológicas de TDP-43

La alteración del equilibrio nucleo-citosol así como la presencia de modificaciones post-traduccionales en la estructura de TDP-43, contribuyen a la alteración de la homeostasis de la proteína y por consiguiente a la degeneración de las motoneuronas.

3.3.1. Alteración en la localización celular

La localización de TDP-43 puede verse alterada tanto por factores genéticos como ambientales. Las secuencias NLS y NES presentes en la estructura de la proteína permiten en condiciones normales su tránsito bidireccional entre el núcleo y el citosol. Si alguna de estas secuencias sufre alteraciones, este equilibrio se rompe y en consecuencia TDP-43 se acumula en el citoplasma.⁵⁹ Hasta el día de hoy solo hay descrita una mutación en la secuencia de señalización nuclear; A90V.⁶⁰ Las mutaciones producidas en el extremo C-terminal de la proteína también favorecen su acumulación citoplasmática.⁶¹ Asimismo, estímulos ambientales estresantes para las neuronas pueden provocar también una alteración en la localización celular de TDP-43.^{62,63}

3.3.2. Fragmentación de TDP-43

Una de las características propias de la patología de TDP-43 es la presencia de fragmentos de bajo peso molecular del extremo C-terminal (FCT) de esta proteína en el citoplasma de las motoneuronas. Este dominio contiene 3 secuencias de corte en las que actúa la caspasa 3 generando fragmentos citotóxicos de 25-35 KDa.⁶⁴ Hasta el momento, estos FCT solo se han detectado en muestras de cerebro de pacientes, en muy pocos casos se ha descrito la presencia de estos fragmentos a nivel de medula espinal aun habiendo degeneración de las motoneuronas inferiores.⁶⁵

Con el fin de evaluar el efecto fisiopatológico que producen estos fragmentos de bajo peso molecular se han desarrollado diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. La degeneración neuronal producida por la escisión de la proteína de TDP-43 ha sido reproducible en cultivos celulares pero no en todos los modelos transgénicos animales.⁶⁶ Por lo que se puede considerar que los FCT de TDP-43 son una característica de la patología pero no un factor desencadenante de la neurodegeneración.

3.3.3. Agregación de TDP-43

Como se ha comentado anteriormente, el principal componente de los agregados proteicos presentes en la mayoría de pacientes con ELA es la proteína TDP-43.²² El papel que juegan estos agregados en la patología está aún por determinar. La mayoría de los estudios asocian la presencia de estas inclusiones con un efecto tóxico celular, sin embargo, en 2016 se describió un modelo de *Drosophila* de TDP-43 en el que los agregados tenían un papel neuroprotector en las primeras fases de la enfermedad,⁶⁷ hecho que se observa también en otras enfermedades como la enfermedad de Huntington (EH).⁶⁸

La formación de estos agregados puede ser como resultado de las mutaciones que sufre la propia proteína, por el aumento de los niveles endógenos de la misma, por una alteración en su localización o incluso por una alteración en la vía de degradación ubiquitina-proteosoma (**Figura 9**).^{69,70} La presencia de otras proteínas de unión al ARN en estos agregados plantea la posibilidad de que estos se hayan formado como consecuencia de un estímulo persistente estresante para la célula, de tal forma que los gránulos de estrés nunca llegan a dispersarse y acaban formando agregados proteicos aberrantes.⁷¹

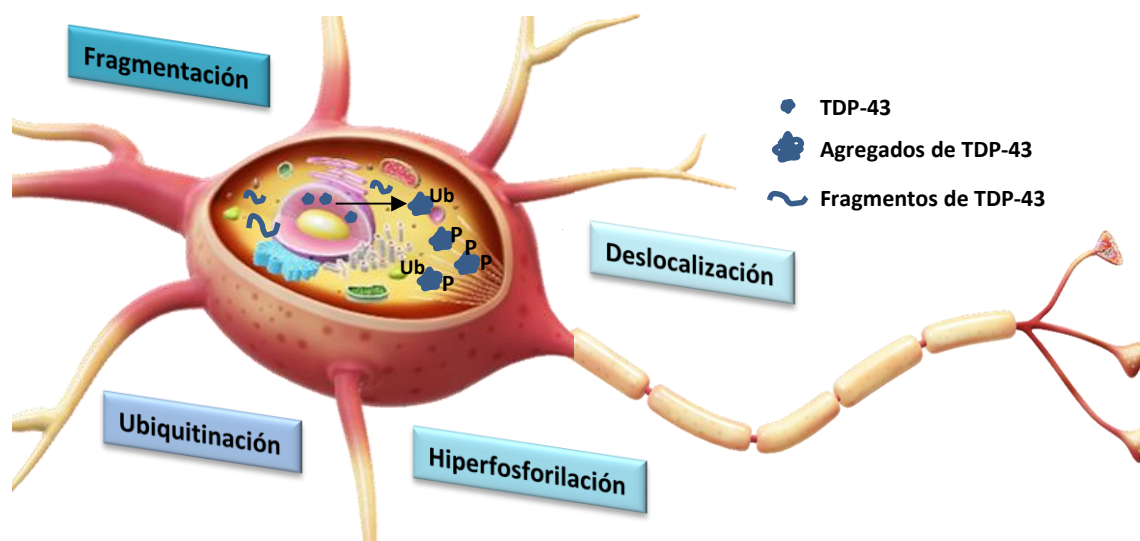


Figura 9. Representación de las principales modificaciones que sufre TDP-43 en estado patológico; fragmentación, deslocalización, agregación, ubiquitinación (Ub) y fosforilación (P).

3.3.4. Modificaciones post-traduccionales

La hiperfosforilación y la ubiquitinación son las modificaciones post-traduccionales más comunes que presenta la estructura de TDP-43 en los tejidos de los pacientes.^{72,22} Recientemente

se han descrito otras alteraciones relacionadas con el proceso patológico de la enfermedad como la oxidación de cisteínas,⁷³ la acetilación de lisinas,⁷⁴ la sumoilación⁷⁵ o la poli ADP-ribosilación.⁷⁶

La hiperfosforilación de TDP-43 es el marcador más consistente de esta proteinopatía. Se han registrado acúmulos de TDP-43 hiperfosforilada en neuronas, células gliales y músculo esquelético de un alto porcentaje de pacientes con ELA tanto esporádica como familiar.⁷⁷ Aunque el significado fisiológico de esta fosforilación anómala no está del todo claro, numerosos estudios sugieren un efecto tóxico ya que se ha visto que aparece en estado patológico y solo a nivel de citoplasma.⁷⁷

Los residuos más susceptibles de ser fosforilados se encuentran en el extremo C-terminal de la proteína. Los más comunes son las serinas 379, 403/404 y 409/410 (**Figura 7d**).⁷² La fosforilación en las serinas 409/410 (Ser409/410) de TDP-43 es una característica altamente consistente presente en las inclusiones patológicas de todo el espectro de síndromes que se engloban dentro de la proteinopatía de TDP-43.⁷⁸

Las enzimas que catalizan las reacciones de fosforilación son las proteínas quinasas. Las principales quinasas que modulan la fosforilación de TDP-43 directa o indirectamente son la caseína quinasa 1 (CK-1),⁷⁹ la quinasa del ciclo de división celular 7 (CDC7),⁸⁰ la tau tubulina quinasa 1 y 2 (TTBK1 y TTBK2),⁸¹ la glucógeno sintasa 3 (GSK-3)⁸² y las proteínas quinasas activas por mitógenos (MAPK/ERK).⁸³

Con el fin de analizar las consecuencias funcionales de la fosforilación anómala de TDP-43, se han realizado diferentes estudios experimentales. Por ejemplo, la sobreexpresión *in vitro* de TDP-43 en modelos celulares de ELA y DFT, lleva asociado un aumento en la fosforilación tanto de la proteína completa como de los FCT.^{84,85} A su vez un aumento en la expresión de TDP-43 en diferentes modelos transgénicos animales también lleva consigo un aumento en el contenido de agregados de TDP-43 fosforilada similares a los que se encuentran en muestras de pacientes humanas.^{86,87} En líneas generales se podría decir que existe una correlación directa entre el aumento de los niveles citosólicos de TDP-43 y el estado de fosforilación de la misma.

El significado funcional de los agregados ubiquitinados tampoco está del todo claro. La principal hipótesis es la alteración del sistema ubiquitina-proteosoma. La inhibición de este sistema *in vitro* aumenta el contenido proteico de TDP-43 ubiquitinada.⁴⁹

Las mutaciones en proteínas asociadas a la enfermedad que intervienen en los mecanismos de proteólisis van a contribuir al funcionamiento anómalo de estos sistemas, como por ejemplo

p62 y VCP; proteínas implicadas en la formación de autofagosomas.⁸⁸ Por otro lado, TDP-43 regula el metabolismo de ARNm que codifican para proteínas implicadas en la autofagia y factores de transcripción (TFEB) implicados en la expresión de proteínas lisosomales y autofágicas.^{89,90} Es por ello por lo que una alteración en la homeostasis de TDP-43 puede producir alteraciones en la vía de degradación proteica produciéndose los acúmulos de TDP-43 fosforilado y ubiquitinado que se observan en muestras de pacientes de ELA y DFT.²² Sin embargo sigue existiendo la duda de si la formación de estos agregados son consecuencia de las modificaciones post-traduccionales o por el contrario son previas a este fenómeno.⁷⁷

4. MODELOS EXPERIMENTALES

Prácticamente todos los fármacos con resultados prometedores en los estudios preclínicos no han tenido una eficacia significativa en los pacientes como para continuar con su desarrollo. La principal causa es la falta de buenos modelos experimentales que recapitulen la enfermedad ya que el tejido del SNC de los pacientes tiene la limitación de que solo está disponible *post mortem*. Para poder elucidar el mecanismo fisiopatogénico de la ELA y a su vez desarrollar nuevas terapias es necesario el desarrollo de buenos modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.1. Modelos celulares

Se han utilizado diferentes **líneas celulares** (humanas y murinas) así como **cultivos primarios** de células animales como modelo para evaluar la vulnerabilidad de las neuronas frente a diversos factores como el estrés oxidativo, la toxicidad producida por glutamato, la inflamación, la sobreexpresión de proteínas (con y sin mutaciones) y la formación de agregados proteicos entre otros. Con ello se pretende ahondar en el conocimiento de la función biológica de los mecanismos y proteínas asociados a la ELA.

Entre las líneas neuronales más utilizadas se encuentran: las murinas PC12, Neuro2a (N2a), NSC-34 y las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.⁹¹ Considerando que la ELA afecta principalmente a las motoneuronas, la línea NSC-34 adquiere gran relevancia al presentar características similares a las motoneuronas puesto que deriva de la fusión de una línea de neuroblastoma con células de la médula espinal.⁹² También se utilizan líneas celulares no neuronales como HEK293, HeLa y U2OS que se caracterizan por la facilidad de crecimiento y transfección con el fin de estudiar las mutaciones genéticas y el efecto terapéutico de posibles fármacos.⁹¹

A día de hoy, se han descrito numerosos ensayos celulares que recapitulan alguno de los aspectos patológicos descritos en las muestras biológicas de pacientes. A **nivel neuronal** se ha inducido la sobreexpresión de diferentes proteínas relacionadas con la ELA, ya sea la forma silvestre o la mutada, viéndose como resultado un aumento de los agregados de proteínas y una disminución de la viabilidad celular.⁹¹ Por el contrario, también se han desarrollado modelos en los que se produce el silenciamiento de genes con ARN de silenciamiento o siARN, emulando la pérdida de función de las proteínas que presentan mutaciones o deslocalización celular.⁹³

El estudio de la implicación de los agregados proteicos en el mecanismo patológico se ha llevado a cabo mediante la transfección de plásmidos con la proteína silvestre o mutada, o mediante inyección directa de agregados previamente sintetizados en bacterias. En el primer caso, la sobreexpresión de las proteínas desencadena mayoritariamente la formación de agregados citoplasmáticos.⁹⁴ En el segundo, la inyección de agregados de TDP-43 emula la patología de la enfermedad al reclutar TDP-43 nuclear y favorecer su agregación.⁹⁵

También se han descrito modelos en los que se inducen modificaciones post-traduccionales en la proteína de interés. En el caso de TDP-43, el tratamiento de los cultivos celulares con ácido etacrínico favorece la fosforilación de proteínas mediante la depleción del glutatión produciendo muerte celular (**Figura 10**).⁹⁶ Este modelo es óptimo para la validación del efecto neuroprotector de fármacos que inhiban las proteínas quinasas con el fin de reducir hiperfosforilación de TDP-43.⁹⁷

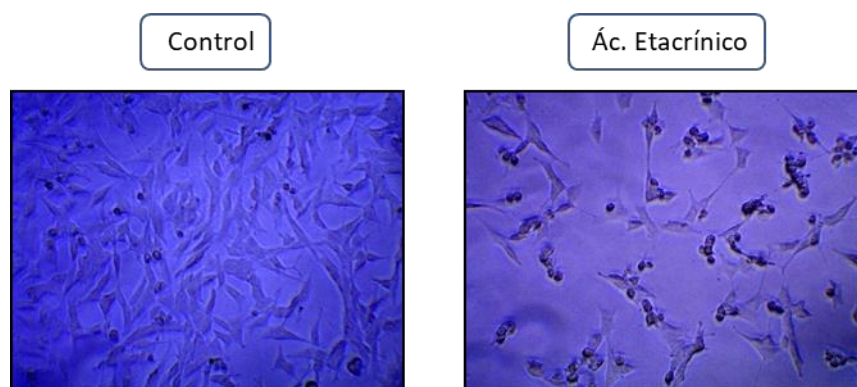


Figura 10. Cultivos celulares de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y sin tratar (control) o tratados con ácido etacrínico en donde se aprecia un porcentaje de muerte significativo.

Otra forma de reproducir la patología es mediante la exposición de las células a la toxina L-BMAA. Esta toxina produce una alteración en la homeostasis proteica, disfunción mitocondrial y del retículo endoplásmico e incluso puede llegar a causar excitotoxicidad y estrés oxidativo a altas

concentraciones.⁹⁸ En otro estudio se utiliza la exposición de las células a metales pesados para conseguir una disminución de la actividad enzimática de SOD-1 y la apoptosis celular.⁹⁹

Algunos modelos se fundamentan en recrear el ambiente fisiológico del SNC de los pacientes induciendo excitotoxicidad o estrés oxidativo. Un aumento de glutamato extracelular mediado por la inhibición de los transportadores que lo recapturan o por la adición de este neurotransmisor al medio de cultivo, produce una estimulación excesiva de los receptores post-sinápticos que resulta en un aumento del flujo de iones al espacio intracelular, tóxico para la célula.¹⁰⁰ Por otro lado, el estrés oxidativo mediado por la adición de arsenito, peróxido de hidrogeno o L-butionina sulfoximina (BSO) tiene también como resultado una alteración en la viabilidad celular.^{101,102}

Aparte de los cultivos neuronales, se utilizan también líneas celulares y cultivos primarios de **células gliales** para el estudio de otros procesos concomitantes como por ejemplo la inflamación. La línea de microglía murina BV2 es una de las más utilizadas para el estudio del mecanismo inflamatorio mediado por el lipopolisacárido de membrana bacteriano LPS.¹⁰³ Otras líneas celulares utilizadas son la astrogliosa humana U87MG, el oligodendroglioma M003.13 y el astrocitoma U87.⁹¹

A día de hoy el modelo que más ha ayudado al entendimiento de la enfermedad y al descubrimiento de dianas terapéuticas han sido las **muestras post mortem** del cerebro y médula espinal de los pacientes. Sin embargo, no hay que olvidar que estas muestras pertenecen a casos terminales de patología avanzada por lo que reflejan el último estadio de la enfermedad, no representan los procesos patológicos iniciales a nivel celular y/o molecular.

Puesto que el tejido del SNC de los pacientes solo está disponible *post mortem*, el uso de células no neurales de estos pacientes es una estrategia complementaria y alternativa en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Actualmente se utilizan **muestras biológicas** de linfocitos, fibroblastos o miocitos de pacientes, estos últimos obtenidos a partir de biopsias de piel y músculo respectivamente. Aunque estas muestras biológicas no forman parte del SNC, recapitulan las características patológicas descritas en las motoneuronas de los pacientes, como la hiperfosforilación y el incremento de la concentración de TDP-43 en el citoplasma de los linfocitos (**Figura 11a**),¹⁰⁴ el aumento de agregados de TDP-43 así como la alteración de los mecanismos de reparación del ADN en fibroblastos de pacientes (**Figura 11b**),¹⁰⁵ y la disfunción mitocondrial presente en los miocitos.¹⁰⁶

En 2012 se publicó un estudio donde se analizaron biopsias de musculo de 36 pacientes con ELA. La principal diferencia entre afectados e individuos sanos fue la disminución del diámetro de las fibras musculares en pacientes afectados así como la alteración en la expresión y estado de fosforilación de 17 proteínas (**Figura 11c**).¹⁰⁷ Por ello, las muestras biológicas de pacientes, aunque sean de tejidos periféricos son de gran valor para el estudio de la patogénesis de la ELA.

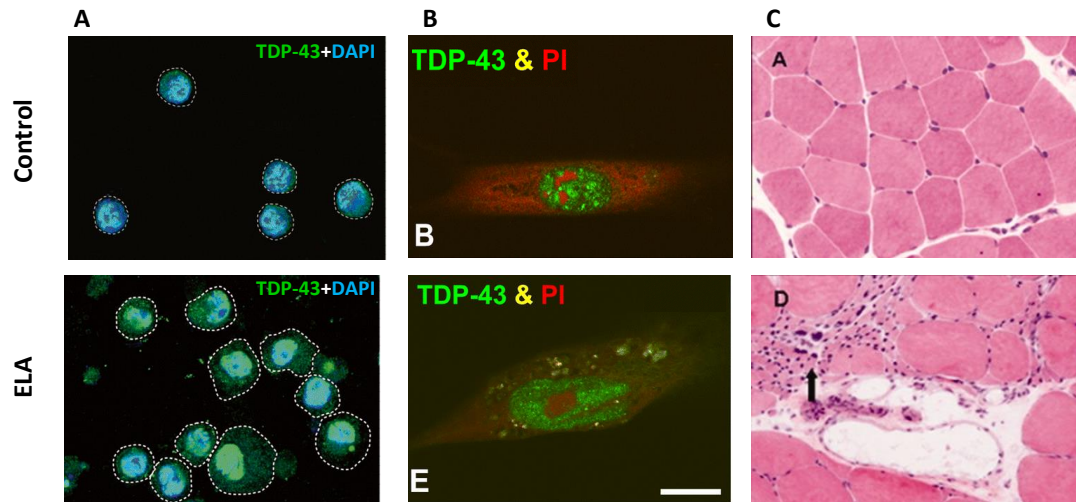


Figura 11. Detección de la localización de TDP-43 (verde) mediante inmunohistoquímica en (a) linfocitos (*adaptada de Ref.104*) y (b) fibroblastos de pacientes con ELA y controles (*adaptada de Ref.105*). (c) Secciones de fibras musculares de controles y pacientes con ELA en donde se parecía atrofia muscular (flecha negra) (*adaptada de Ref.107*).

Por último, la modelización de la enfermedad a partir de **células madre pluripotentes inducidas** (iPSC, del inglés «induced-pluripotent stem cells»). Las iPSC se obtienen a partir de la reprogramación de células adultas del propio paciente a un estado pluripotente similar al de las células madre embrionarias que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular (**Figura 12**). Este logro ha sido un gran avance científico en cuanto a que reemplaza el uso de las células madre embrionarias al ser idénticas en algunos aspectos y similares en otros.¹⁰⁸ En 2008 se obtuvieron por primera vez motoneuronas a partir de la reprogramación de los fibroblastos de un paciente de ELA que portaba una mutación en SOD-1.¹⁰⁹ Desde entonces, se han ido derivando iPSC de pacientes con ELA a diferentes tipos celulares como neuronas, motoneuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann y mioblastos entre otros.¹¹⁰

Las iPSC son una herramienta muy poderosa para modelizar las enfermedades neurodegenerativas debido a que las neuronas y motoneuronas obtenidas a partir de iPSC de pacientes con ELA recapitulan las características patológicas de la enfermedad. En 2014 el grupo de Chen describió la presencia de inclusiones de neurofilamentos en motoneuronas obtenidas a

partir de iPSC de pacientes con mutaciones en SOD-1 (D90A y A4V),¹¹¹ hecho que se describió años antes en modelos transgénicos de ratón de SOD-1.¹¹² Por otro lado, las neuronas provenientes de iPSC de pacientes con mutaciones en TDP-43 (Q343R, M337V, and G298S), tienen tendencia a desarrollar agregados de TDP-43 en el citoplasma así como a disminuir la longitud de las neuritas como consecuencia de una alteración en la expresión de neurofilamentos intermedios.¹¹³ También se han modelizado motoneuronas de pacientes con ELAe. En 2013 se realizó un estudio de 16 pacientes en los que 3 de ellos presentaban agregados hiperfosforilados de TDP-43 en las neuronas derivadas de iPSC, hecho que concuerda con el análisis del tejido *post mortem* de esos pacientes.¹¹⁴

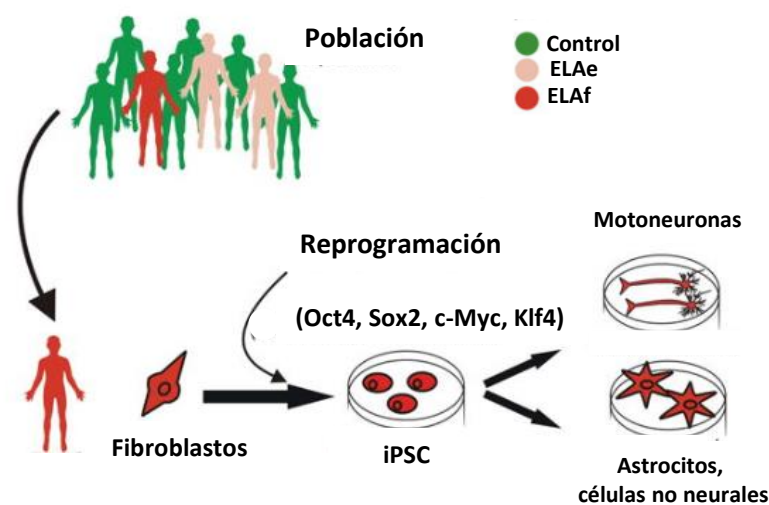


Figura 12. Representación del proceso de reprogramación celular desde los fibroblastos hasta las células de interés (adaptada de Ref.110).

La modelización de la enfermedad a partir de iPSC ha sido una gran revolución en el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas no solo porque recapitulan las características patológicas de la enfermedad sino también porque se consideran una buena estrategia terapéutica para este tipo de enfermedades en donde la pérdida progresiva de neuronas podría suplirse con el trasplante de las iPSC.

Como conclusión general, todos estos modelos nos confieren información importante acerca de la función biológica de las proteínas, así como de los mecanismos patológicos asociados al riesgo de padecer la enfermedad. Sin embargo, no recapitulan la complejidad de la enfermedad puesto que son modelos aislados y no se está teniendo en cuenta la integración de todos los mecanismos implicados en todo el organismo.

4.2. Modelos animales

Con el descubrimiento de la primera mutación asociada a la ELA empezó el diseño de una gran variedad de modelos animales. El primer modelo se desarrolló en 1994 en ratones que expresaban la proteína SOD-1 humana con la mutación G93A (SOD-1^{G93A}).¹¹⁵ A día de hoy hay descritos numerosos modelos en diferentes especies animales; gusanos (*Caenorhabditis elegans*),¹¹⁶ mosca (*Drosophila melanogaster*),¹¹⁷ pez cebra (*Danio rerio*),¹¹⁸ roedores,¹¹⁹ e incluso alguno en primates.¹²⁰ Cada uno de ellos tienen sus ventajas y limitaciones tal y como se resume en la **figura 13**.¹²¹ Estos modelos se generan a través de modificaciones genéticas o se inducen mediante factores ambientales. A continuación se comentaran algunos de ellos.






	 Levaduras	 <i>C. elegans</i>	 <i>D. melanogaster</i>	 Pez cebra	 Roedores
Ciclo vital	Corto	Corto	Corto	Medio	Largo
Coste	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Alto
% de genes con homólogo humano	30%	35%	75%	>90%	100%
Conservación de las proteínas	26%	35%	40%	75%	85%
Publicaciones en ELA	84	77	184	62	>4500

Figura 13. Resumen de las ventajas e inconvenientes de las diferentes especies animales como modelo de estudio para la ELA (adaptada de Ref.121).

4.2.1. Modelos ambientales

Los modelos ambientales se basan en la exposición de los animales a diferentes toxinas que han sido previamente reportadas en humanos como factores desencadenantes de la enfermedad.

BSSG es un esteroide presente en las semillas de las cícadas de la isla de Guam cuya ingesta desencadena el cuadro clínico del síndrome conocido como “Esclerosis lateral amiotrófica y Parkinsonismo-demencia” (ELA-PDC). Basándose en estos antecedentes, se han desarrollado modelos murinos en los que la exposición a esta toxina produce degeneración neuronal. En ratones produce disfunción motora en respuesta a la degeneración progresiva de las

motoneuronas.¹²² Sin embargo, el fenotipo que aparece en el modelo de rata difiere en cuanto que se produce un déficit cognitivo por la degeneración de la sustancia *nigra pars compacta* lo que se asemeja más a un modelo de Parkinson-demencia que a la ELA.¹²³

En la misma línea, la inducción de la degeneración neuronal a través de la toxina L-BMAA presente también en las raíces de las cicadáceas es otra forma de modelizar la ELA esporádica. Este modelo se desarrolló en ratas y recapitula las características degenerativas propias de la enfermedad como es la disminución del volumen muscular y de la corteza motora, un aumento en los niveles de TDP-43 así como una alteración en los niveles de los neurotransmisores.^{124,125}

Recientemente se ha descrito un modelo de neurodegeneración en el pez cebrá en el que la exposición al bisfenol A (BPA) (producto que se empleaba en la fabricación de plásticos) produce afectación motora, degeneración de motoneuronas, alteraciones en la unión neuromuscular y activación de microglía. Este modelo necesita ser optimizado y caracterizado más a fondo puesto que la degeneración no es específica solo de motoneuronas.¹²⁶

4.2.2. Modelos genéticos

Como se ha comentado anteriormente, las mutaciones descritas asociadas a la ELA van a producir una pérdida de función de la proteína por la alteración de la actividad o deslocalización celular, o bien, una ganancia de función por la formación de agregados o nuevas interacciones con otras proteínas. Para comprobar la veracidad de estas hipótesis, se han desarrollado modelos en los que se induce la sobreexpresión de la proteína endógena o humana con o sin mutaciones en el organismo de estudio o por el contrario el silenciamiento total o parcial de la misma.

Existe gran variabilidad entre los modelos animales transgénicos descritos. El efecto de la sobreexpresión o silenciamiento de una proteína va a variar en función del fondo genético del animal, del promotor del transgén, etc. Para el desarrollo de estos modelos se han utilizado promotores que difieren principalmente en el patrón de expresión. Entre los más utilizados está la proteína priónica de ratón (PrP) de expresión ubicua siendo mayoritaria en el SNC y corazón.¹²⁷ También se han utilizado promotores específicos neuronales como Thy1.2 o el promotor de la proteína quinasa II dependiente de Calcio/calmodulina (CaMKII) cuyo patrón de expresión es más específico de hipocampo y corteza frontal asemejándose más a un modelo de DFT.^{128,129}

Más de 20 modelos murinos de **SOD-1** han sido desarrollados desde que se describió el primero en 1994. Estos modelos se caracterizan por presentar degeneración y pérdida de las

motoneuronas, plegamiento anómalo de SOD-1, déficit metabólico, gliosis y debilidad muscular.¹³⁰ El más utilizado es el SOD-1^{G93A} al ser el que mejor recapitula la patología humana.¹¹⁵ En este modelo se obtuvieron resultados positivos con Edaravona, fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la ELA.¹³¹ La principal desventaja es la severidad de los síntomas motores en la última etapa de la enfermedad. Aunque es el modelo más utilizado no hay que olvidar que solo representa a un 20% de los pacientes con ELAf y un 3% de los ELAe.

En líneas generales, la mayoría de estudios sugieren que el efecto perjudicial que provoca SOD-1 cuando sufre alguna mutación se debe más a una ganancia de función que a una pérdida de la misma. Los modelos de ratón que sobreexpresan SOD-1 tienden a desarrollar el fenotipo motor característico, hecho que no ocurre en los ratones que tienen silenciado el gen y por lo tanto no expresan la proteína.³⁰ En algunos casos la mutación en SOD-1 afecta a su actividad viéndose reducida, sin embargo, en otros casos la actividad se ve muy poco alterada o incluso aumentada.¹³² La estrategia terapéutica en este caso sería reducir la concentración celular de SOD-1.

En el caso de **TDP-43**, los modelos establecidos tienen como finalidad analizar el efecto de la pérdida o ganancia de función de la proteína. La mayoría de modelos de TDP-43 presentan la patología típica de esta proteinopatía como la degeneración y pérdida de las motoneuronas, déficit metabólico, astrogliosis, microgliosis y debilidad muscular.¹²¹ En líneas generales, la sobreexpresión de la proteína TDP-43 (mutada o silvestre) en diferentes organismos produce neurotoxicidad. Algunos modelos generan agregados citoplasmáticos e incluso FCT.^{130,133} No obstante, no se considera requisito indispensable para la degeneración de motoneuronas puesto que no lo presentan todos los modelos con afectación motora propia de la ELA.

El modelo murino TDP-43^{A315T} es el más favorable para el estudio de la enfermedad puesto que recapitula la patología tanto a nivel de genotipo como de fenotipo.¹³⁴ Una de las desventajas es que el principal motivo de muerte se debe a la obstrucción intestinal que presentan los animales de este modelo. Esto se consiguió minimizar años más tarde al administrar la comida en formato gel.

Por otro lado, con el fin de evaluar el efecto producido por la pérdida de función de TDP-43 en el núcleo, se han desarrollado modelos en los que se produce el silenciamiento total o parcial de *TARBDP*. La mayoría de modelos desarrollan el fenotipo motor con degeneración y pérdida de motoneuronas,^{135,136} sin embargo, el silenciamiento total de TDP-43 es letal desde las primeras etapas del desarrollo embrionario.^{137,138}

El análisis conjunto de los modelos de TDP-43 de moscas, gusanos, peces y roedores se inclina más a que la toxicidad producida por TDP-43 se debe a la pérdida de función más que al potencial tóxico de los agregados citoplasmáticos, sin embargo, sigue siendo tema de debate a día de hoy.¹³⁹ Lo que está claro es que la regulación de los niveles de TDP-43 tiene que ser muy precisa, puesto que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento producen degeneración de motoneuronas.

Por el contrario, en el caso de **FUS**, los modelos murinos descritos han demostrado que la pérdida de función de esta proteína mediante el silenciamiento de la misma, no produce neurodegeneración ni desarrolla la patología típica de la ELA.¹⁴⁰ Sin embargo, modelos en los que se sobreexpresa la proteína presentan un fenotipo motor agresivo con inclusiones citoplasmáticas de FUS que contribuyen a la degeneración de las neuronas motoras.^{141,142} Por lo tanto, la toxicidad aparente provocada por FUS en los pacientes se debe a una ganancia de función tóxica de esta proteína que puede ser por la formación de agregados y/o por la posible interacción de FUS con otras proteínas.¹⁴³

Una de las grandes limitaciones para el avance en el estudio de la enfermedad es la falta de buenos modelos de **C9orf72**. Ninguno de los descritos hasta el día de hoy es capaz de desarrollar un fenotipo motor severo. Tan solo en el modelo murino h(G₄C₂)₃₇₋₅₀₀ aparece algún signo de afectación motora.¹⁴⁴ Aun con esta limitación, los modelos descritos de C9orf72 se emplean mayoritariamente para el estudio de los mecanismos celulares afectados como consecuencia de la alteración de esta proteína. Sin embargo, urge la necesidad de desarrollar buenos modelos que recapitulen la patología a nivel de genotipo y fenotipo para esta mutación puesto que está presente en un 40% de los pacientes con ELAf y un 5% de los esporádicos.

5. FÁRMACOS ACTUALES

Actualmente no existen fármacos efectivos para el tratamiento de la ELA. Tan solo hay aprobados dos fármacos paliativos que alargan la supervivencia del paciente entre 3 y 6 meses.

El 10 de junio de 1996 la Agencia Europea del Medicamento (EMA) autorizó la comercialización del primer medicamento como tratamiento para la ELA; el Rilutek®. El principio activo es el Riluzol (**Figura 14**), un derivado de benzotiazol que actúa evitando la excesiva activación de las neuronas motoras protegiéndolas frente a la toxicidad por glutamato. Este fármaco ejerce su acción tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico inhibiendo la liberación de Glu y los canales de sodio dependientes de voltaje, actúa también como antagonista de los

receptores de Glu, así como favoreciendo la retirada de este neurotransmisor de la brecha sináptica.¹⁴⁵

Curiosamente el intento de llevar a la clínica fármacos con el mismo mecanismo de acción ha sido fallido, de ahí que se sigan estudiando otras vías celulares donde pueda estar actuando el Riluzol.¹⁴⁶ A día de hoy es la única terapia autorizada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para la ELA, siendo capaz de alargar la vida del paciente una media de 3 meses.

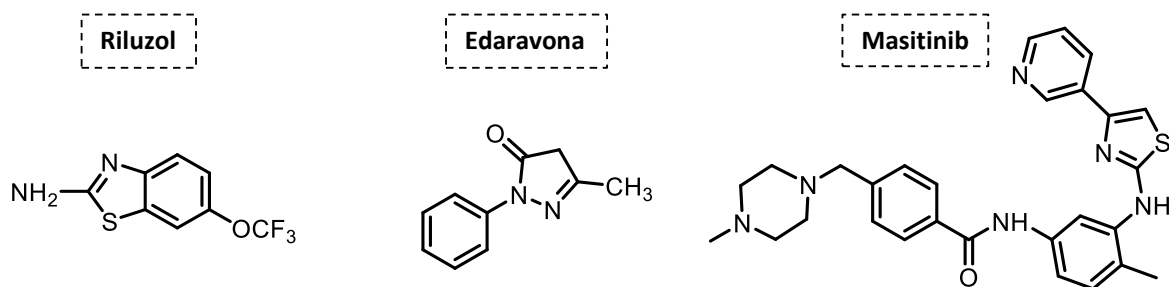


Figura 14. Estructura química de Riluzol, Edaravona y Masitinib.

Edaravona es el otro fármaco existente que desde 2001 se utilizaba como tratamiento adyuvante para el ictus isquémico y que fue aprobado como terapia para la ELA en Japón en el año 2015 y por la FDA (del inglés «Food and Drug Administration») en Estados Unidos en 2017 (**Figura 14**).¹⁴⁷ La EMA no ha procedido a su aprobación todavía. Este fármaco es un antioxidante que actúa eliminando los radicales libres disminuyendo de esta manera el estrés oxidativo.¹⁴⁸ Recientemente se ha publicado un estudio en donde se ha visto que Edaravona alarga la supervivencia del paciente sin necesidad de hacer traqueotomía.¹⁴⁹ Al igual que con el Riluzol, el mecanismo de acción de Edaravona sigue sin ser completamente elucidado ya que todos los antioxidantes que han llegado a clínica para el tratamiento de esta enfermedad no han obtenido resultados significativos como para seguir con su desarrollo.¹⁴⁶

Por último mencionar al fármaco Masitinib (**Figura 14**), un inhibidor de tirosina quinasas que recibió la designación de medicamento huérfano en 2016 por la EMA. Su mecanismo de acción está basado en el efecto inmunomodulador que ejerce sobre la microglía y otras células inmunes como los macrófagos y mastocitos, reduciendo la neuroinflamación y en consecuencia el daño neuronal.¹⁴⁶

La elevada tasa de fracaso en ensayos clínicos se debe a causas diversas como el fallo en la elección de la diana terapéutica, la baja efectividad en un corto plazo de tiempo, la selección

inadecuada de la cohorte de pacientes o el inicio tardío de los ensayos por la falta de biomarcadores tempranos de la enfermedad. Estos hechos ponen de manifiesto la relevancia de mejorar y ahondar en el diseño de los futuros ensayos clínicos.¹²¹

6. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Las estrategias para la búsqueda de fármacos para la ELA se han centrado principalmente en restablecer la alteración de los procesos biológicos implicados en la muerte de las motoneuronas, como la inflamación crónica, el estrés oxidativo, la toxicidad por el glutamato, la sobreexpresión de proteínas, etc. A continuación se comentarán las estrategias que se están llevando a cabo tanto a nivel clínico como preclínico.

6.1. Estrategias en clínica

Actualmente están activos en torno a 35 ensayos clínicos para la ELA. Entre los candidatos a fármaco se encuentran antioxidantes, neuroprotectores frente a la excitotoxicidad, anti-inflamatorios, inductores de la autofagia, moduladores de la función mitocondrial y factores neurotróficos.

A día de hoy, la única terapia paliativa con **efecto anti-excitador** es el Riluzol. Las terapias alternativas emergentes que modulan la concentración de glutamato durante la sinapsis no han sido efectivas o no han conseguido mejorar el efecto terapéutico del Riluzol. Entre ellas destaca la inhibición de los receptores de glutamato AMPA y NMDA, la inducción de la expresión del transportador que recaptura el Glu: EAAT2, y la modulación de los canales iónicos dependientes de voltaje. Tan solo dos fármacos están activos en clínica; Retigabine, un agonista del receptor de potasio (fase 2 completada) y Perampanel, un antagonista del receptor de NMDA (en proceso de reclutamiento para empezar fase 2).¹⁴⁶

A excepción de Edaravona, todos los **fármacos antioxidantes** que se han probado en clínica como terapia para esta enfermedad no han perseverado (vitamina E, coenzima Q, etc.). Actualmente se encuentra en fase 2 un compuesto que regula los niveles de glutatión (Epi-589).¹⁵⁰

Las **estrategias antiinflamatorias** están centradas en suprimir la señal crónica pro-inflamatoria inhibiendo la activación aberrante de la microglía y astrocitos así como la infiltración de linfocitos T. Los fármacos antiinflamatorios que han llegado a clínica regulan la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias mediante la inhibición de las proteínas rho quinasas (Fasudil), RIP quinasa 1 (DNL747), MAP quinasas (CC100) así como la inhibición de

fosfodiesterasas (Ibudilast).¹⁴⁶ Los únicos fármacos que siguen activos en clínica son Fasudil en fase 2,¹⁵¹ e Ibudilast en fase 3.¹⁵²

El diseño de fármacos para esta enfermedad también está orientado a **potenciar la contracción muscular** debilitada en pacientes como consecuencia de la atenuación del estímulo nervioso proveniente de las motoneuronas. Levosimendan es un fármaco que aumenta la sensibilidad de la troponina frente al calcio favoreciendo la contracción muscular. En 2019 empezó la fase clínica 3.¹⁵³

Las estrategias que se están llevando a cabo en clínica para aquellas mutaciones que provocan una ganancia de función tóxica de la proteína, se basan en la reducción de los niveles de la proteína mutada mediante **oligonucleótidos antisentido** o ASOs (del inglés «antisense oligonucleotide»). Actualmente se están reclutando pacientes para el comienzo de la fase 3 de un ensayo clínico con BIIB067 (Tofersen), un oligonucleótido antisentido cuya diana es el ARNm de SOD-1.¹⁵⁴ Los resultados obtenidos en fases anteriores confirman la disminución de los niveles de SOD-1 mutada en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes, así como un enlentecimiento en la evolución de la enfermedad.¹⁵⁴ También se encuentra en clínica, pero sin resultados preliminares, el oligonucleótido antisentido BIIB078, que tiene como diana el ARNm de C9orf72.¹⁵⁵

Por otro lado, la presencia de agregados proteicos en las células afectadas de un alto porcentaje de pacientes así como de biomarcadores relacionados con el mal funcionamiento de procesos proteolíticos en muestras *post mortem*, ha encaminado la búsqueda de fármacos a **restablecer los procesos de autofagia**.¹⁵⁶ A día de hoy se encuentra en fase clínica 2 un inhibidor de mTOR, receptor implicado en la inhibición de la autofagia (Rapamicina),¹⁵⁷ y un potenciador de la formación del autofagosoma (Tamoxifen).¹⁵⁸

La capacidad de los **factores neurotróficos** para potenciar la supervivencia celular, el crecimiento axonal, la sinapsis y la función metabólica ha adquirido gran relevancia en el mundo de las enfermedades neurodegenerativas. Actualmente se encuentran activos en clínica varios de ellos, sin embargo, los antecedentes de los factores neurotróficos como tratamiento para la ELA no han sido muy prometedores. Ninguno ha sido lo suficientemente efectivo como para llegar al mercado.¹⁴⁶

A nivel **mitocondrial** se han diseñado varios estudios que tienen como objetivo reestablecer su función. Las principales estrategias se centran en potenciar la producción de ATP así como la

inhibición del poro que se forma en la membrana de la mitocondria en respuesta al estrés oxidativo y a la excitotoxicidad.¹⁴⁶

Otra forma de dar soporte a los tejidos dañados es mediante el **trasplante de células madre**.¹⁵⁹ La administración intratecal o intramuscular de células madre mesenquimales o células madre neurales es un tratamiento que se está llevando a cabo en clínica como terapia para diversas enfermedades incluida la ELA.¹⁶⁰ Estas células tienen potencial para diferenciarse en células como astrocitos, microglía, oligodendrocitos, y producir factores de crecimiento y citoquinas antiinflamatorias para proteger a las neuronas. La cuestión que se plantea es si estas células pluripotentes una vez diferenciadas a motoneuronas serían capaces de integrarse fisiológicamente y formar circuitos funcionales proyectando los axones a gran distancia. La estrategia más efectiva en el caso de la ELA sería inducir la diferenciación a células que den soporte metabólico y estructural a las neuronas como las células gliales e interneuronas. Actualmente hay varios ensayos clínicos que se están llevando a cabo con células madre para la ELA.¹⁶¹ El único que se encuentra en fase 3 es un tratamiento con células madre mesenquimales provenientes de médula ósea programadas para inducir un factor de crecimiento neurotrófico (NurOwn).^{162,163}

6.2. Estrategias preclínicas

La falta de efectividad de los fármacos que están en clínica fomenta la búsqueda activa y el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad. La mayoría de ellas tienen como objetivo restablecer la homeostasis de TDP-43, marcador patológico presente en un 97% de los pacientes. A continuación se comentarán algunas de ellas.

Con el fin de evitar la salida del núcleo de proteínas como TDP-43 y en consecuencia la formación de agregados citoplasmáticos, se han desarrollado inhibidores selectivos de la exportación nuclear. El primer fármaco inhibidor del factor de exportación exportina-1 (XPO-1) aprobado por la FDA en el 2019 como tratamiento para mieloma múltiple (KP-330 o Selinexor),¹⁶⁴ se ha utilizado para el estudio de la inhibición de la salida de TDP-43 al citosol, en donde se obtuvieron resultados prometedores tanto en cultivos primarios neuronales como en modelos animales de TDP-43.¹⁶⁵ Sin embargo, estudios recientes demuestran que TDP-43 sale del núcleo principalmente por difusión pasiva.^{166,167} Esto sumado al efecto neuroprotector que se obtuvo también en modelos animales de C9orf72 y SOD-1 tratados con KP-330, plantea la hipótesis de que existen vías alternativas a través de las cuales este inhibidor pudiera ejercer el papel

neuroprotector.^{168,169} Estudios recientes sugieren una posible implicación de los inhibidores de XPO-1 en los procesos de autofagia.¹⁶⁸

Por otro lado, la co-localización de las inclusiones de TDP-43 con gránulos de estrés en modelos *in vitro* y en muestras de pacientes llevó al diseño de compuestos que redujeran la formación de estos gránulos. El tratamiento con este tipo de compuestos no solo reduce la formación de los gránulos de estrés sino que a su vez inhiben la formación de inclusiones citoplasmáticas de TDP-43.¹⁷⁰ La inhibición de las quinasas GSK-3 y CDK, disminuye la presencia de los gránulos de estrés que contienen TDP-43.⁸²

Prevenir la formación de agregados y favorecer la localización nuclear inhibiendo la fosforilación de TDP-43 es una estrategia clave para recuperar la homeostasis de esta proteína. Las proteínas quinasas se han convertido en los últimos 20 años en una de las dianas farmacológicas más importantes para el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, inflamatorias, neurológicas así como para el cáncer.¹⁷¹ Actualmente hay 52 inhibidores de proteínas quinasas aprobados por la FDA y 175 que se encuentran en diferentes ensayos clínicos.¹⁷¹

Las quinasas implicadas en la fosforilación directa o indirecta de TDP-43 más estudiadas como diana terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas que presentan esta proteinopatía son CK-1, CDC7, GSK-3 β y TTBK1.¹⁷² A continuación se comentarán los rasgos generales y su implicación en la ELA.

- Caseína quinasa 1

CK-1 (del inglés «Casein kinase 1») fue la primera quinasa identificada que fosforila de forma directa a TDP-43.¹⁷³ Aunque se conocen 7 isoformas, tan solo CK1- δ y CK1- ϵ son capaces de fosforilar esta proteína. Esta quinasa de expresión ubicua en eucariotas, está minuciosamente regulada debido al importante papel que juega en procesos de supervivencia y crecimiento celular como en la reparación del ADN, la regulación de la transcripción y de los ritmos circadianos.¹⁷⁴ La alteración en la regulación de CK-1 se ha asociado con patologías como el cáncer y diferentes enfermedades neurodegenerativas.¹⁷⁵

Diversos estudios han demostrado que el aumento de la actividad de CK-1 *in vitro* e *in vivo*, produce la hiperfosforilación de TDP-43 favoreciendo su deslocalización y acumulación citoplasmática. La expresión de una forma hiperactiva de CK-1 δ en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) así como en levaduras produce la acumulación de TDP-43

fosforilada en el citosol de las células.¹⁷⁶ Asimismo, la inducción de estrés a nivel de retículo endoplásmico por factores externos como es la exposición de las motoneuronas a tunicamycin tiene como consecuencia un aumento de la fosforilación y acumulación citoplasmática de TDP-43 mediada por CK-1.¹⁷⁷ Por otro lado se ha visto que TDP-43 regula de forma directa el ARNm de CK1- ϵ por lo que la alteración patológica de la homeostasis de TDP-43 podría afectar a los niveles de expresión de CK1- ϵ .¹⁷⁸

El tratamiento con inhibidores de CK-1 previenen la neurotoxicidad producida por la fosforilación anómala de TDP-43. En un modelo celular en donde la fosforilación se induce mediante la exposición de las células a ácido etacrínico, los inhibidores de CK-1 δ eran capaces de disminuir los niveles de TDP-43 fosforilada produciendo un aumento de la supervivencia celular.¹⁷⁹ Este efecto neuroprotector se evaluó también en un modelo de *Drosophila* en donde se vio una diferencia significativa en la supervivencia de las moscas tratadas con estos compuestos.¹⁷⁹ Por otro lado el tratamiento con estos inhibidores en muestras de linfocitos de pacientes con esta proteinopatía (DFT) favorece la localización nuclear de TDP-43 como consecuencia de una bajada en los niveles de TDP-43 fosforilada (**Figura 15**).⁹⁷

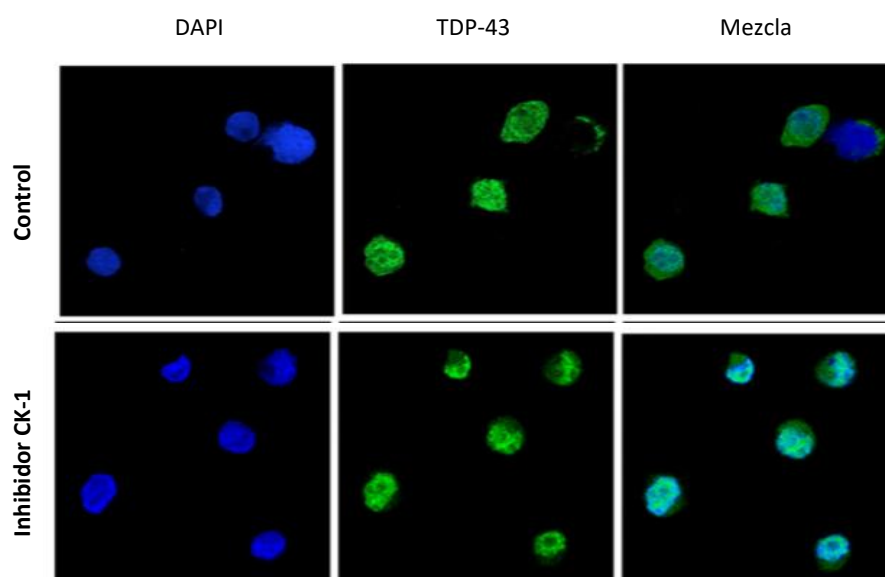


Figura 15. Localización subcelular de TDP-43 (verde) en linfoblastos de pacientes de DFT tratados o sin tratar con un inhibidor de CK-1 δ . Los núcleos están marcados con DAPI (azul) (*adaptada de Ref.97*).

- Glucógeno sintasa quinasa 3

GSK-3 (del inglés «Glycogen Synthase Kinase 3») es una serina/treonina quinasa implicada en el metabolismo del glucógeno así como en numerosas vías de señalización celular como es la

regulación del ciclo celular, la proliferación, diferenciación e inflamación. Esta enzima está altamente conservada entre especies, en mamíferos presenta dos isoformas; GSK-3 α y GSK-3 β . La expresión de GSK-3 β es mayor en el SNC, en donde fosforila proteínas neuronales relacionadas con la estabilización de microtúbulos.¹⁸⁰ Su estado de activación varía en función de la fosforilación de determinados aminoácidos estando hiperactiva cuando el residuo de tirosina 216 está fosforilado y por el contrario, inactiva cuando la serina 9 está fosforilada.

GSK-3 β es considerada una de las principales enzimas involucradas en los mecanismos patológicos de diferentes enfermedades como cáncer, diabetes, trastornos del estado de ánimo y enfermedades neurodegenerativas (EA y EP). La implicación de GSK-3 β en la ELA se evidenció tras el análisis de muestras del SNC de pacientes y de determinados modelos celulares y animales en donde existe una correlación entre el aumento de la expresión y actividad de GSK-3 β con la muerte neuronal.¹⁸¹

En el año 2003 se llevó a cabo un estudio en el que se analizó la expresión de 78 quinasas en muestras de médula espinal torácica de pacientes con ELA. La expresión de GSK-3 β fosforilada en la tirosina 216 (la forma hiperactiva de GSK-3 β) estaba significativamente aumentada con respecto a los individuos control.¹⁸² En otro estudio en el que se englobaron pacientes con ELA y pacientes con un tipo de ELA específico que cursa con deterioro cognitivo, se vio en ambos casos un aumento anómalo de la actividad de GSK-3 β en el lóbulo frontal y temporal de la corteza cerebral. Este aumento se asoció a la presencia de inclusiones de la proteína tau hiperfosforilada en las neuronas de ambos tipos de pacientes.¹⁸³

Con el fin de analizar la eficacia de los inhibidores de GSK-3 β como posible tratamiento para la ELA, se realizaron estudios en modelos de la enfermedad en donde la expresión y la actividad de GSK-3 β están aumentadas.¹⁸⁴ En líneas generales, la administración de estos inhibidores (Litio,¹⁸⁵ ácido valproico,¹⁸⁶ AR-A014418¹⁸⁷) en modelos de ratón retrasa la aparición de los síntomas y prolonga la supervivencia de los animales. En un modelo de ELA desarrollado en ratas se observó una recuperación total de los síntomas neurológicos tras la administración del inhibidor VP-2.51.¹⁸⁸ En otro estudio realizado en motoneuronas derivadas de iPSC de pacientes con ELA se vio que el tratamiento con el inhibidor Kenpaulona potenciaba la supervivencia de las mismas.¹⁸⁹

Como se ha comentado anteriormente, GSK-3 β fue identificada como una de las quinasas implicadas en la formación de los gránulos de estrés que contienen TDP-43. El tratamiento con inhibidores de GSK-3 β redujo la presencia de estos gránulos en un modelo celular en donde la

formación de estos se induce mediante un estímulo estresante. En este mismo estudio se vio una disminución significativa de la acumulación de los FCT de TDP-43 en el citosol al tratar las células (previamente transfectadas con FCT-TDP-43) con los inhibidores (**Figura 16**).⁸²

Los inhibidores de GSK-3 β ejercen su efecto neuroprotector a través de diferentes mecanismos basados en restaurar las vías de señalización implicadas en la supervivencia celular como el factor HSTF-1 (del inglés «Heat Shock Transcription Factor 1»), reducir las señales que inducen la muerte celular como la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3, así como las señales relacionadas con la inflamación a través de proteínas como la ciclooxigenasa-2 (Cox-2) o Iba-1.¹⁸¹

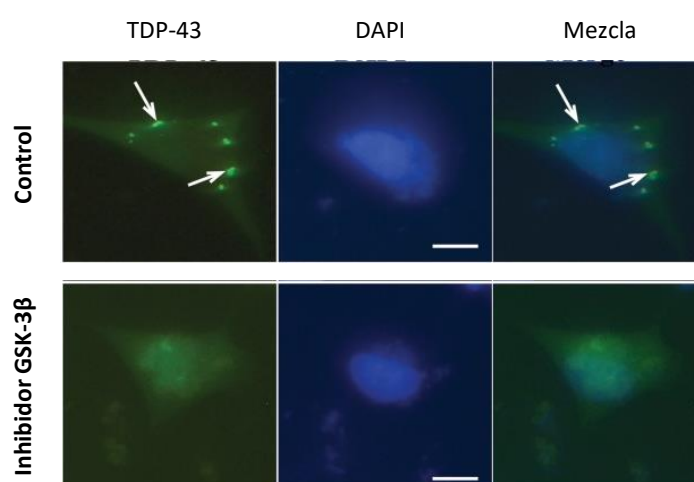


Figura 16. Células SH-SY5Y transfectadas con FCT de TDP-43 (verde) en presencia o ausencia de un inhibidor de GSK-3 β . Las flechas señalan los agregados citoplasmáticos de TDP-43. Los núcleos marcados con DAPI (azul) (adaptada de Ref.82).

- Quinasa del ciclo de división celular 7

CDC7 (del inglés «Cell Division Cycle 7») es una serina/treonina quinasa involucrada en el inicio de la replicación del ADN y en la proliferación celular, en concreto en la transición de la fase G1/S. Su unión a la subunidad reguladora Dbf4 es necesaria para que pueda ejercer su acción como quinasa.¹⁹⁰

La expresión de CDC7 difiere a lo largo del organismo siendo mayor en cerebro (mayoritariamente en cerebelo), bazo, pulmones y testículos.¹⁹¹ En células mitóticas CDC7 se localiza principalmente en el núcleo durante la fase G1 del ciclo, sin embargo, en células post-mitóticas como las neuronas, se localiza en el citoplasma.¹⁹²

Dado el importante papel que tiene CDC7 en el ciclo celular, se planteó como posible diana terapéutica para el cáncer puesto que una gran variedad de líneas tumorales sobreexpresan CDC7 y Dbf4.¹⁹³ La inhibición de CDC7 en las líneas tumorales produce un arresto del ciclo celular en fase S dando lugar a la muerte celular de forma independiente de p53, sin embargo, la inhibición de CDC7 en células sin esta patología, no produce este efecto letal si no que activan un mecanismo de defensa en la que está involucrada p53.¹⁹⁴

En 2013 se describió por primera vez la implicación de CDC7 en la fosforilación patológica de TDP-43.⁸⁰ El grupo de Brian C. Kraemer realizó un cribado fenotípico sobre el quinoma completo de un modelo transgénico de *C.elegans* de TDP-43 (M337V). El silenciamiento de CDC7 producía una mejora del fenotipo motor de los gusanos que se correlacionaba con una bajada en los niveles de TDP-43 fosforilada en las Ser409/410. Asimismo realizaron un análisis *post mortem* en la corteza frontal de pacientes que sufrían esta proteinopatía y vieron una co-localización de CDC7 a nivel citoplasmático con agregados fosforilados de TDP-43 (**Figura 17**).⁸⁰ Es por ello por lo que CDC7 se propuso como una diana terapéutica para el tratamiento de esta patología en donde la hiperfosforilación de TDP-43 juega un papel clave en la toxicidad celular.

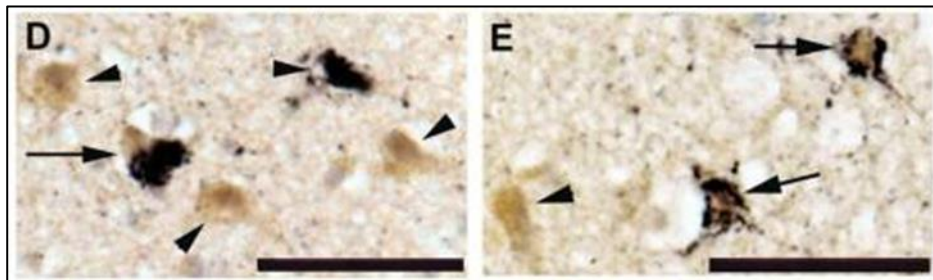


Figura 17. Co-expresión de CDC7 (marrón) y TDP-43 fosforilada (negro) en tejido del lóbulo frontal de la corteza cerebral de pacientes con DFT. Las flechas señalan células que contienen ambos tipos de proteínas. Las cabezas de flecha que señalan células teñidas con CDC7 o TDP-43 (*adaptada de Ref.80*).

- Tau tubulina quinasa

TTBK (del inglés «Tau Tubulin Kinase») es una serina/treonina y tirosina quinasa responsable de una variedad de procesos celulares. Esta quinasa proviene de la familia de CK-1 y presenta dos isoformas; TTBK1 y TTBK-2. Ambas están implicadas en la fosforilación de proteínas como tubulina, tau y TDP-43, de ahí su importante implicación en la EA, ELA y DFT.¹⁹⁵ TTBK1 se expresa mayoritariamente en el SNC, sin embargo TTBK2 se expresa de forma ubicua por el cuerpo por lo que las estrategias para estas enfermedades neurodegenerativas se han centrado en la búsqueda de inhibidores selectivos de TTBK1.¹⁹⁶

Ambas isoformas favorecen la deslocalización y agregación de TDP-43 tanto *in vitro* como *in vivo* al fosforilar las Ser409/410 de la proteína. También se ha descrito la co-localización de TTBK-1 y TTBK-2 con inclusiones de TDP-43 en muestras de médula espinal de pacientes con ELA (**Figura 18**) así como un aumento en la expresión de ambas isoformas en la corteza cerebral de pacientes con DFT.¹⁹⁷ Actualmente los inhibidores de TTBK descritos modulan de forma similar ambas isoformas por lo que el diseño de nuevos fármacos que inhiban de manera selectiva la actividad de TTBK1 es una estrategia terapéutica relevante y segura para esta proteinopatía.

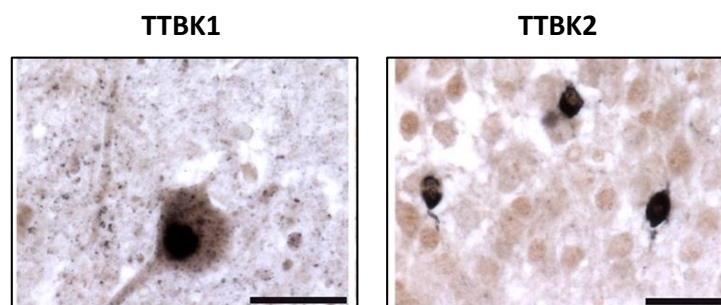


Figura 18. Co-expresión de TTBK1 y TTBK2 (marrón) con TDP-43 (negro) en motoneuronas de médula espinal de pacientes con ELA (*adaptada de Ref.197*).

Los inhibidores de quinasas son a día de hoy una realidad en el tratamiento de patologías como el cáncer debido a la seguridad y eficacia que han mostrado en clínica. Por ello, se consideran buenos candidatos a fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la ELA, en donde un 97% de los pacientes presentan agregados patológicos de TDP-43 caracterizados principalmente por presentar modificaciones post-traduccionales como la hiperfosforilación.

IV.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El 97% de los pacientes de ELA presentan agregados patológicos de TDP-43 en el citoplasma de las células afectadas con modificaciones post-traduccionales tales como la hiperfosforilación. Por tanto, la **hipótesis de trabajo** de esta Tesis Doctoral es que las **proteínas quinasas responsables de la fosforilación anómala de TDP-43** que están sobreexpresadas o que co-localizan con agregados de TDP-43 en los tejidos afectados de los pacientes, son **dianas farmacológicas valiosas** para el tratamiento de la ELA y otras TDP-43-patías.

Por ello, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la **validación de ciertas proteínas quinasas como dianas terapéuticas** principalmente para el tratamiento de la ELA y aquellas patologías relacionadas con la proteinopatía de TDP-43, así como el desarrollo de sus **inhibidores como candidatos a fármacos efectivos** para dichas enfermedades neurodegenerativas.

Los objetivos concretos que se proponen se detallan a continuación:

1. Evaluación de las **propiedades farmacológicas** de los potenciales candidatos a fármaco previamente identificados y selección de los compuestos a estudiar. En concreto, la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a su órgano diana; el SNC.
2. Puesta a punto y caracterización de **modelos celulares** humanos para el estudio de la proteinopatía de TDP-43 con la posterior evaluación del potencial terapéutico de los candidatos a fármaco.
3. Estudio del **efecto inmunomodulador** de algún compuesto representativo en cultivos primarios de microglía murina.
4. Estudio de la eficacia de los mejores candidatos en un **modelo murino** transgénico de TDP-43.
5. **Reposicionamiento** de algún inhibidor de proteína quinasa para el tratamiento de la ELA.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROPIEDADES TIPO FÁRMACO

1.1. Predicción del paso de la BHE de los candidatos a fármaco

1.1.1. Metodología PAMPA

La predicción del paso de la BHE se realizó mediante la metodología PAMPA (del inglés «Parallel Artificial Membrane Permeability Assay»)^{198,199}. Esta técnica consiste en un sistema artificial de placas paralelas separadas por una membrana cubierta con lípido de cerebro porcino que emula la BHE. Para validar el estudio se utilizaron 9 fármacos comerciales aprobados por la FDA cuya permeabilidad en humanos es conocida: enoxacina, hidrocortisona, desipramina, ofloxacina, piroxicam, testosterona, promazina, verapamilo y atenolol (**Figura S1.a**)¹⁹⁹ (Sigma-Aldrich, Merk, Fluka). Los compuestos de estudio y los controles (1-2 mg) se disolvieron en 5 mL del tampón del ensayo: tampón fosfato salino (PBS, pH 7.4) y etanol (EtOH) en una proporción 70:30 (Sigma-Aldrich). A continuación se filtraron (filtros PDVF 30nm, Symta) realizándose posteriormente un barrido con el lector de ultravioleta (UV) Varioskan™ (Thermo Fisher) desde la longitud de onda 220 hasta la 400, obteniendo como resultado un espectro para cada compuesto en el que se identificaron las longitudes de onda a las que absorbe cada uno de ellos (**Figura S1.b**).

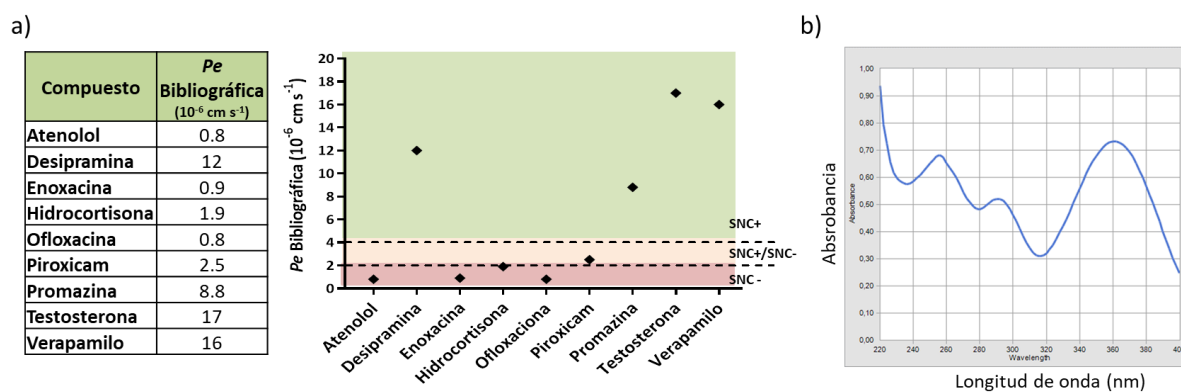


Figura S1. a) Permeabilidad efectiva (Pe) de los 9 fármacos control aprobados por la FDA descrita en la bibliografía.¹⁹⁹ b) Espectro de absorción del fármaco piroxicam.

Una vez determinada la concentración inicial de cada compuesto mediante la absorbancia obtenida a las longitudes de onda establecidas (absorbancia inicial), se añadieron 180 μL de cada muestra a la placa donadora de 96 pocillos (Millipore) previamente cubierta con 5 μL de lípido de cerebro porcino (PBL, Avanti Polar Lipids) disuelto en dodecano (20 mg/mL, Sigma-Aldrich). La placa aceptora de 96 pocillos (Millipore) se rellenó con 180 μL /pocillo del tampón del ensayo. A

continuación se superpuso la placa donadora sobre la aceptora formando un “sandwich” durante 2.30 horas a temperatura ambiente en una atmosfera húmeda. Después del periodo de incubación se retiró la placa donadora y se leyó la absorbancia de las soluciones de la placa aceptora a las longitudes de onda establecidas previamente, calculando de esta forma la concentración de compuesto que fue capaz de atravesar la membrana. Con estos parámetros se calcula la permeabilidad efectiva (Pe) de cada compuesto con la siguiente ecuación:

$$Pe = \frac{Vd \times Vr}{(Vd + Vr)St} \quad \ln \frac{100 Vd}{100 Vd - \%T (Vd+Vr)} \quad \%T = \frac{Vr \times Ar}{(Ad_0 \times Vd)}$$

En donde: Vd: Volumen de la placa donadora (180 μ L); Vr: volumen de la placa aceptora (180 μ L); S: superficie del pocillo (0.266 cm^2); t: tiempo de incubación (seg); Ar: absorbancia final (placa aceptora); Ad₀: absorbancia inicial (placa donadora).

A continuación se estableció una correlación directa entre la Pe experimental y la Pe descrita en la bibliografía de los 9 fármacos control. A partir de la ecuación de la recta obtenida se determinó la permeabilidad de los compuestos según el protocolo descrito en la literatura,¹⁹⁹ siendo SNC+ cuando presenta una Pe superior a al valor de la ecuación de la recta obtenido siendo $x=2$; y SNC- cuando la Pe es inferior al valor obtenido siendo $x=4$. Los compuestos con una Pe comprendida entre estos valores se consideran SNC+/SNC- no pudiendo predecir con certeza si tiene capacidad de penetrar al SNC por difusión pasiva. Cada muestra fue analizada de 3 a 5 longitudes de onda por triplicado y en 2 ensayos independientes. Los resultados se muestran como la media de los 2 ensayos con su valor de desviación estándar.

2. MODELOS CELULARES

2.1. Cultivos neuronales SH-SY5Y

Las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Health Protection Agency, Salisbury, Reino Unido) y se propagaron en medio DMEN (del inglés «Dulbecco`s Modified Eagle Medium») enriquecido con 2 mM de L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina en condiciones de humedad con 5% de CO₂ a 37°C. Todos los componentes fueron adquiridos en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

2.1.1. Ensayo de viabilidad celular

Las células se siembran en placas de 96 pocillos (Falcon™) a una densidad de 60.000 células/pocillo. Una vez están en confluencia, se añaden los compuestos de estudio disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) a 5 y 10 μM sin superar el 0.1% de DMSO en el medio. Tras un periodo de incubación de 24 horas se evalúa la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (apartado 2.4.1).

2.1.2. Ensayo de neuroprotección frente al ácido etacrínico

Las células se siembran en placas de 96 pocillos (Falcon™) a una densidad de 60.000 células/pocillo. Cuando están en confluencia se exponen al ácido etacrínico (AE) (Sigma-Aldrich) durante 24 horas. Para la puesta a punto del experimento se utilizaron concentraciones crecientes de AE (10, 20, 30, 40, 60 μM). Para la evaluación del efecto neuroprotector de los compuestos las células se expusieron a 20 μM de AE habiendo tratado una hora antes con los compuestos de estudio y controles a las concentraciones determinadas: IGS 2.7 (5 μM), Tideglusib (5 μM) inhibidores de CDC7 (10 μM) e inhibidores de TTBK1 (5 μM). La viabilidad celular se evaluó tras un periodo de incubación de 24 horas desde la adición del AE mediante el ensayo de MTT (apartado 2.4.1).

La evaluación del efecto neuroprotector a nivel de expresión de proteínas se analizó mediante la técnica Western blot (apartado 2.4.2). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Falcon™) a una densidad de 2×10^6 células por pocillo. El experimento se realizó siguiendo el mismo protocolo detallado previamente. Tras el periodo de incubación en presencia o ausencia de los compuestos se retira el medio, se realiza un lavado con PBS 1X (Sigma-Aldrich), se recogen las células y se añaden 30 μL de tampón de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 1% Nonidet-40, 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich) y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche, Mannheim, Germany)). Tras un ciclo de congelación/descongelación a -80°C , los lisados se centrifugan a 15.000 rpm durante 20 min quedando en el sobrenadante la fracción proteica.

2.2. Muestras sanguíneas de pacientes y controles

Todos los donantes a partir de los cuales se han originado las líneas linfoblásticas analizadas proceden del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Hay un total de 18 donantes de los cuales 8 son individuos sanos sin ninguna patología neurológica, 6 son pacientes con ELA esporádica y 4 son pacientes con ELA familiar con la mutación en SOD-1, todos ellos

diagnosticados por neurólogos expertos aplicando los criterios de El Escorial.²⁰⁰ Las características demográficas y clínicas de los individuos donantes se describen en la **Tabla S1**.

Tabla S1. Características de los individuos de estudio. MNS: motoneurona superior, MNI: motoneurona inferior.

Caso	Edad	Sexo	Presentación/ mutación	Motoneuronas afectadas
Casos esporádicos (ELAe)				
E1	76	F	Bulbar (disartria)	MNS
E2	54	F	Bulbar	MNS y MNI
E3	54	M	Espinal	MNS
E4	79	M	Bulbar	MNI
E5	55	M	Respiratoria	MNI
E6	68	M	Bulbar (disartria)	MNS
Casos familiares (ELAf-SOD1)				
E1-SOD	64	F	Espinal	p.Asn65Ser MNI
E2-SOD	46	M	Espinal	p.Leu117Val c.352C>G MNI
E3-SOD	58	F	Espinal	p.Asn139His c.418A>C MNS y MNI
E4-SOD	59	M	Espinal	p.Leu117Val c.352C>G MNI
Controles (voluntarios sanos)				
C1	54	F	-	-
C2	68	F	-	-
C3	75	M	-	-
C4	67	F	-	-
C5	58	F	-	-
C6	55	M	-	-
C7	73	M	-	-
C8	52	M	-	-

Las muestras de los individuos de estudio se obtuvieron después de la firma del consentimiento informado por parte de los donantes (**Anexo 1**). Todos los protocolos que se han llevado a cabo con estas muestras biológicas han sido aprobados por los hospitales donantes y por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Institución reguladora (número de aprobación: CEI 18/004) de acuerdo a la normativa nacional y europea (fecha de aprobación: 1/2/2018).

2.2.1. Extracción e inmortalización de linfocitos de los individuos de estudio

La extracción de las células mononucleares de sangre periférica de los individuos de estudio se llevó a cabo mediante un protocolo basado en la diferencia de densidad que existe entre los diferentes tipos celulares sanguíneos usando gradientes de densidad en Ficoll-Isopaque (LymphoprepTM).²⁰¹ Las CMSP presentan una densidad inferior a las polimorfonucleares y eritrocitos (<1.077g/mL), por lo que la separación en un medio isosmótico de densidad 1.077g/mL hará que los eritrocitos y granulocitos sedimenten a través del medio, quedando por encima en una fase intermedia las CMSP (**Figura S2**). Para ello en primer lugar se diluyen 10 mL de sangre en 10 mL de PBS 1X (Sigma-Aldrich). A continuación, se añaden 12 mL de LymphoprepTM y se

centrifugan durante 45 min a 1.400 rpm quedando las CMSP entre la muestra y la interfase medio-muestra. La fase donde se encuentran las CMSP se extrae cuidadosamente y se lava con 30 mL de PBS 1X, centrifugando posteriormente a 1.300 rpm durante 10 min. Para inmortalizar los linfocitos se añade al sedimento 8 mL de medio RPMI (Invitrogen), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciclosporina (Sigma-Aldrich) para bloquear la activación de los linfocitos T impidiendo de esta forma que inhiban la proliferación de los linfocitos B infectados, y por último una alícuota del virus Epstein-Barr obtenido a partir de una línea celular de linfoma de Burkitt (B-95-6) cedida por Logina Akhatat (National Institute of Alcohol and Abuse Disorders, NIH, Bethesda, USA). Los primeros clones linfoblásticos aparecieron a las 3-4 semanas desde la infección. Una vez transformadas las células se crecen en suspensión en frascos de cultivo de 25 cm^2 (Falcon™) a una concentración de 1×10^6 células/mL en un incubador húmedo con 5% CO_2 a 37°C. El medio de cultivo utilizado es RPMI-1640 (Invitrogen), suplementado con 1% de L-glutamina 2mM, 1% penicilina/estreptomicina y 10% de FBS (Invitrogen).

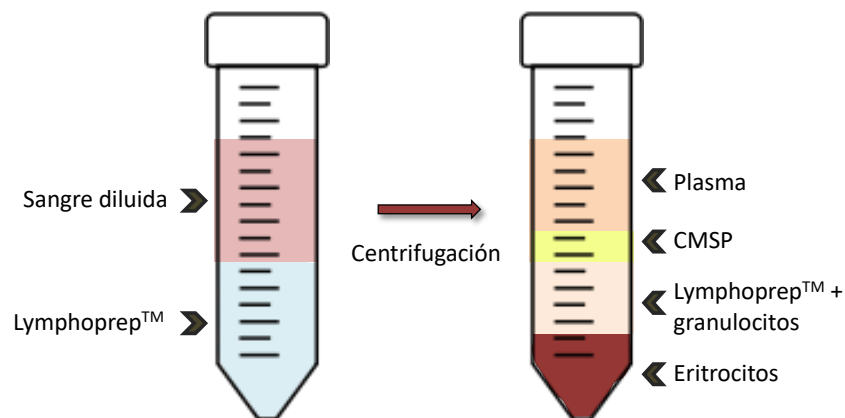


Figura S2. Esquema gráfico del aislamiento de las CMSP en un gradiente de Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™).

2.2.2. Caracterización de linfoblastos

Los linfocitos inmortalizados (linfoblastos) se sembraron en placas de 6 pocillos (Falcon™) a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en un volumen de 4 mL de medio RPMI completo. Después de un periodo de incubación de 24 horas, las células se recogen, se centrifugan 5 min a 1.000 rpm, se lavan en 1 mL de PBS 1X y tras otro centrifugado se añade 60 μL de tampón de lisis al sedimento (50 mM Tris pH 7.4, 1% Nonidet-40, 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich) y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche, Mannheim, Germany)). Seguidamente se someten a un ciclo de congelación/descongelación a -80°C y se centrifugan a 15.000 rpm durante 20 min obteniendo de esta forma el contenido proteico celular en el sobrenadante. La separación de la

proteínas citosólicas de las nucleares se realizó mediante el kit comercial de fraccionamiento subcelular de proteínas (Thermo Scientific (nº 78840)) siguiendo el protocolo del fabricante. Los niveles celulares de las proteínas de interés (TDP-43-p-Ser409/410, TDP-43, GSK-3β-pSer9, GSK-3β, GSK-3β-pTyr216, CK-1δ, CDC7, TTBK1) se evaluaron mediante la técnica de WB (**Tabla S4**, apartado 2.4.2).

2.2.3. Estudio del efecto de los inhibidores de quinasas en los linfoblastos

Los linfoblastos se siembran en placas de 6 pocillos (Falcon™) a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en un volumen de 4 mL de medio RPMI completo. Pasadas 24 horas se añaden los compuestos de estudio a las concentraciones establecidas: inhibidores de CK-1 (5 μ M), inhibidores de CDC7 (10 μ M), inhibidores de TTBK1 (5 y 10 μ M) e inhibidor de GSK-3β (5 μ M). Tras un periodo de 24 horas se recogen las células y se extraen las proteínas según los protocolos descritos en el apartado anterior (2.2.2).

2.3. Cultivos primarios de células de ratas Wistar

Todos los experimentos con animales realizados en el laboratorio del Prof. Bárbara Monti en el Departamento de Farmacia y Biotecnología de la Universidad de Bolonia, fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Bolonia (número de protocolo: 17-72-1212) y llevados a cabo de acuerdo a las leyes italianas y de la Comunidad Europea sobre el uso de animales con fines experimentales. Los animales utilizados para el desarrollo de cultivos primarios fueron ratas Wistar criadas en condiciones de libre acceso a agua y alimentos con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de $22^\circ\text{C} \pm 1$.

2.3.1. Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (CGNs)

Los cultivos de neuronas granulares de cerebelo (CGNs) se prepararon a partir de ratas Wistar con 7 días de vida. Para ello, se extraen los cerebelos, se retiran las meninges y se sumergen en la solución 1 (**Tabla S2**) en donde se procede a la disgregación mecánica del tejido con pinzas estériles. A continuación se incuba durante 15 min a 37°C con 50 mL de la solución 2 (**Tabla S2**) que contiene tripsina para favorecer la disociación enzimática del tejido. El efecto de la tripsina se bloquea agregando la solución 4 (**Tabla S2**) que contiene también DNAsa para degradar el ADN que se encuentra en el medio. Después de centrifugar la muestra a 1.000 rpm durante 5 min, el sedimento se disocia mecánicamente en 5 mL de la solución 3 (**Tabla S2**). A continuación, se añade la solución 5 (**Tabla S2**) y se centrifuga a 1.000 rpm durante 7 min. Finalmente el

sedimento se resuspende en el medio de cultivo BME (del inglés «Basal Medium Eagle») suplementado con 10% de FBS, 50 mg/mL de gentamicina (Life Technologies), 2 mM de L-glutamina y 25 mM de KCl (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon™) previamente cubiertas con poli-L-lisina (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, 30,000< peso molecular < 70,000) para favorecer la unión de las células a la superficie de la placa, a una densidad de 120.000 células por pocillo. Tras un periodo de 16 horas en condiciones de humedad a 37°C con 5% de CO₂, se añade citosina arabino-furanósido a 10 mM (Sigma-Aldrich) para reducir la proliferación de las células no neuronales y obtener un cultivo puro de neuronas. Al cabo de 7 días de incubación las neuronas están diferenciadas y se procede a realizar el ensayo de neurotoxicidad de los compuestos. Todos los reactivos utilizados para las soluciones son de Sigma-Aldrich.

Tabla S2. Soluciones para el cultivo de neuronas granulares de cerebelo de ratas Wistar.

Solución 1	KREBS 10X	25 mL	Solucion KREBS 10x pH 7,4	NaCl (1.32M)	38,6 g
	MgSO4 3,82%	2 mL		KCl (0.05M)	1,85 g
	BSA	0,75 g		Na2HPO4 (0.085M)	15,2 g
	H2O	223 mL		NaHPO4 (0.21M)	1,45 g
Solución 2	Tripsina	12,5 mg	Glucosa (0.1M)	9,9 g	
	Solución 1	37,5 mL	Rojo fenol	50 mg	
Solución 3	Solución 1	22,5 mL	H2O	500 mL	
	DNAsa	3,12 mg			
	Inhibidor de tripsina	13 mg			
Solución 4	MgSO4 3,82%	250 µL			
	Solución 1	8 mL			
Solución 5	Solución 3	42 mL			
	CaCl2 1,2%	320 µL			
	MgSO4 3,82%	320 µL			
	Solución 1	39 mL			

2.3.2. Ensayo de viabilidad celular en CGNs

Las neuronas granulares de cerebelo se incuban en presencia o ausencia de los inhibidores de TTBK1 (T25) y CDC7 (C16 y C24) disueltos en DMSO (Sigma-Aldrich), a concentraciones crecientes (5 y 25 µM) durante 24 horas (el porcentaje de DMSO en el medio de cultivo no supera el 0.1%). La viabilidad celular se analiza mediante el ensayo de MTT (apartado 2.4.1).

2.3.3. Cultivos primarios de microglía

Los cultivos primarios de microglía de rata se prepararon a partir de ratas Wistar de 1 a 3 días de vida. Para ello, se extraen las cortezas cerebrales de las crías, se retiran las meninges y se

disocia el tejido mecánicamente con pinzas estériles en la solución 1 (**Tabla S3**). A continuación se añaden 20 µL de la solución 2 (**Tabla S3**) que contiene tripsina y se incuba durante 15 min a 37°C. La reacción enzimática de la tripsina se bloquea añadiendo la solución 4 (**Tabla S3**) que además contiene DNAsa para degradar el ADN que se encuentra en el medio. Después de centrifugar la muestra a 1.000 rpm durante 5 min, se retira el sobrenadante y el sedimento se disocia una vez más mecánicamente en 5 mL de la solución 3 (**Tabla S3**) hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade la solución 5 (**Tabla S3**) y se centrifuga a 1.000 rpm durante 7 min. Finalmente el sedimento se resuspende en el medio de cultivo BME, suplementado con 10% de FBS (Life Technologies), 50 mg/mL de gentamicina y 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² (FalconTM) previamente cubiertos con poli-L-lisina (10 µg/mL) (Sigma, 30,000< peso molecular < 70,000) para favorecer la unión de las células a la superficie de la placa. Por cada animal se sembraron entre 5/6 frascos de cultivo. Después de 7-8 días en condiciones de humedad con 5% de CO₂ a 37°C, se obtiene un cultivo mixto de astrocitos (adheridos a la superficie) y microglía (adherida a la monocapa de astrocitos). Para separar ambos tipos celulares tan solo es necesario agitar mecánicamente los frascos de cultivo, de esta forma la microglía que está débilmente unida, se levanta quedando suspendida en el medio. Una vez retirada la microglía se añaden 15 mL de medio de cultivo al frasco de cultivo y se deja incubando 7 días más, realizando el mismo protocolo de extracción de la microglía tras este periodo de tiempo. Las células microgliales se sembraron a una densidad de 2x10⁶ células por cada placa Petri de 35 mm Ø (FalconTM) en donde una vez adheridas se llevó a cabo el ensayo para evaluar el potencial inmunomodulador de los compuestos de estudio. Todos los reactivos utilizados para las soluciones son de Sigma-Aldrich.

Tabla S3. Soluciones para el cultivo primario de glía de ratas Wistar.

Solución 1	KREBS 10X (Tabla S2)	15 mL
	MgSO4 3,82%	1,2 mL
	BSA	0,45 g
	H2O	135 mL
Solución 2	Tripsina	9,38 mg
	Solución 1	37,5 mL
Solución 3	Solución 1	22,5 mL
	DNAsa	5,4 mg
	Inhibidor de tripsina	11,7 mg
	MgSO4 3,82%	225 µL
Solución 4	Solución 1	31,5 mL
	Solución 3	6 mL
Solución 5	CaCl2 1,2%	22,5 µL
	MgSO4 3,82%	150 µL
	Solución 1	18,75 mL

2.3.4. Ensayo del efecto inmunomodulador con LPS

Las células de la microglía (2×10^6 células por placa de 35 mm \emptyset) se tratan con los compuestos de estudio disueltos en DMSO (Sigma-Aldrich) a las concentraciones establecidas: C16 (1, 2.5 y 5 μ M); C24 (1, 5 y 25 μ M) y T25 (5 y 25 μ M) sin superar el 0.1% de DMSO en el medio. Tras una hora de incubación en las condiciones estándar se añade el LPS a la concentración de 100 ng/mL (Invitrogen, San Diego, CA, USA) durante 24 horas. Tras este periodo se procede a la extracción del contenido proteico celular. Para ello se retira el medio y se hacen 2 lavados consecutivos con PBS 1X frío. A continuación se añaden 50 μ L de tampón de lisis a cada muestra (50 mM Tris pH 7.4, 1% SDS, EDTA 1 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasas (10 μ l/mL)) y con una espátula se recoge el contenido celular sonicándolo en un baño con hielo en 4 ciclos de 10 min cada uno. La expresión de las proteínas de interés (iNOS, TREM-2) se evaluó mediante la técnica de WB (**Tabla S4**, apartado 2.4.2).

2.4. Otras técnicas

2.4.1. Ensayo del MTT

El MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) o sal de tetrazolio (soluble en agua y de color amarillo) es reducido a formazán (color violeta e insoluble en agua) por las deshidrogenas mitocondriales. De esta forma se puede evaluar el porcentaje de células vivas en presencia o ausencia de un tratamiento a través de la funcionabilidad mitocondrial.²⁰² Para ello se añade a cada pocillo 0.5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) durante 2 horas. A continuación se retira el medio y se resuspenden las células en 200 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich) favoreciendo la disolución de los cristales de formazán (color violeta). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán reducido cuya absorbancia se mide a 595 nm en el lector de placas de UV Varioskan™ (Thermo Fisher).

2.4.2. Western blot

La cuantificación de proteínas se realizó en todos los casos mediante el kit comercial de cuantificación de proteínas Pierce™ BCA (Thermo Scientific). La separación de proteínas en base a su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% (Bio-Rad) cargando entre 20-50 μ g por muestra. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno) (Millipore, Billerica, MA, USA) a 4°C. Las membranas se bloquearon en el caso de la línea SH-SY5Y y los linfoblastos con 5% de albúmina de suero bovino ó BSA (Roche)

disuelto en el tampón TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) (Sigma-Aldrich) durante una hora. En el caso de la microglía con 5% de leche (Bio-Rad) en TBS-T. La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla S4**) se realizó durante toda la noche a 4°C.

Tabla S4. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante Western blot.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución
TDP-43 (N-terminal)	10782-2-AP	Proteintech	1:1000
TDP-43 (p-Ser409/410) monoclonal	66318-Ig	Proteintech	1:850
α-Tubulina	sc-23948	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
GAPDH	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology	1:500
CK-1δ	sc-55553	Santa Cruz Biotechnology	1:500
CDC7	sc-56275	Santa Cruz Biotechnology	1:500
TTBK1	sc-374600	Santa Cruz Biotechnology	1:500
GSK-3β	sc-9166	Santa Cruz Biotechnology	1:250
GSK-3β (p-Ser9)	sc-11757-R	Santa Cruz Biotechnology	1:500
GSK-3β (p-Tyr216)	sc-81496	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Lamina-β	NA12	Calbiochem	1:500
β-catenina	Sc-7199	Santa Cruz Biotechnology	1:500
iNOS	sc-7271	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
TREM2	sc-373828	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anticuerpo secundario anti-ratón	0300-0108P	Bio-Rad	1:5000
Anticuerpo secundario anti-conejo	5196-2504	Bio-Rad	1:5000

Los anticuerpos secundarios (**Tabla S4**) conjugados a la peroxidasa de rábano o HRP (del inglés «Horseradish peroxidase») (Bio-Rad), se incubaron durante una hora a temperatura ambiente después de haber realizado 3 lavados de 5 min con TBS-T. La señal del anticuerpo secundario se amplificó mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL™ (Thermo Scientific). Las bandas se cuantificaron con el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). Como control de carga se utilizaron las proteínas GAPDH y α-Tubulina. En los protocolos de fraccionamiento celular se utilizaron las proteínas Lamina-β y α-Tubulina como control de carga nuclear y citosólico (respectivamente).

2.4.3. Inmunocitoquímica

Las células SH-SY5Y y los linfoblastos se fijaron con 4% de paraformaldehído (Sigma Aldrich) en PBS 1X (Sigma-Aldrich) durante 20 min a 37°C. Los linfoblastos (1×10^6 /mL) una vez fijados se pegaron en cristales recubiertos de poli-L-lisina (10 µg/mL) (Sigma-Aldrich) con una centrífuga Cytospin a 700 rpm durante 7 min. Las SH-SY5Y se sembraron directamente sobre cristales con

poli-L-lisina en placas de 24 pocillos (Falcon™) a una densidad de 150.000 células por pocillo. A continuación ambos tipos celulares se permeabilizaron con 0.5% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con 2% de BSA y 0.1% de caseína (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (**Tabla S5**) en 6% de BSA durante 1 hora a 37°C. Después de realizar 3 lavados con PBS se añadió el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488 durante una hora. El marcador nuclear utilizado fue HCS de color rojo intenso ó DAPI (Thermo Fisher). Finalmente, tras 2 lavados con BSA 1% y 3 con caseína 0.1% en PBS, se montaron las muestras en portas con medio de montaje Fluoromount (Sigma-Aldrich). Las imágenes se analizaron en el microscopio Confocal Láser de Barrido (CLSM) Leica TSC SP8 con el objetivo de inmersión en aceite (63x). El fluoróforo Alexa 488 y el marcador nuclear HCS se excitaron a 488 nm y 638 nm y las emisiones se recogieron en los intervalos 510-550 nm y 650-700 nm respectivamente. La cuantificación de la señal se realizó con el programa ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA).

Tabla S5. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución
TDP-43 (N-terminal)	10782-2-AP	Proteintech	1:1000
Alexa Fluor 488	R37118	Life Technologies	1:200

3. MODELOS ANIMALES

3.1. Ensayo *in vivo* con el ratón transgénico TDP-43^{A315T}

El ensayo se llevó a cabo en ratones silvestres (WT) y en ratones transgénicos Prp-hTDP-43^{A315T} desarrollados por Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA), ambos con el fondo genético C57BL/6. Los ratones fueron criados en condiciones estándar de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con libre acceso a agua y alimentos y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Todos los protocolos llevados a cabo durante el experimento fueron aprobados por el órgano encargado del bienestar animal del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) (ref. PROEX 059/16) en cumplimiento de los artículos 33.1 y 38.1 del Real Decreto 53/2013, del 1 de Febrero (BOE 8 de Febrero) y de acuerdo a la normativa europea en relación al uso de animales para experimentación (2010/63/EU).

3.1.1. Genotipado de las crías

Las crías de ratón fueron genotipadas al destete (21-28 días de vida) para comprobar la presencia o ausencia del transgén TDP-43^{A315T}.¹³⁴ El ADN se extrajo de la cola del ratón y se amplificó con el Kit REExtract-N-AmpTM Tissue PCR (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo de la casa comercial. La amplificación del ADN se realizó mediante la técnica PCR, con unos oligonucleótidos específicos (Sigma-Aldrich) diseñados para amplificar sendos fragmentos de la TDP-43 endógena del ratón y de la TDP-43 humana perteneciente al constructo Prp-hTDP-43^{A315T} (**Tabla S6**). El programa de PCR en el termociclador es el siguiente: una desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 3 pasos [1) desnaturalización durante 20 seg a 94°C; 2) unión de los oligonucleótidos durante 15 seg a 64°C; 3) extensión de la cadena de ADN durante 10 seg a 68°C], y por último una extensión final durante 2 min a 72°C.

Tabla S6. Secuencia de oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR.

	Oligo 5' → 3'	Oligo 3' → 5'
TDP-43	GGA TGA GCT GCG GGA GTT CT	TGC CCA TCA TAC CCC AAC TG
TDP-43 endógena	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% (Bio-Rad) con el ADN amplificado al que se le añadió GelRed para la posterior visualización del ADN con un transiluminador de luz UV. El análisis de estos geles permite distinguir los 2 genotipos posibles: los ratones transgénicos que presentan 2 bandas correspondientes a ambas proteínas (el transgén TDP-43^{A315T} de 400 pares de bases y la TDP-43 endógena del ratón de 200 pares de bases) y los silvestres con 1 banda (TDP-43 endógena del ratón). Una vez caracterizados los animales, se dividieron en 4 grupos de forma aleatoria con una N mínima de 8 machos por grupo. Las hembras fueron excluidas del estudio. En cada grupo había ratones silvestres y transgénicos con y sin tratamiento (inhibidor de quinasa o vehículo). El ensayo se llevó a cabo a ciegas para evitar posibles sesgos.

3.1.2. Tratamiento y extracción de muestras

Todos los ensayos realizados comenzaron en la fase presintomática de la enfermedad en el día 65 postnatal (P65). El tratamiento se administró intraperitonealmente a una dosis de 1mg/Kg/día para el inhibidor de CK-1 (IGS 2.7) y 5mg/Kg/día para los inhibidores de CDC7 y TTBK1 (C24 y T25 respectivamente). En el caso de Tideglusib la administración fue vía oral a una dosis de

200 mg/Kg/día. La solución vehículo administrada a los ratones control y en la que va disuelto el fármaco tiene la siguiente composición: 6% Tween 80 y DMSO (4% para IGS 2.7 y 1% para C24 y T25) en suero salino (Sigma-Aldrich). La solución vehículo de Tideglusib fue: 26% polietilenglicol, 15% Cremophor® y 59% H₂O. El fármaco se administró durante 25 días consecutivos en el caso de IGS 2.7, pudiéndose prolongar 5 días más con el tratamiento de los compuestos C24 y T25 al verse reducida la obstrucción intestinal tras la administración de la comida en formato gel. En el caso de Tideglusib, el fármaco se administró durante 30 ó 50 días consecutivos.

El peso de los animales se registró diariamente durante todo el ensayo. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la administración de la última dosis de tratamiento por decapitación. La médula espinal fue rápidamente extraída y congelada para su posterior procesamiento. Para el análisis bioquímico, las médulas se congelaron en isopentano frío y se guardaron a -80°C. Para el análisis histológico, se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0.1 M (pH 7.4) durante 24 horas a 4°C, y se crioprotegieron sumergiéndolas durante otras 24 horas en una solución con sacarosa al 30% (Sigma-Aldrich). Las muestras se conservaron a -80°C.

3.1.3. Pruebas comportamentales

Las pruebas comportamentales se realizaron una vez por semana (antes de la inyección del fármaco o vehículo) durante el periodo del tratamiento con el objetivo de evaluar la afectación motora.

- Prueba del Rotarod

El test de actividad en rodillo o Rotarod es una prueba que consiste en evaluar la coordinación motora analizando el tiempo que aguantan los ratones andando encima de un rodillo cuya velocidad aumenta gradualmente de 4 a 40 rpm en un periodo de 5 min. El ensayo consta de 3 pruebas realizadas con un intervalo de 15 min entre cada prueba. Este se lleva a cabo tras un periodo de aclimatación y entrenamiento. El entrenamiento consiste en 3 sesiones con un intervalo entre cada sesión de 5 min, en los que se sitúa al ratón encima de un rodillo integrado en un dispositivo LE8200 (Panlab, Barcelona, Spain) durante 1 min a una velocidad constante de 4 rpm (en la primera sesión el rodillo está estático). Una vez finalizado el entrenamiento, se procede a realizar el ensayo después de un periodo de 30 min de descanso. El resultado es la media de las 3 pruebas realizadas.

- *Prueba de Claspig*

El fenotipo motor denominado “claspig” refleja un componente de espasticidad en el cual se observan contracciones involuntarias o distonía de los miembros traseros del animal cuando son suspendidos por la cola. Mientras que la respuesta motora típica de un ratón cuando se le sostiene por la cola es la extensión de las patas traseras, los ratones que presentan *claspig* contraen sus patas hacia el tronco. Se consideró un fenotipo *claspig* positivo cuando en un intervalo de 1 min de tiempo los ratones contrajeron una o las dos patas posteriores de forma reiterada. El ensayo se realiza por triplicado con un intervalo de 15 min entre cada prueba. Los resultados obtenidos corresponden a la media de las tres medidas realizadas. Los parámetros establecidos para evaluar la afectación motora tienen un valor de 0 a 3 en función de si: 0) no contrae ninguna extremidad posterior; 1) contrae una extremidad; 2) contrae ambas extremidades; 3) contrae ambas extremidades y adopta una posición corporal encorvada.

3.2. Procesamiento de muestras

3.2.1. Análisis histológicos

Para el análisis histológico se realizaron cortes coronales de 20 µm de la sección lumbar (L4-L6) de la médula espinal con un criostato. Estas secciones se utilizaron para el análisis de las motoneuronas (tinción de Nissl y ChAT) y para el estudio de la gliosis (Iba-1 y GFAP).

- *Tinción de Nissl*

Las secciones de 20 µm de la médula espinal a nivel lumbar (L4-L6) se incubaron con violeta de cresilo 0.25% y 0.1% de ácido acético durante 10 min a 60°C (Sigma-Aldrich). A continuación el tejido fue lavado con agua destilada, fijado y deshidratado sumergiendo las muestras en un gradiente de etanol a concentraciones crecientes (96%-100%) durante 1,5 min y en xilol durante 5 min (Sigma-Aldrich). Por último se sellaron con medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich), se analizaron y fotografiaron con el objetivo 10X de un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) y una cámara Leica DFC300FX en las mismas condiciones de luz, brillo y contraste. El número total de motoneuronas fue evaluado en la lámina IX del asta ventral en 6 secciones distintas del mismo animal, con un mínimo de 6 animales por grupo. El valor final corresponde a la media de los datos obtenidos de todos los animales de un mismo grupo.

- *Inmunohistoquímica*

Las secciones de 20 μm de la médula espinal a nivel lumbar (L-3-L5) se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) durante 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (**Tabla S7**) disuelto en 0.01% de Tritón X-100 en PBS durante toda la noche a 4°C. Después de realizar 3 lavados con PBS se añadió el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488 disuelto en 0.01% de Tritón X-100 en PBS durante 2 horas a 37°C (**Tabla S7**). Las imágenes se analizaron en el microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) con el objetivo 10x. El fluoróforo Alexa 488 se excitó a 488 nm y la emisión se recogió en el intervalo 510-550 nm. Las muestras se fotografiaron con una cámara Leica DFC300FX en las mismas condiciones de luz, brillo y contraste. La cuantificación de la señal se realizó con el programa ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA). El número de motoneuronas, la microgliosis y astrogliosis fueron evaluados en la lámina IX del asta ventral en 6 secciones distintas del mismo animal, con un mínimo de 6 animales por grupo. El valor final corresponde a la media de los datos obtenidos de todos los animales de un mismo grupo.

Tabla S7. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución
ChAT	PA5-29653	Life Technologies	1:200
Iba-1	019-19741	Wako Chemicals	1:500
GFAP	Z0334	DAKO	1:500
Alexa Fluor 488	R37118	Life Technologies	1:200

3.2.2. Análisis bioquímico

Para el análisis bioquímico se extrajeron las proteínas de una parte de la sección lumbar de la médula espinal. Para ello las muestras descongeladas se disgregaron mecánicamente en presencia de 70 μL de tampón de lisis RIPA (Bio-Rad) con 10 $\mu\text{l/mL}$ de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche, Mannheim, Germany). A continuación se incubaron durante 30 min en hielo y se centrifugaron durante 20 min a 15.000 rpm. El contenido proteico presente en el sobrenadante se congeló a -80°C para su conservación.

- Western blot

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit comercial de cuantificación de proteínas Pierce™ BCA (Thermo Scientific). La separación de proteínas en base a su peso molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% (Bio-Rad) (20 µg/muestra). La transferencia se realizó a una membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA) a 4°C. Las membranas se bloquearon durante una hora con 5% de BSA disuelto en TBS-T (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) (Sigma-Aldrich). La incubación con los anticuerpos primarios (**Tabla S8**) se realizó durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano o HRP (del inglés "Horseradish peroxidase") (Bio-Rad), se incubó durante una hora a temperatura ambiente. La señal del anticuerpo secundario se amplificó mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL™ (Thermo Scientific). Las bandas se cuantificaron con el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH.

Tabla S8. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas mediante Western Blot.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución
TDP-43 (N-terminal)	10782-2-AP	Proteintech	1:1000
TDP-43 (p-Ser409/410) monoclonal	66318-Ig	Proteintech	1:850
GAPDH	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology	1:500
iNOS	sc-7271	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
TREM2	sc-373828	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anticuerpo secundario anti-ratón	0300-0108P	Bio-Rad	1:5000
Anticuerpo secundario anti-conejo	5196-2504	Bio-Rad	1:5000

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software Graph Pad (versión 6.0). Los datos se expresan como la media ± SEM. En el procesamiento de los datos obtenidos de los cultivos celulares se utilizó el análisis T-Student o el análisis de la varianza ANOVA de un factor seguido del test Newman-Keuls para comparar diferentes tratamientos. Como límite de significancia estadística se utilizó un valor de p inferior a 0,05. El tamaño de muestra utilizado en los diferentes grupos experimentales fue siempre > 3. En los estudios realizados en el ratón transgénico, las diferencias significativas entre los 4 grupos de estudio (WT+ tratamiento, WT+ vehículo, TDP43+ tratamiento, TDP43+vehículo) se evaluaron mediante el análisis de la varianza ANOVA de dos factores seguida de la prueba de rango *post hoc* de Bonferroni. Como límite de significancia

estadística se utilizó un valor de p inferior a 0,05. El tamaño de muestra utilizado en los diferentes grupos experimentales de todos los experimentos fue siempre > 5 animales.

VI.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

Selección de los candidatos a fármaco para el estudio de la patología de TDP-43

1. SELECCIÓN DE LOS CANDIDATOS A FÁRMACO PARA EL ESTUDIO DE LA PATOLOGÍA DE TDP-43

El proceso de desarrollo de un fármaco debe estar enfocado a la obtención de compuestos selectivos con un elevado potencial terapéutico y con unas propiedades farmacológicas óptimas para que los candidatos a fármaco consigan ser exitosos en las últimas fases de su desarrollo.

A pesar de la heterogeneidad que existe entre los pacientes de ELA, la principal característica patológica común a la mayoría de ellos es la presencia de agregados de TDP-43 fosforilados y ubiquitinados en el citosol de las células afectadas.⁴⁷ Por ello, se considera una buena estrategia terapéutica la búsqueda de pequeñas moléculas que inhiban la actividad de las proteínas quinasas que están sobreexpresadas o que co-localizan con los agregados de TDP-43 en los tejidos de pacientes con esta proteinopatía.

Las quinasas involucradas en la fosforilación *in vivo* de los principales aminoácidos de TDP-43 asociados a la degeneración neuronal (Ser409/410)⁷⁸ conocidas a día de hoy son: CK-1 (CK-1δ y CK-1ε), CDC7, TTBK1 y TTBK2.¹⁷² GSK-3β modula la fosforilación y formación de agregados de la proteína pero no hay evidencias de que la fosforile directamente.⁷² De todas ellas se han seleccionado como dianas terapéuticas CK-1, CDC7, TTBK1 y GSK-3β.

La búsqueda y desarrollo de fármacos que inhiban las 4 quinasas propuestas anteriormente se ha llevado a cabo mediante una estrategia de **genética química reversa**, que consiste en identificar pequeñas moléculas capaces de interactuar con la diana de interés, validando posteriormente su efecto en diferentes modelos celulares y/o animales (**Figura 19**).²⁰³ En primer lugar, se propone un ensayo fenotípico donde se pueda evaluar el aumento de la supervivencia celular en respuesta a una bajada de los niveles de fosforilación de TDP-43. Una vez validada la eficacia de los inhibidores de quinasas en el ensayo fenotípico, se evaluará el potencial terapéutico de los candidatos seleccionados en diversos modelos celulares que recapitulan las características patológicas de la ELA y en concreto de la proteinopatía de TDP-43. Finalmente, se procederá al estudio de la eficacia de aquellos compuestos que resulten más prometedores en un modelo de ratón transgénico de TDP-43.

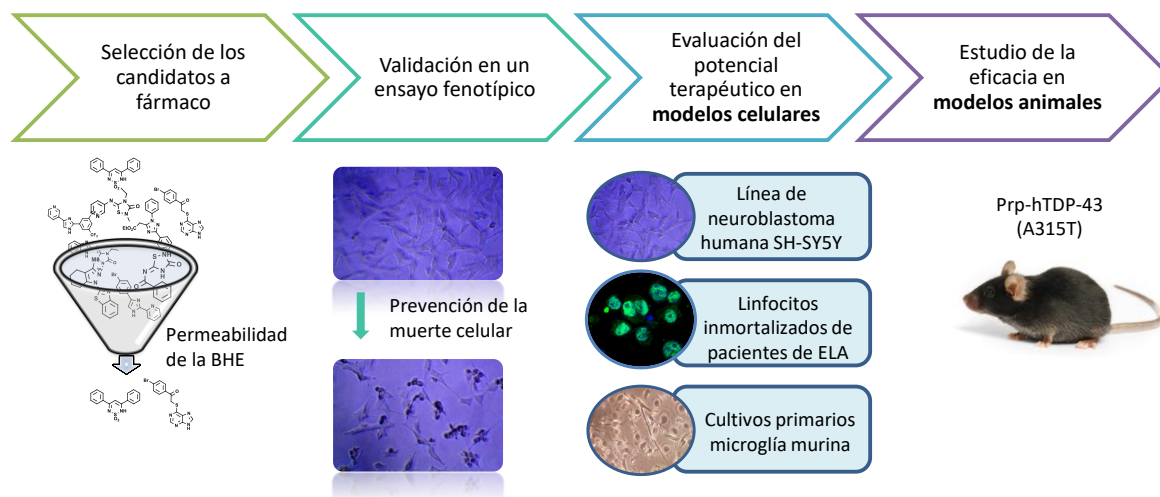


Figura 19. Esquema del proceso de desarrollo de un fármaco siguiendo la estrategia de genética química reversa.

Para el estudio de la inhibición de la actividad enzimática *in vitro* se implementó en el laboratorio un ensayo luminiscente que permite determinar la actividad inhibitoria de las moléculas sobre las quinasas CK-1 (δ y ϵ) y GSK-3 β . En el caso de CDC7 y TTBK1, la determinación de la inhibición enzimática se deriva a centros de investigación bajo contrato, si bien el procedimiento a seguir para la evaluación de los compuestos es el mismo. En un primer lugar se evalúa el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática a una concentración fija del compuesto (10 μ M). Si a esta concentración el compuesto en estudio es capaz de inhibir más del 50% de la actividad de la quinasa, se realiza una curva dosis-respuesta para determinar la concentración a la cual inhibe el 50% de la actividad de la enzima, lo que se conoce como "concentración inhibitoria del 50% o CI_{50} ". Si por el contrario el compuesto no pasa el umbral de inhibición a 10 μ M, se descarta de la cascada de cribado.

Aquellos compuestos que resultan tener valores de CI_{50} en el rango μ M pasan al segundo paso del cribado en el que se evalúan las propiedades tipo fármaco con el objetivo de seleccionar aquellas moléculas que sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar a su diana en el SNC.

1.1. Elección de los compuestos

La experiencia del grupo de investigación basada en la búsqueda de pequeñas moléculas capaces de inhibir una amplia variedad de quinasas y fosfodiesterasas para el tratamiento de diversas enfermedades principalmente neurológicas y neurodegenerativas, ha hecho que a día de

hoy cuenta con una quimioteca propia conocida como MCB (del inglés «Medicinal and Biological Chemistry library») de más de 2000 compuestos caracterizados con un buen perfil farmacológico.²⁰⁴

Actualmente están activos 4 programas de química médica centrados en el diseño y síntesis de inhibidores de CK-1 (CK-1 δ y CK-1 ϵ), GSK-3 β , CDC7 y TTBK1 para el tratamiento de diversas patologías del SNC y en concreto para la ELA. Los criterios que se han tenido en cuenta para la selección de los compuestos varían en función de la quinasa.

1.1.1. Inhibidores de CK-1

La búsqueda de inhibidores selectivos de CK-1 se llevó a cabo mediante la estrategia de genética química reversa, identificando pequeñas moléculas que tengan la capacidad de modular la actividad o función de la diana propuesta. Para ello se realizó una primera selección basada en la diversidad estructural de 25 compuestos de la quimioteca del grupo MCB y se evaluó su potencial inhibitorio frente a CK-1. De todos ellos se obtuvo un derivado de benzotiazol que presentaba cierta actividad sobre CK-1 δ . Con el fin de aumentar la potencia de este compuesto se desarrolló un programa de química médica exhaustivo en donde variando la estructura química de esta molécula se obtuvo una colección de más de 100 inhibidores de CK-1 δ , la mayoría de ellos con una Cl_{50} en el rango nanomolar (**Figura 20**).

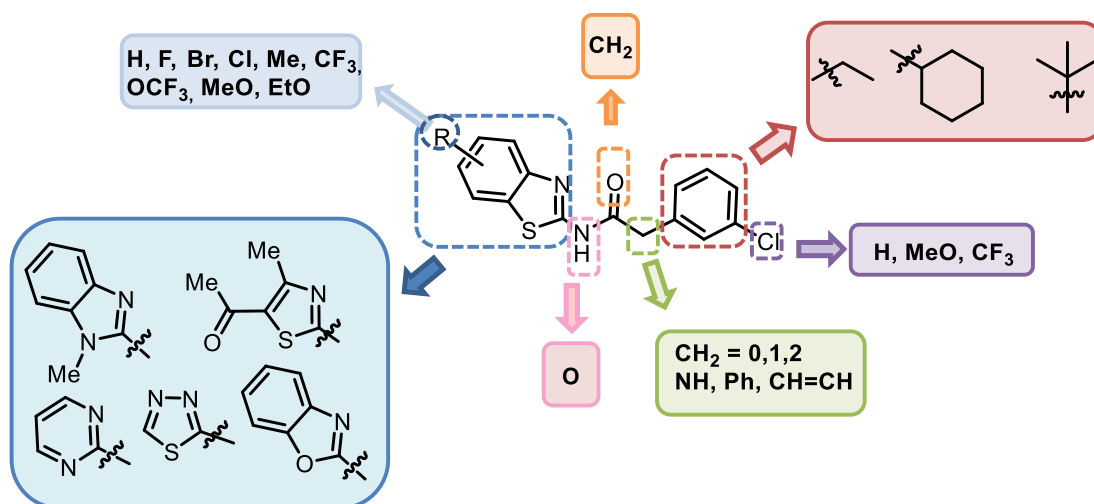


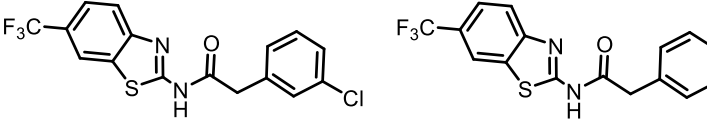
Figura 20. Estructura del primer inhibidor de CK-1 δ identificado con las modificaciones estructurales propuestas para la síntesis de nuevos inhibidores.

Estos compuestos son ATP-competitivos, es decir, se unen al mismo sitio de la enzima al que se une el ATP. Este sitio de unión se caracteriza por estar altamente conservado en todo el

quinoma por lo que para evitar efectos colaterales no deseados se realizó un estudio sobre más de 450 quinazinas obteniendo como resultado una elevada selectividad frente a las quinazinas de la familia CK-1.¹⁷⁹

La validación de estos compuestos en diferentes modelos celulares e incluso en un modelo transgénico de TDP-43 humana en *Drosophila*, muestran el gran potencial que tienen para el tratamiento de la proteinopatía de TDP-43.^{97,179}

De todos ellos se han seleccionado dos derivados de benzotiazol; IGS 2.7 e IGS 3.27 para evaluar su efecto neuroprotector en modelos celulares y animales específicos de ELA. Ambas moléculas presentan una Cl_{50} del rango bajo nanomolar frente a CK-1 δ y submicromolar frente a CK-1 ϵ y tienen capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica para ejercer su efecto en el SNC (**Figura 21**).



		IGS 2.7	IGS 3.27
CK-1δ	Cl_{50} (μ M)	0.023 \pm 0.002	0.047 \pm 0.005
CK-1ϵ	Cl_{50} (μ M)	0.84 \pm 0.06	0.76 \pm 0.03
Pe	(10^{-6} cm.s $^{-1}$)	11.3 \pm 2	4.4 \pm 2.9
Predicción BHE		SNC+	SNC+

Figura 21. Estructura química, Cl_{50} frente a CK-1 (δ y ϵ), permeabilidad efectiva (Pe) y predicción del paso de la barrera hematoencefálica de los compuestos IGS 2.7 e IGS 3.27.

1.1.2. Inhibidores de GSK-3 β

Hasta ahora no se ha descrito en la literatura ningún inhibidor de GSK-3 β que disminuya la fosforilación de TDP-43, sin embargo se conoce que GSK-3 β está sobreexpresada en el SNC de pacientes de ELA y que los niveles de GSK-3 β en células periféricas de pacientes están directamente relacionados con la sintomatología clínica.^{182,205} Todo ello unido a algunos estudios realizados con litio,¹⁸⁵ el primer inhibidor de GSK-3 β conocido, hacen proponer a GSK-3 β como una buena diana terapéutica para el desarrollo de futuros fármacos.

Este grupo de investigación lleva años desarrollando inhibidores de esta quinasa para el tratamiento de diversas patologías principalmente neurológicas y neurodegenerativas. Esta familia de compuestos no solo presentan estructuras variadas sino que además modulan la enzima de diferentes formas; existen inhibidores reversibles que compiten por el sustrato, por el ATP, moduladores alostéricos e incluso inhibidores irreversibles.

Actualmente se encuentra en clínica Tideglusib (**Figura 22**), un inhibidor ATP-no competitivo de GSK-3 β cuya seguridad en pacientes ha sido probada en diferentes ensayos clínicos diseñados para la enfermedad de Alzheimer, el trastorno del espectro del autismo o TEA, el síndrome de parálisis supranuclear progresiva y para la distrofia miotónica. A día de hoy se encuentra en fase 2/3 de un ensayo clínico para distrofia miotónica congénita.²⁰⁶

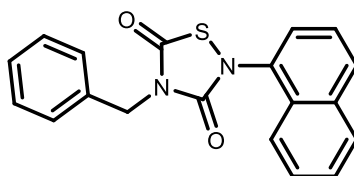


Figura 22. Estructura química de Tideglusib.

El desarrollo de un fármaco desde que se diseña hasta que llega al mercado es un proceso complejo de muy larga duración (entre 12 y 15 años). Sin embargo, existe lo que se conoce como “reposicionamiento de fármacos”, es decir, encontrar nuevas aplicaciones terapéuticas a fármacos cuya seguridad en humanos es conocida, bien porque están en ensayos clínicos o porque ya han sido aprobados para su comercialización.

Tideglusib ha mostrado una eficacia dosis dependiente en la disminución de la atrofia cerebral en pacientes de parálisis supranuclear progresiva,²⁰⁷ siendo por tanto capaz de llegar a su diana en el SNC en donde ejerce un efecto neuroprotector y antiinflamatorio reflejado en la mejora de la sintomatología de las patologías previamente descritas.²⁰⁸ Es por ello por lo que el principal objetivo en esta familia de compuestos se ha centrado en reposicionar el fármaco Tideglusib en un ensayo clínico como tratamiento para la ELA, estudiando previamente su mecanismo de acción en los modelos de ELA establecidos en el presente trabajo.

1.1.3. Inhibidores de CDC7

Tras el descubrimiento de la implicación de CDC7 en la fosforilación patológica de TDP-43,⁸⁰ se implementó en el grupo de investigación un programa de química médica basado en el diseño y síntesis de pequeñas moléculas capaces de modular la actividad de CDC7 como potenciales fármacos para el tratamiento de la proteinopatía de TDP-43, en concreto para la ELA y DFT. Hasta entonces, solo había un inhibidor de CDC7 descrito en la literatura que modulara la fosforilación patológica de TDP-43.⁸⁰ Este compuesto conocido como PHA-767491, no es capaz de atravesar la BHE y llegar al órgano diana por lo que se procedió al diseño de nuevos inhibidores de CDC7 con propiedades farmacológicas óptimas para poder tratar este tipo de enfermedades del SNC.

Para ello se llevó a cabo, al igual que con los inhibidores de CK-1, la estrategia de genética química reversa, en donde se hizo una primera selección de 15 compuestos de la quimioteca MBC basada en la diversidad estructural evaluando su potencial inhibitorio frente a CDC7 en un ensayo fluorimétrico comercial. De esta forma se identificó un derivado de benzotipurina con una IC_{50} de 2.12 μ M a partir del cual se diseñaron diferentes modificaciones estructurales obteniendo una familia de más de 30 inhibidores de CDC7 ATP-competitivos (**Figura 23**, **Tabla 1**).

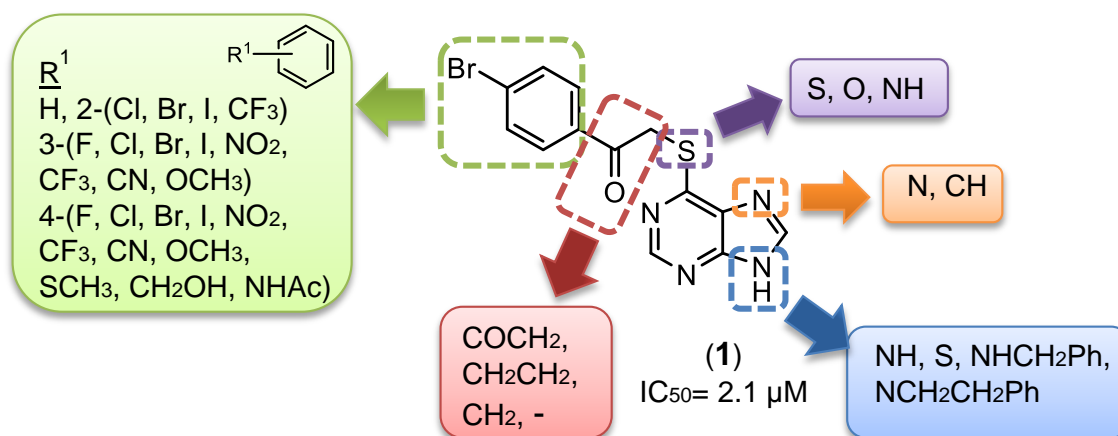


Figura 23. Estructura química del inhibidor de CDC7 identificado derivado de benzotipurina con las modificaciones estructurales propuestas.

En este caso se realizó también un estudio en 53 quinasas distintas con el fin de evaluar la selectividad de los compuestos obteniendo como resultado una elevada especificidad frente a CDC7.

Tabla 1. Inhibidores de CDC7 con sus respectivas Cl_{50} . ^{a)} Porcentaje de inhibición de la actividad de CDC7 a 10 μ M.

Compuesto	CDC7 Cl_{50} (μ M)	Compuesto	CDC7 Cl_{50} (μ M)	Compuesto	CDC7 Cl_{50} (μ M)
C1	2.12 \pm 1.50	C17	30% ^a	C33	18% ^a
C2	4.15 \pm 2.64	C18	0.19 \pm 0.03	C34	11% ^a
C3	3.11 \pm 1.68	C19	0.08 \pm 0.02	C35	0.23 \pm 0.04
C4	0.44 \pm 0.11	C20	0.32 \pm 0.06	C36	0.39 \pm 0.11
C5	0.18 \pm 0.08	C21	0.34 \pm 0.06	C37	0.14 \pm 0.03
C6	0.13 \pm 0.01	C22	0.24 \pm 0.06	C38	3% ^a
C7	0.20 \pm 0.04	C23	0.36 \pm 0.05	C39	0.39 \pm 0.05
C8	0% ^a	C24	0.27 \pm 0.06	C40	12% ^a
C9	0.30 \pm 0.03	C25	0.09 \pm 0.02	C41	0.30 \pm 0.04
C10	0.36 \pm 0.07	C26	7% ^a	C42	8% ^a
C11	0.29 \pm 0.07	C27	0.58 \pm 0.10	C43	0.19 \pm 0.03
C12	0.14 \pm 0.01	C28	4% ^a	C44	4% ^a
C13	0.47 \pm 0.06	C29	0.25 \pm 0.07	C45	3.06 \pm 1.00
C14	0.30 \pm 0.02	C30	9% ^a	C46	0.19 \pm 0.05
C15	0.13 \pm 0.03	C31	1.38 \pm 0.43	C47	0.17 \pm 0.04
C16	0.14 \pm 0.03	C32	1.72 \pm 0.26	C48	0.91 \pm 0.24

De todos los compuestos que presentaron actividad frente a CDC7, se seleccionaron aquellos cuya Cl_{50} fuese inferior a 1 μ M para continuar con su desarrollo preclínico, es decir, los compuestos **C4-C7, C9-C16, C18-C25, C27, C29, C35-C37, C39, C41, C43, C46-C48**.

1.1.4. Inhibidores de TTBK1

Dada la relación de TTBK1/2 con la proteinopatía de TDP-43,¹⁹⁷ se inició en el laboratorio un programa de química médica centrado en la búsqueda de inhibidores selectivos de la isoforma que se expresa mayoritariamente en el SNC, es decir, TTBK1.¹⁹⁶ Cuando comenzó este proyecto tan solo había descritos en la literatura dos inhibidores de TTBK; AZ1 y AZ2, cuyas Cl_{50} eran desconocidas (**Figura 24**). Partiendo de los complejos cristalinos de estos inhibidores con TTBK1, se diseñó en nuestro laboratorio un prototipo a partir del cual se realizaron diferentes modificaciones estructurales obteniendo como resultado una colección de más de 35 compuestos con una Cl_{50} del orden submicromolar (**Tabla 2**).

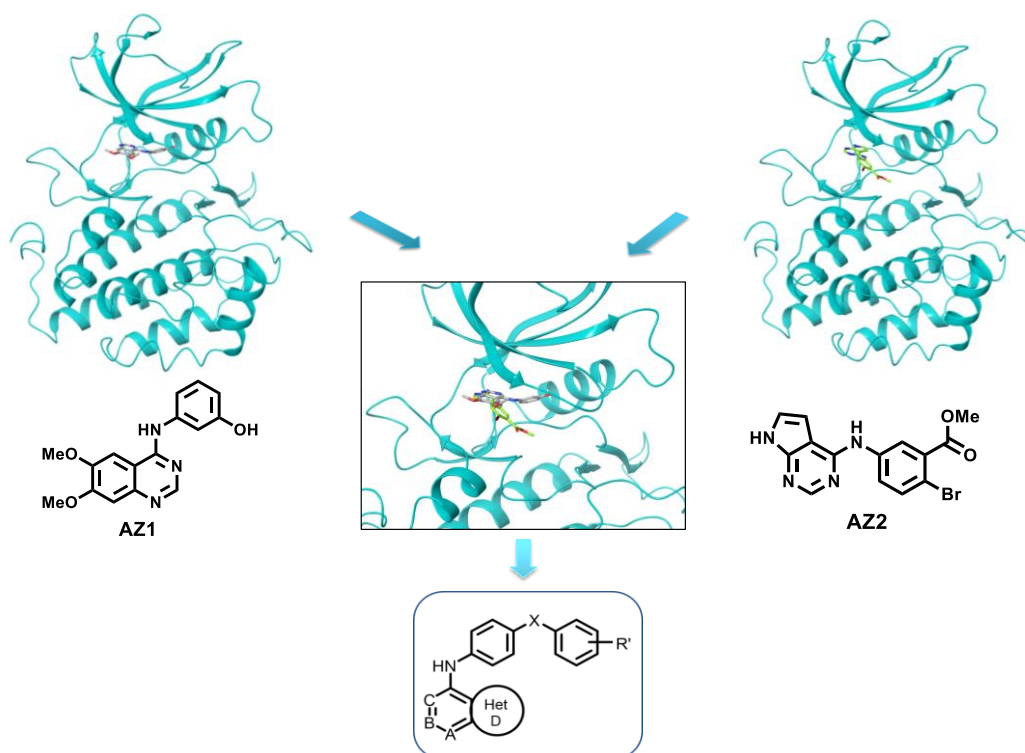


Figura 24. Estructura química de los inhibidores de TTBK (AZ1 y AZ2), estructura cristalizada de TTBK1 con AZ1 y AZ2, y prototipo químico diseñado a partir de la fusión de ambas estructuras.

Tabla 2. Listado de los inhibidores de TTBK con las respectivas Cl_{50} y la selectividad frente a las dos isoformas TTBK1/TTBK2. ^{a)} Porcentaje de inhibición enzimática a 10 μ M.

Compuesto	TTBK1 Cl_{50} (μ M)	TTBK2 Cl_{50} (μ M)	Selectividad TTBK1/TTBK2
AZ1	4.4 \pm 2	6.8 \pm 0.9	0.65
AZ2	2.6 \pm 0.5	3.2 \pm 0.5	0.81
T1	15.2 \pm 0.1	13.9 \pm 2.3	1.09
T2	15% ^a	20% ^a	
T3	6.1 \pm 0.04	6.7 \pm 2.5	0.91
T4	9.1 \pm 4.9	13%	> 0.01
T5	14% ^a	<10% ^a	
T6	3 \pm 0.4	7.3 \pm 3.9	0.41
T7	3% ^a	<10% ^a	
T8	4.3 \pm 1.7	9.3 \pm 3.9	0.46
T9	8% ^a	<10% ^a	
T10	25% ^a	12% ^a	
T11	21.8 \pm 4.1	42.1 \pm 4.2	0.52
T12	3.2 \pm 0.7	20.3 \pm 3.7	0.16
T13	23% ^a	10% ^a	
T14	12.8 \pm 3.7	37.7 \pm 2	0.34
T15	31% ^a	<10% ^a	
T16	5 \pm 1.3	15.9 \pm 0.4	0.31

Compuesto	TTBK1 Cl_{50} (μ M)	TTBK2 Cl_{50} (μ M)	Selectividad TTBK1/TTBK2
T17	32% ^a	10% ^a	
T18	0.8 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2	0.47
T19	0.4 \pm 0.02	0.8 \pm 0.3	0.46
T20	0.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.06	0.39
T21	13% ^a	3.8% ^a	
T22	4.7 \pm 0.9	5.7 \pm 2.3	0.82
T23	18% ^a	10% ^a	
T24	12% ^a	1% ^a	
T25	0.2 \pm 0.1	4.2 \pm 1.5	0.06
T26	1.7 \pm 0.9	11.9 \pm 4.2	0.14
T27	2.7 \pm 1.8	22.7 \pm 2.8	0.12
T28	0.6 \pm 0.05	4.9 \pm 0.3	0.13
T29	0.7 \pm 0.1	3 \pm 0.8	0.25
T30	0.4 \pm 0.3	2.1 \pm 1.2	0.21
T31	1.5 \pm 1.8	<10% ^a	> 0.01
T32	0.5 \pm 0.4	0.9 \pm 0.5	0.56
T33	5 \pm 2.9	5% ^a	> 0.01
T34	3.4 \pm 2.3	<10% ^a	> 0.01

De todos ellos se seleccionaron para continuar con su desarrollo preclínico aquellos compuestos que presentaban mayor selectividad por TTBK1 que por TTBK2 con una CI_{50} frente a TTBK1 inferior a 3 μ M; **AZ2**, **T19**, **T20**, **T25-T32**. Aunque los compuestos **T33** y **T34** tienen una CI_{50} ligeramente superior a 3 μ M, también han sido incluidos en esta selección debido a la elevada selectividad que presentan por TTBK1 ($TTBK1/TTBK2 > 0.01$).

Una vez seleccionados los compuestos de estudio, se procedió a realizar un primer cribado en donde se evaluó el perfil farmacológico de los candidatos a fármaco.

1.2. Evaluación de las propiedades tipo fármaco

La caracterización y optimización de las propiedades relativas a la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los fármacos en las etapas tempranas de su desarrollo, es crucial para determinar si un compuesto tiene un perfil farmacológico aceptable como para entrar en fases preclínicas avanzadas y/o clínicas. El estudio de estas propiedades en las últimas fases del proceso fue durante años el principal motivo de fracaso de los fármacos suponiendo grandes pérdidas económicas a la empresa farmacéutica.²⁰⁹ Desde entonces, con el objetivo de optimizar la eficacia del proceso, se han desarrollado numerosas técnicas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* que permiten determinar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos.

El estudio de la propiedad farmacocinética de distribución de un fármaco adquiere gran relevancia en el mundo de las enfermedades neurodegenerativas, puesto que, para que el tratamiento sea efectivo es necesario que atreviese la BHE a una concentración terapéutica ejerciendo así un efecto significativo en el SNC. La BHE es un sistema de protección del organismo que separa el torrente sanguíneo del SNC regulando de manera estricta el intercambio de sustancias entre los vasos y el compartimento cerebral. La composición del endotelio del SNC difiere a la del resto de los vasos por presentar un sellado intercelular más riguroso (uniones estrechas) reforzado por la presencia de pericitos y astrocitos que rodean el endotelio. (**Figura 25**). Esta composición le confiere una capacidad altamente restrictiva impidiendo el paso de patógenos, moléculas y células al SNC. Solo aquellos compuestos lipofílicos que tengan un bajo peso molecular (<500 Da) podrán atravesarla directamente por difusión pasiva.²¹⁰

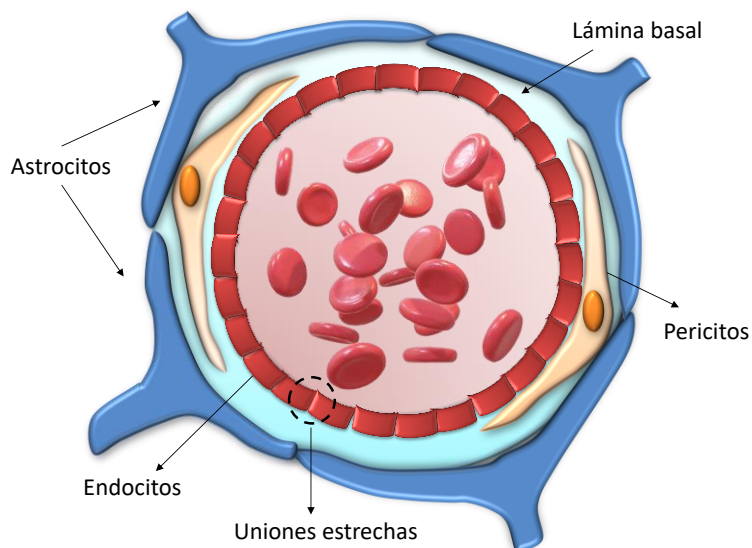


Figura 25. Representación de la BHE.

Puesto que el 95% de los fármacos que actúan en el SNC atraviesan la BHE por difusión pasiva, la metodología más eficiente y una de las más utilizadas en la industria farmacéutica para determinar la distribución de este tipo de fármacos en etapas tempranas de su desarrollo, es la metodología PAMPA (del inglés «Parallel Artificial Membrane Permeability Assay»).^{198,199} Esta técnica predice la permeabilidad efectiva de los compuestos a través de la BHE por difusión pasiva mediante un sistema de placas paralelas que se superponen a modo de “sándwich” separadas por una membrana artificial que emula la BHE al estar cubierta con lípido de cerebro porcino (Figura 26). Esta técnica, que determina la permeabilidad efectiva aparente (Pe) en relación a fármacos de uso humano conocidos, ha mostrado buenas correlaciones entre los valores de Pe obtenidos y valores de farmacocinética *in vivo*.^{211,97}

También existen otros modelos *in vitro*, principalmente desarrollados en cultivos celulares, más costosos desde el punto de vista económico y de puesta a punto que predicen el paso de la BHE por transporte activo. Este tipo de ensayos se lleva a cabo utilizando diferentes líneas de células endoteliales tanto murinas como humanas (bEnd5, MDR-MDCK, hCMEC/D3) e incluso en cultivos primarios de células endoteliales de la microvasculatura cerebral murina. También existen sistemas más sofisticados que emulan la BHE mediante co-cultivos de células endoteliales, astrocitos y pericitos.²¹²

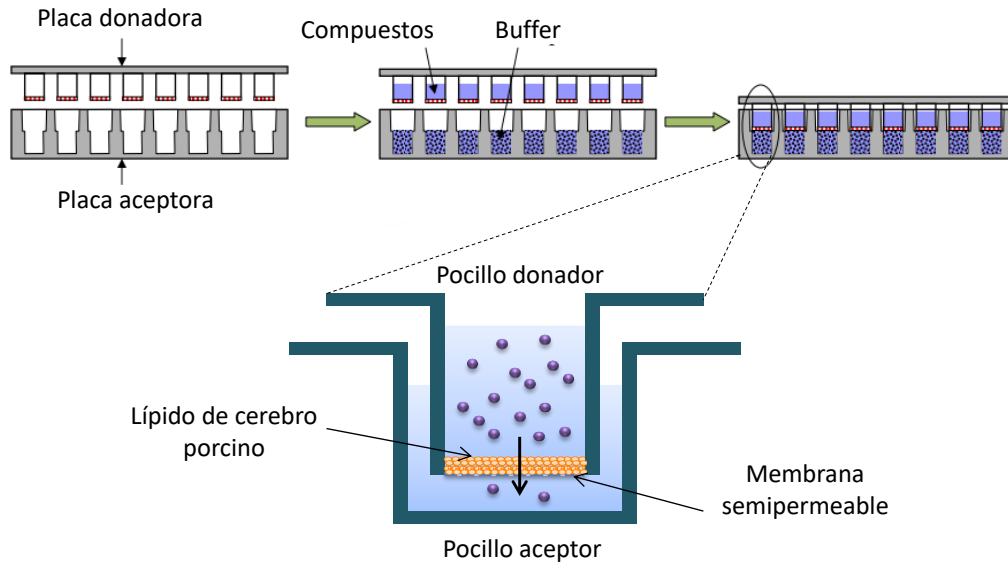


Figura 26. Esquema representativo de la metodología PAMPA; sistema de placas de 96 pocillos que se incuban en formato "sándwich" separados por una membrana semipermeable artificial cubierta con lípido de cerebro porcino que emula la BHE. En la placa donadora se sitúa el compuesto disuelto en el tampón experimental que, en el caso de ser permeable, atravesará la membrana pasando al pocillo aceptor. La concentración de compuesto se mide mediante la absorbancia del mismo.

En el presente trabajo el análisis de la propiedad de distribución de los candidatos a fármaco se ha realizado mediante la técnica PAMPA, al ser la más eficiente en esta fase del proceso por el alto rendimiento, el bajo coste y la buena reproducibilidad de los resultados. Siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos, se determinaron los valores de Pe de todos los compuestos propuestos cuya permeabilidad a través de la BHE no había sido estudiada previamente, es decir, el caso de los inhibidores de CDC7 y de TTBK1.

El ensayo consiste en medir la concentración de compuesto que es capaz de atravesar la membrana lipídica que separa la placa donadora de la aceptora tras un periodo de incubación de 2.30 horas a temperatura ambiente. Para validar el estudio se utilizan como controles 9 fármacos comerciales cuya permeabilidad hematoencefálica en humanos es conocida (tanto permeables como no permeables) (**Figura 27**). De esta forma se establece una correlación lineal entre la Pe experimental y la descrita en la literatura para los compuestos control, obteniendo una ecuación de la recta que permite determinar la Pe de los candidatos a fármaco siguiendo el patrón establecido en la literatura detallado en el apartado de materiales y métodos.¹⁹⁹ Así, se consideran SNC+ aquellos que tiene una alta probabilidad de atravesar la BHE; SNC- los que tienen una baja probabilidad de paso y; SNC+/SNC- aquellos que se encuentran en el intervalo dudoso y podrían o no atravesarla. El ensayo se hace por triplicado y en dos experimentos diferentes.

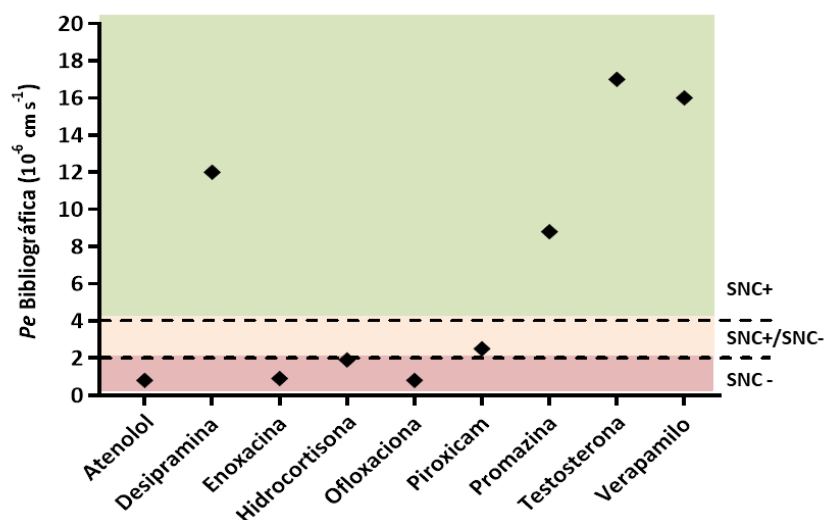


Figura 27. Representación de la permeabilidad de los compuestos comerciales utilizados como controles para validar el ensayo de PAMPA.¹⁹⁹ En la franja verde los SNC+, en la roja los SNC- y en la naranja SNC+/SNC-.

1.2.1. Predicción del paso de BHE de los inhibidores de CDC7

La predicción de la permeabilidad de los inhibidores de CDC7 se llevó a cabo en un ensayo en el que se obtuvo una buena correlación entre el valor de Pe experimental y el descrito en la literatura de los compuestos control; Pe (exp): 0.849 (lit) – 0.1282 (R^2 : 0.9828) (**Figura 28**).

Compuesto	Pe Bibliográfica ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Pe Experimental ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)
Atenolol	0.8	0.7 ± 0.1
Desipramina	12	11 ± 0.9
Enoxacina	0.9	0.6 ± 0.4
Hidrocortisona	1.9	1.1 ± 0.2
Ofloxacina	0.8	0.4 ± 0.2
Piroxicam	2.5	2.2 ± 0.5
Promazina	8.8	8.9 ± 1.1
Testosterona	17	14 ± 0.9
Verapamilo	16	14 ± 0.2

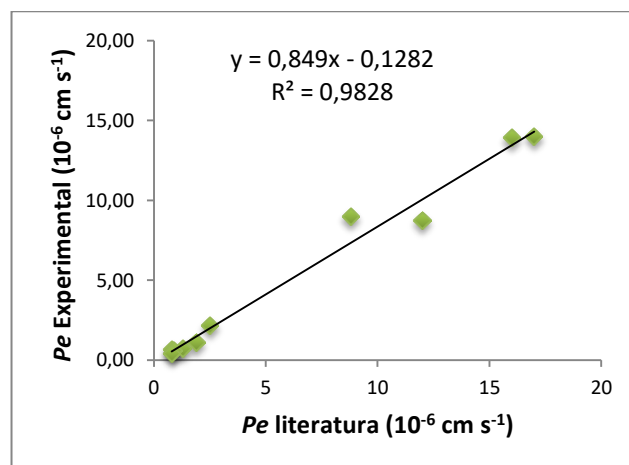


Figura 28. Correlación lineal del valor de Pe experimental y el descrito en la literatura¹⁹⁹ de los compuestos control en el ensayo de los inhibidores de CDC7. Los resultados se muestran con su valor de desviación estándar.

En este caso tal y como se explica en la sección de materiales y métodos, utilizando la ecuación de correlación se predice que los compuestos serán capaces de atravesar la BHE si presentan un $Pe > 3.26 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$. Por lo tanto, todos los candidatos estudiados tienen una

elevada probabilidad de atravesar la BHE por difusión pasiva excepto los compuestos **C11**, **C14**, **C18**, **C21** y **C47** que se encuentran en el intervalo dudoso (SNC+/SNC-) y los compuestos **C13** y **C15** que tienen baja probabilidad (SNC-) al tener una $Pe < 1.56 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (**Figura 29**). El inhibidor **C36** fue insoluble en el tampón experimental por lo que no se pudo determinar la permeabilidad efectiva.

Compuesto	$Pe \text{ exp.}$ ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Predicción
C4	11.5 ± 0.7	SNC +
C5	12.2 ± 1.2	SNC +
C6	5.5 ± 1.3	SNC +
C7	6.2 ± 1.1	SNC +
C9	10.9 ± 1.5	SNC +
C10	13.5 ± 1.6	SNC +
C11	2.0 ± 0.7	SNC+/ SNC-
C12	17.8 ± 0.7	SNC +
C13	0.2 ± 0.5	SNC -
C14	2.5 ± 0.7	SNC+/ SNC-
C15	1.1 ± 1.4	SNC -

Compuesto	$Pe \text{ exp.}$ ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Predicción
C16	15.1 ± 0.6	SNC+
C18	2.9 ± 0.4	SNC+/ SNC-
C19	13.8 ± 2.5	SNC+
C20	16.3 ± 0.6	SNC+
C21	2.3 ± 0.3	SNC+/ SNC-
C22	5.3 ± 0.8	SNC +
C23	9.4 ± 1.3	SNC +
C24	13.1 ± 0.1	SNC +
C25	18.1 ± 1.2	SNC +
C27	9.8 ± 1.4	SNC +
C29	17.5 ± 0.9	SNC +

Compuesto	$Pe \text{ exp.}$ ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Predicción
C35	4.5 ± 1.2	SNC +
C36	No soluble	
C37	25.1 ± 1.3	SNC +
C39	10.2 ± 0.5	SNC +
C41	10.6 ± 0.6	SNC +
C43	11.6 ± 0.6	SNC +
C46	7.2 ± 0.6	SNC +
C47	2.9 ± 0.9	SNC+/ SNC-
C48	14.0 ± 1.4	SNC +

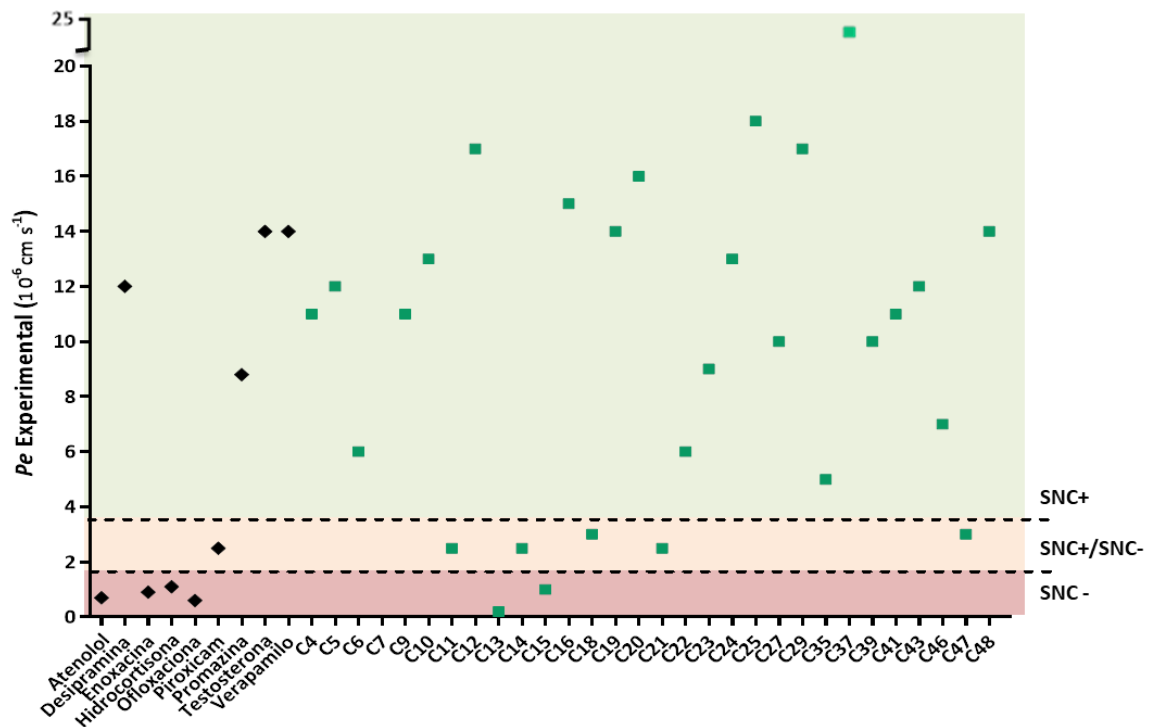


Figura 29. Tabla: Pe experimental y predicción del paso de BHE de los inhibidores de CDC7. Los resultados se muestran con su valor de desviación estándar. Gráfica: representación de la Pe experimental de todos los compuestos ensayados.

De todos los compuestos evaluados se consideran buenos candidatos a fármaco como para continuar con su desarrollo preclínico, aquellos que presentan una alta probabilidad de atravesar

la BHE (SNC+), es decir, los compuestos **C4-C7, C9-C10, C12, C16, C19-C20, C22-C25, C27, C29, C35, C37, C39, C41, C43, C46 y C48**.

1.2.2. Predicción del paso de BHE de los inhibidores de TTBK1

En el ensayo realizado con los inhibidores de TTBK1 se obtuvo también una buena correlación entre los valores de Pe experimental y bibliográfica de los controles; Pe (exp): 0.9103 (lit) – 0.5185 (R^2 : 0.9901); teniendo una alta probabilidad de paso aquellos con una $Pe > 3.12 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 30). Todos los compuestos ensayados se consideran SNC+ excepto el **T20** que se encuentra en el intervalo dudoso (SNC+/SNC-). Los compuestos **T27** y **T30** no fueron solubles en las condiciones del ensayo por lo que no se pudo determinar la probabilidad del paso de la BHE (Figura 31).

Compuesto	Pe Bibliográfica ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Pe Experimental ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)
Atenolol	0.8	0.5 ± 0.2
Desipramina	12	10.2 ± 1.1
Enoxacina	0.9	0.7 ± 0.2
Hidrocortisona	1.9	1.0 ± 0.1
Ofloxacina	0.8	0.5 ± 0.1
Piroxicam	2.5	0.5 ± 0.2
Promazina	8.8	7.3 ± 0.6
Testosterona	17	14.5 ± 0.9
Verapamilo	16	14.9 ± 0.1

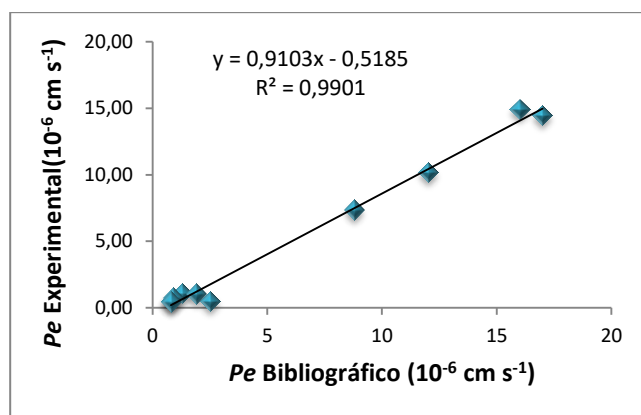


Figura 30. Correlación lineal del valor de Pe experimental y el descrito en la literatura¹⁹⁹ de los compuestos control en el ensayo de los inhibidores de TTBK1. Los resultados se muestran con su valor de desviación estándar.

El criterio de inclusión en este cribado farmacológico ha sido el mismo que en el caso de los inhibidores de CDC7, es decir, todos aquellos que presenten una alta probabilidad de atravesar la BHE (SNC+); **A22, T18-T19, T25-T26, T28-T29, T31-T34**. El compuesto **T20** se encuentra en el intervalo dudoso, sin embargo, también se ha incluido en la selección al ser uno de los inhibidores más potentes de esta familia de compuestos.

Compuesto	<i>Pe</i> Experimental ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	Predicción
AZ2	8.7 ± 0.9	SNC +
T18	3.9 ± 0.8	SNC +
T19	23.2 ± 2.4	SNC +
T20	2.5 ± 0.1	SNC+/ SNC-
T25	11.5 ± 1.0	SNC +
T26	6.9 ± 0.6	SNC +
T27	No soluble	
T28	4.7 ± 0.5	SNC +
T29	15.6 ± 2.3	SNC +
T30	No soluble	
T31	8.4 ± 2.6	SNC +
T32	11.8 ± 0.3	SNC +
T33	7.6 ± 1.4	SNC +
T34	6.8 ± 1.4	SNC +

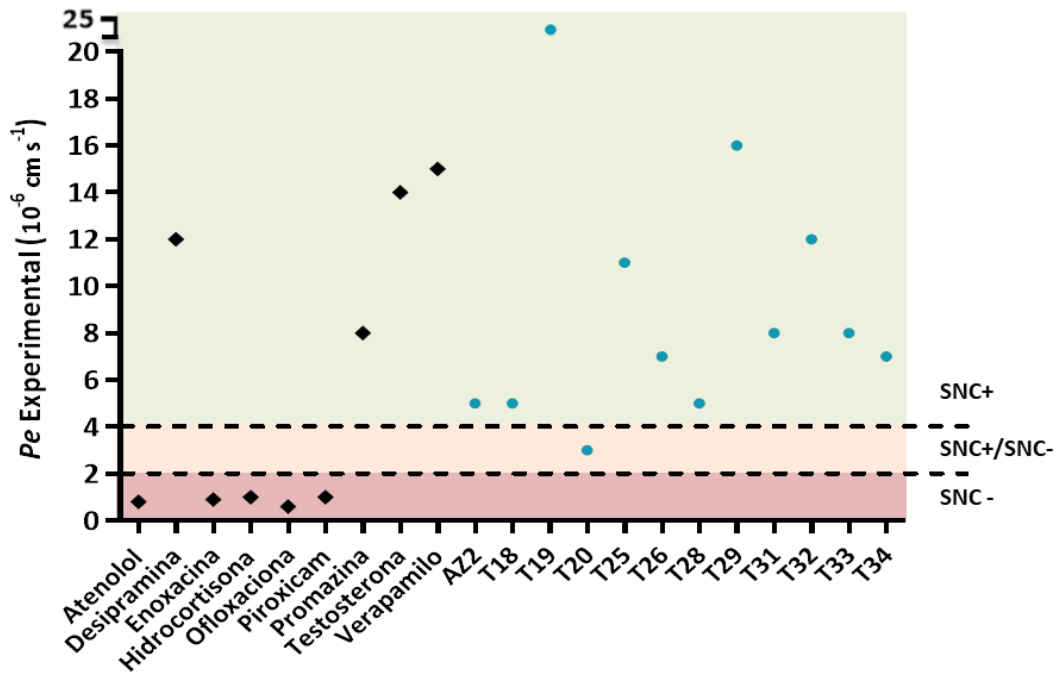


Figura 31. Tabla: permeabilidad efectiva experimental y predicción del paso de BHE de los inhibidores de TTBK1. Los resultados se muestran con su valor de desviación estándar. Gráfica: representación de la *Pe* experimental de todos los compuestos ensayados.

En resumen, todos los compuestos que tengan una elevada probabilidad de atravesar la BHE se consideran buenos candidatos a fármaco para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, por lo que se continúa con su desarrollo preclínico evaluando su potencial terapéutico en modelos celulares diseñados para el estudio de la ELA (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resumen de los compuestos seleccionados para evaluar su potencial terapéutico en los modelos celulares propuestos.

Inhibidores CDC7		Inhibidores TTBK1
C4	C24	A22
C5	C25	T18
C6	C27	T19
C7	C29	T20
C9	C35	T25
C10	C37	T26
C12	C39	T28
C16	C41	T29
C19	C43	T31
C20	C46	T32
C22	C48	T33
C23		T34

CAPÍTULO 2

Evaluación de la eficacia de los candidatos a fármaco en modelos celulares

2. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS CANDIDATOS A FÁRMACO EN MODELOS CELULARES

Una vez realizado un primer cribado en donde se han seleccionado aquellos compuestos que fuesen capaz de atravesar la BHE y llegar al órgano diana, se procede a evaluar el potencial farmacológico de los candidatos en diferentes ensayos celulares que modelizan la proteinopatía de TDP-43 y más concretamente la ELA.

En primer lugar, siguiendo la estrategia de genética química reversa, se evaluó la interacción del fármaco con su diana en un ensayo fenotípico. En este caso, el modelo establecido estudia el efecto neuroprotector de los compuestos frente a la muerte neuronal producida por un aumento en la fosforilación de TDP-43 inducida de manera exógena.

A continuación se procedió a la caracterización e inmortalización de linfocitos de pacientes de ELA con el fin de establecer un modelo que permita evaluar el potencial terapéutico de aquellos fármacos que han sido capaces de rescatar el fenotipo del modelo previamente descrito.

Por último, en este capítulo se evaluó el efecto inmunomodulador de algunos de los compuestos más prometedores en cultivos primarios de microglía murina estudiando la capacidad de reducir el efecto inflamatorio nocivo provocado por el lipopolisacárido de pared bacteriana conocido como LPS.

2.1. Modelo de neuroprotección frente a la hiperfosforilación de TDP-43

La validación de los inhibidores de quinasas como potenciales fármacos para la ELA y aquellas patologías que cursen con la proteinopatía de TDP-43, se ha llevado a cabo en un modelo celular utilizando la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. En dichas células, se evalúa la capacidad neuroprotectora de los compuestos frente a la hiperfosforilación de TDP-43. Esta es inducida de forma exógena mediante ácido etacrínico (AE), que provoca depleción del glutatión, seguido de un aumento del estrés oxidativo y en consecuencia la muerte celular.

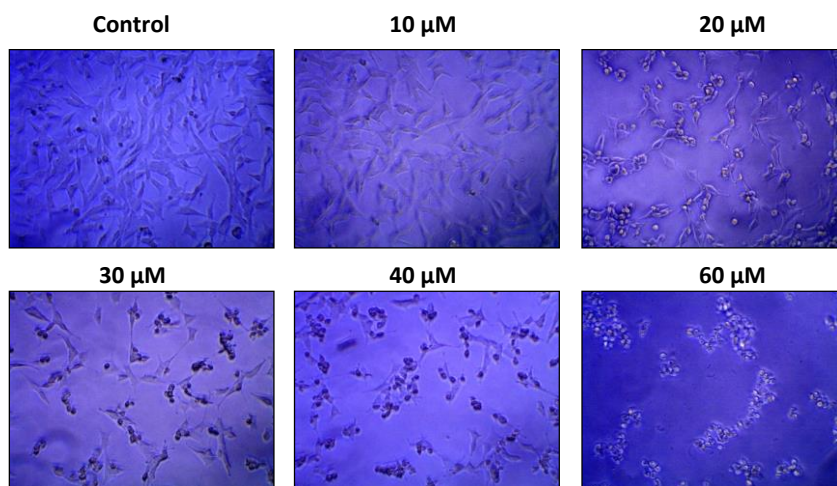
El glutatión se considera uno de los principales sistemas antioxidantes del SNC de los mamíferos. Las anomalías en el metabolismo de este tripéptido se han asociado con patologías neurológicas como la EA, EP y la EH entre otras, en donde el estrés oxidativo juega un papel importante en la degeneración neuronal. Para el estudio del mecanismo patológico de estas enfermedades existen diferentes modelos celulares, muy utilizados en investigación básica, basados en inducir estrés oxidativo a través de agentes como la butionina sulfoximina (BSO), 6-hidroxi dopamina o el ácido etacrínico. Estos agentes son capaces de conjugarse directamente con

el glutatión citosólico y mitocondrial produciendo una disminución en su concentración intracelular y en consecuencia un aumento en la concentración de nitritos, ROS y disfunción mitocondrial.^{213,214,215}

Diversos estudios en líneas neuronales y en cultivos primarios de neuronas corticales muestran como la exposición de las diferentes células al ácido etacrínico no solo produce estrés oxidativo, sino que además, induce las modificaciones patológicas que sufre TDP-43 descritas en los tejidos de pacientes con esta proteinopatía, como la fosforilación de las Ser403/404 y Ser409/410, la deslocalización nuclear y la fragmentación del extremo C-terminal.⁹⁶

Es por ello por lo que se ha puesto a punto en el laboratorio un modelo en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y en donde se evalúa el potencial neuroprotector de los compuestos frente a la hiperfosforilación de TDP-43 inducida por el AE. La toxicidad celular producida como consecuencia de la exposición de las células a este ácido es confirmada por una bajada en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales al verse disminuida la reducción del MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a formazán. Esto a su vez va acompañado de cambios en la morfología celular observándose un soma más redondeado con prolongaciones dendríticas más cortas (**Figura 32**).

Para la puesta a punto del ensayo se realizó en primer lugar una curva dosis respuesta con el fin determinar la concentración de AE a la cual se produce aproximadamente un 50% de la muerte celular. Para ello, una vez que las células están en confluencia se añaden concentraciones crecientes de AE (10-60 μM) y se evalúa la viabilidad celular 24 horas después mediante el ensayo de MTT descrito en materiales y métodos. La concentración elegida de AE para estudiar los diferentes candidatos a fármaco fue la de 20 μM puesto que produce en torno a un 50% de la muerte celular (**Figura 32**).



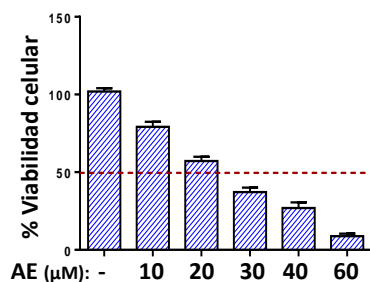


Figura 32. Imágenes representativas y curva dosis respuesta en la línea SH-SY5Y a concentraciones crecientes de AE (10-60 μM). La viabilidad fue evaluada mediante el ensayo del MTT. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

El siguiente paso, es la comprobación de la correlación entre la muerte celular observada y los niveles de TDP-43 fosforilada (pTDP-43) en las Ser409/410. Para ello se recogió el contenido proteico celular 24 horas después de haber inducido la fosforilación de la proteína endógena a la concentración establecida de AE (20 μM). Los niveles de pTDP-43 se detectaron mediante la técnica de Western blot (WB), con un anticuerpo específico para ese epítipo (**Figura 33**).

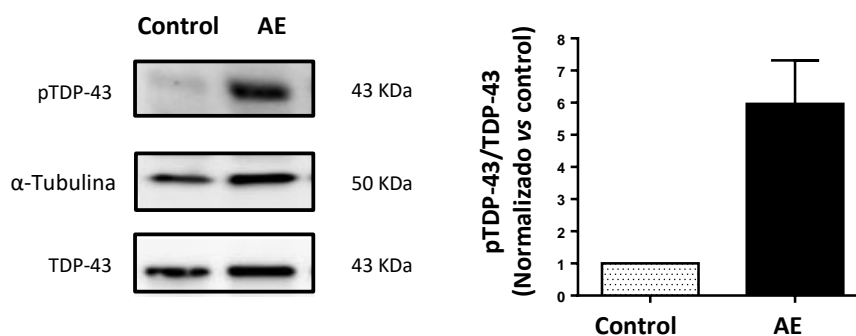


Figura 33. Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de TDP-43 fosforilada en las Ser409/410 (pTDP-43) en presencia o ausencia de AE (20 μM). Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

A continuación, con el fin de validar el modelo para el estudio de agentes farmacológicos, se realizó un primer análisis comparativo de eficacia entre dos inhibidores de quinasas caracterizados por presentar un desarrollo preclínico avanzado: **IGS 2.7**, inhibidor de CK-1 (δ y ϵ) cuyo efecto neuroprotector ha sido estudiado previamente en modelos de la proteinopatía de TDP-43;⁹⁷ y **Tideglusib**, inhibidor de GSK-3 β sin estudios previos en modelos de TDP-43 pero con un gran potencial neuroprotector validado en diferentes modelos de neurodegeneración tal y como se ha comentado en el capítulo anterior. El experimento se desarrolla en las mismas condiciones descritas a diferencia del tratamiento que se realiza con los compuestos de estudio

una hora antes de la exposición al AE. Los resultados mostraron una muerte celular del 50% con respecto al control tras el tratamiento con AE, que fue capaz de prevenir de forma significativa tanto IGS 2.7 como Tideglusib a la concentración establecida de 5 μM (**Figura 34**). Puesto que Tideglusib presenta en las tres réplicas del ensayo un efecto neuroprotector más potente, se establece como control interno de este modelo para el estudio posterior de los diferentes inhibidores de CDC7 y TTBK1.

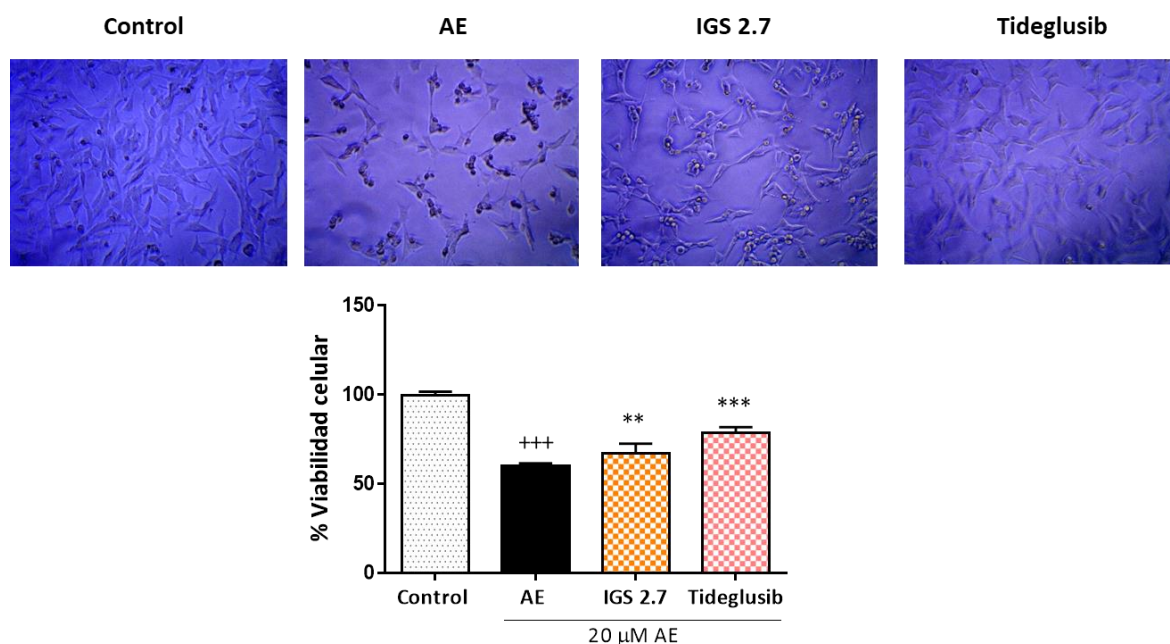


Figura 34. Viabilidad celular (MTT) en la línea SH-SY5Y después de exponer las células a una concentración de 20 μM de AE con previo tratamiento (1 hora antes) de los controles IGS 2.7 y Tideglusib a 5 μM . Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, con diferencias significativas frente a las células tratadas con AE y +++ $p < 0.001$ con respecto al control).

2.1.1. Estudio de los inhibidores de CDC7

Con el fin de determinar la dosis óptima de los compuestos para su estudio en los ensayos celulares de eficacia, se realizó en primer lugar un estudio de viabilidad celular en el que las células fueron tratadas con los candidatos propuestos a dos concentraciones distintas (5 y 10 μM) durante 24 horas. El porcentaje de células vivas con respecto al control sin tratamiento se evaluó mediante el ensayo de MTT. Ninguno de los compuestos evaluados resultó alterar la viabilidad celular de forma significativa a ninguna de las dos concentraciones estudiadas, por lo que la concentración establecida para los estudios *in vitro* fue de 10 μM (**Figura 35**).

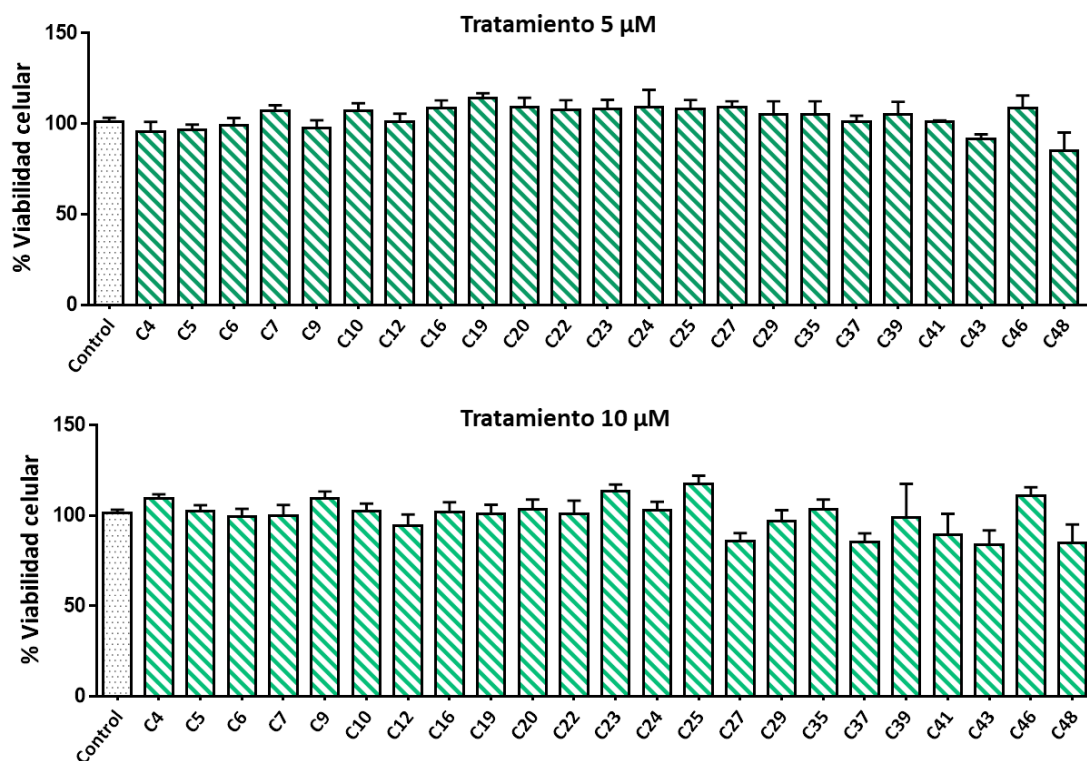


Figura 35. Viabilidad celular (MTT) en la línea SH-SY5Y en presencia o ausencia de los inhibidores de CDC7 a 5 y 10 μM. La gráfica representa la media ± SEM de 3 experimentos diferentes.

A continuación, se evaluó en el modelo establecido de AE la capacidad de los inhibidores de CDC7 de prevenir la hiperfosforilación de TDP-43. Con el objetivo de verificar si el resultado neuroprotector que se obtiene se debe a la inhibición de CDC7 se han probado los 23 compuestos seleccionados. El resultado obtenido 24 horas después de la exposición de las células al AE, mostró una muerte celular del 47% con respecto al control sin tratamiento (**Figura 36**). Tanto el control interno Tideglusib, como 9 de los compuestos evaluados, derivados **C4**, **C7**, **C10**, **C16**, **C19**, **C24**, **C25**, **C29** y **C48**, fueron capaces de prevenir de forma significativa esta muerte neuronal, mostrando un efecto neuroprotector frente al AE (**Figura 36**). En el caso de los inhibidores **C23**, **C27**, **C35**, **C37** y **C46** puede observarse una tendencia a la neuroprotección sin significancia estadística, mientras que para en el resto de los compuestos evaluados no se observa ningún efecto neuroprotector. Esto pudiera ser debido a las diferencias físico-químicas de las distintas moléculas y su influencia tanto en la interacción con las diferentes membranas biológicas como con el AE y los subproductos derivados del daño celular producido.

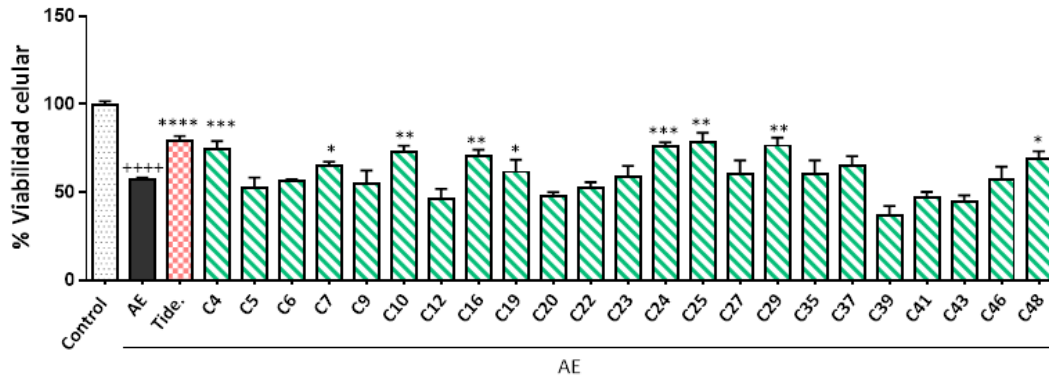


Figura 36. Viabilidad celular (MTT) en línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuestas a 20 μ M de AE en presencia o ausencia de los inhibidores de CDC7 (10 μ M). Como control interno se ha utilizado Tideglusib (5 μ M). Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 con diferencias significativas frente a las células tratadas con AE y **** p < 0.0001 con respecto al control).

Para verificar si el efecto preventivo de la muerte neuronal observada en los inhibidores de CDC7 se debe a una bajada de los niveles de pTDP-43 al inhibir la acción de la quinasa, se evaluó el estado de fosforilación de la proteína mediante WB utilizando el anticuerpo específico de pTDP-43 en las Ser409/410. Para ello, se llevó a cabo un nuevo experimento en las mismas condiciones anteriores utilizando placas de 6 pocillos.

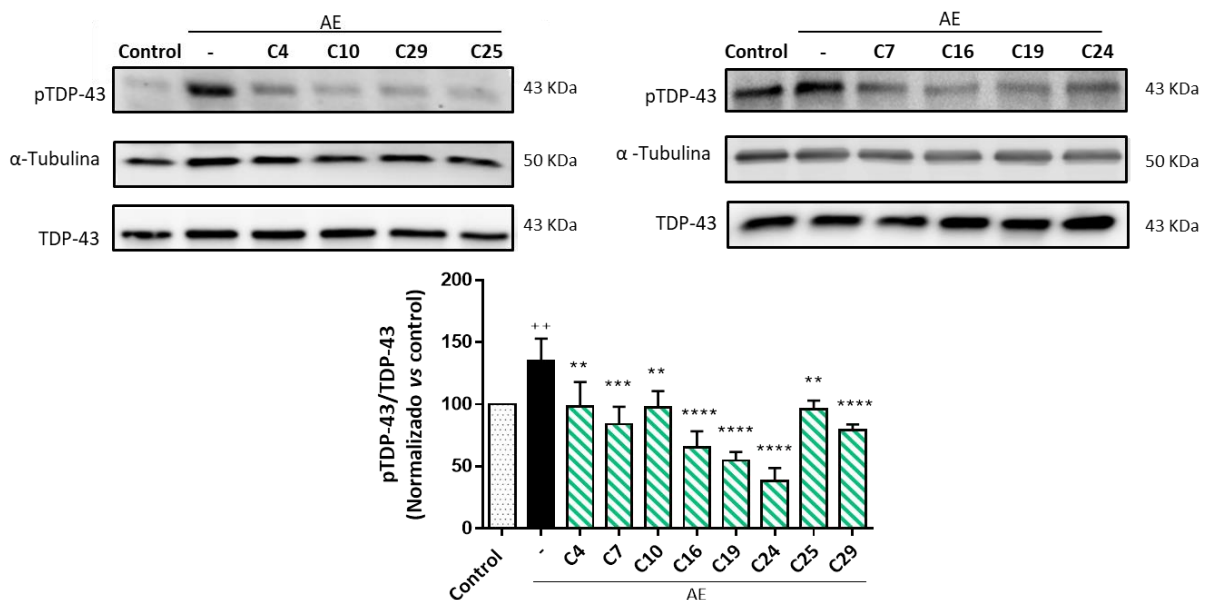


Figura 37. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de pTDP-43 en la línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuesta a 20 μ M de AE en presencia o ausencia de los inhibidores de CDC7 (10 μ M). Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 con diferencias significativas frente a las células tratadas con AE y ** p < 0.01 con respecto al control).

El resultado de este estudio mostró un claro aumento en la fosforilación de TDP-43 inducida por el ácido etacrínico con relación a las células control, que fue capaz de disminuir de forma significativa el tratamiento con los ocho inhibidores de CDC7 estudiados (**Figura 37**).

Como consecuencia de esta bajada en la fosforilación tóxica de TDP-43 cabría esperar que se reestableciera el transito núcleo-citosol propio del estado fisiológico observándose una disminución en la concentración citosólica de TDP-43 y un aumento en el núcleo.

Así, se analizó la localización subcelular de TDP-43 mediante técnicas inmunocitoquímicas en presencia del compuesto **C16**. El resultado obtenido fue un aumento de la concentración de TDP-43 en el citosol causada por la exposición de las células al AE, que fue capaz de reestablecer el tratamiento con el compuesto **C16** al recuperar la localización nuclear de la misma (**Figura 38**).

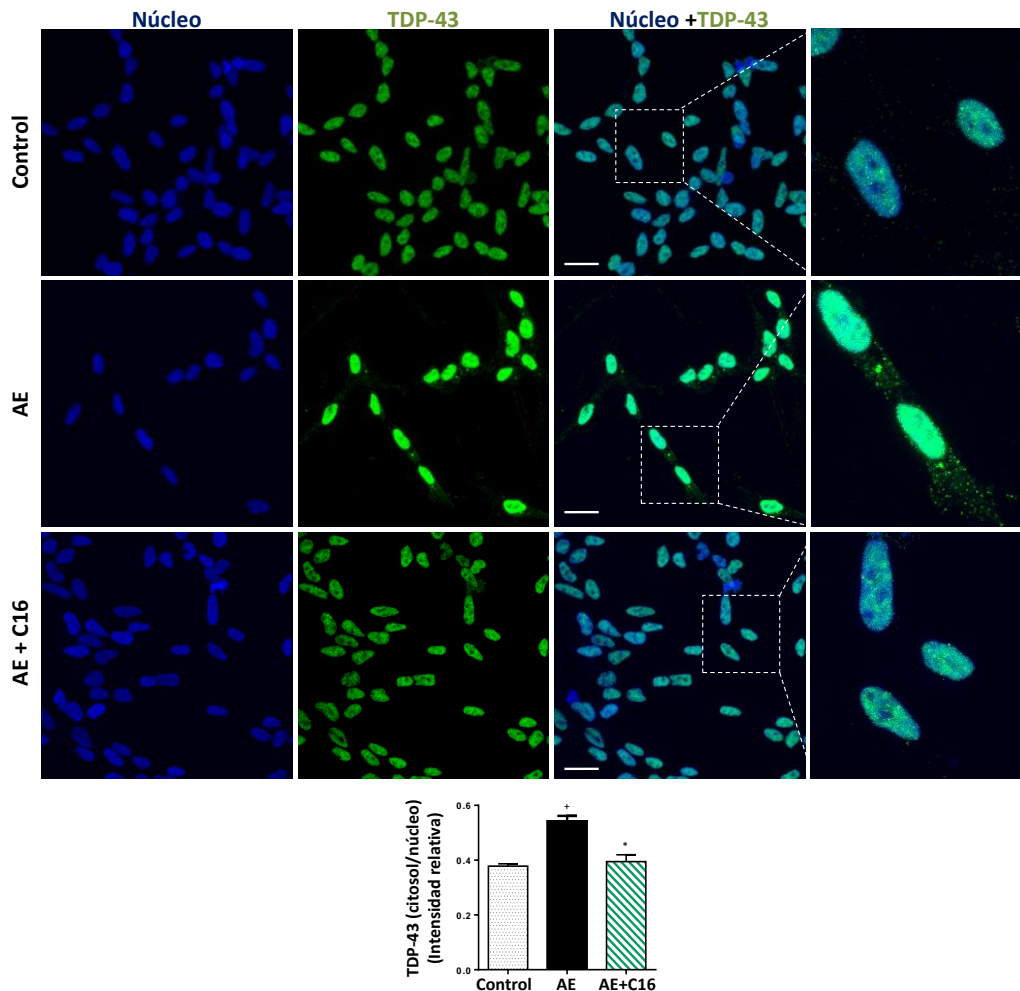


Figura 38. Cuantificación subcelular mediante técnicas inmunocitoquímicas de TDP-43 (verde) en la línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuesta a 20 μM de AE en presencia o ausencia de C16 (10 μM). HCS NuclearMask se utilizó como marcador nuclear. Barras de escala: 25 μm Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes (* $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo AE, $^{\dagger}p < 0.05$ frente al Control).

Estos resultados apuntan a que la inhibición de CDC7 podría ser una buena estrategia para reducir la fosforilación neurotóxica de TDP-43 y recuperar la homeostasis de la misma al quedar reestablecida su localización nuclear.^{216,217,218}

2.1.2. Estudio de los inhibidores de TTBK1

Siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito, se evaluaron inicialmente los inhibidores de TTBK1 preseleccionados a dos concentraciones de 5 y 10 μM con el fin de determinar la dosis óptima para su estudio en los ensayos celulares. En este caso, gran parte de estos derivados mostraron cierta toxicidad a la concentración de 10 μM , por lo que se eligió la concentración de 5 μM para los estudios de neuroprotección. El inhibidor **T29** quedó fuera del proceso al producir una muerte celular significativa a ambas concentraciones (**Figura 39**).

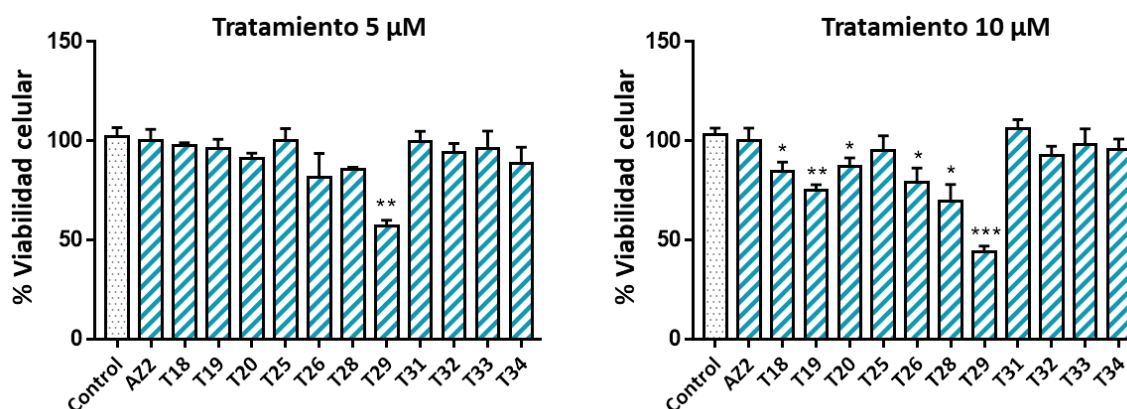


Figura 39. Viabilidad celular (MTT) en la línea SH-SY5Y en presencia o ausencia de los inhibidores de TTBK1 a 5 y 10 μM . Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ con diferencias significativas con respecto al control).

Los 11 candidatos seleccionados se evaluaron en el modelo de neuroprotección frente al AE a la concentración de 5 μM , obteniendo como resultado un efecto neuroprotector significativo tras el tratamiento con los derivados **AZ2**, **T25**, **T31** y **T32** (**Figura 40**). Estos compuestos fueron elegidos para evaluar su efecto en la posible disminución de pTDP-43.

Así, utilizando la metodología descrita anteriormente, se pudo establecer una correlación directa entre el efecto neuroprotector de los compuestos estudiados y la bajada de los niveles de pTDP-43. En el caso de los compuestos **T25** y **T31**, además del control del ensayo Tideglusib, esta disminución es estadísticamente significativa, mientras que para **AZ2** y **T32** se observa una ligera tendencia (**Figura 41**).

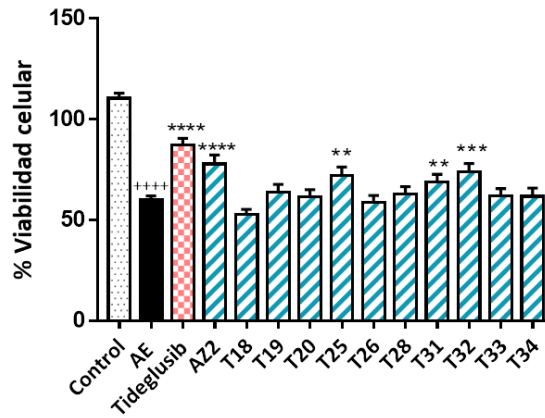


Figura 40. Efecto neuroprotector de los inhibidores de TTBK1. Viabilidad celular (MTT) en línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuestas a 20 μ M de AE en presencia o ausencia de los inhibidores de TTBK1 (5 μ M). Como control interno se ha utilizado Tideglusib (5 μ M). Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente a las células tratadas con AE y **** $p < 0.0001$ con respecto al control).

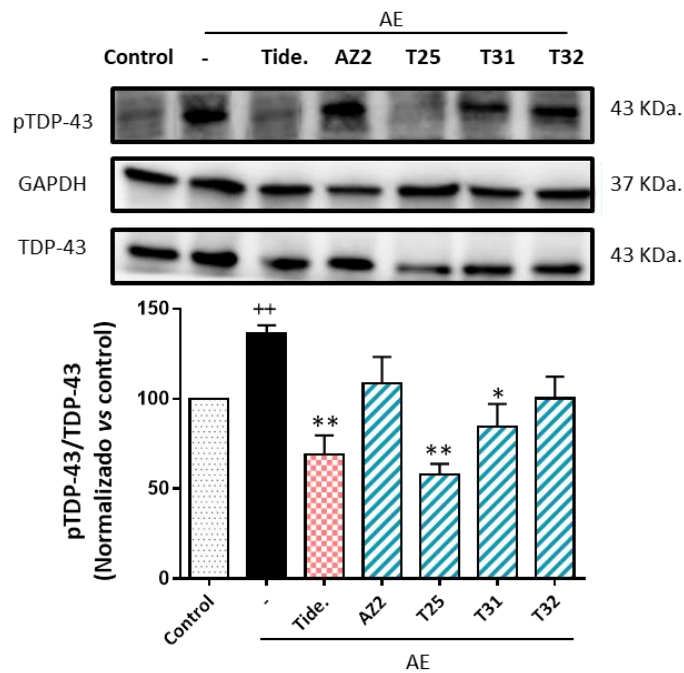


Figura 41. Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de pTDP-43 de la línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuestas a 20 μ M de AE en presencia o ausencia de los inhibidores de TTBK1 (5 μ M). Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente a las células tratadas con AE y ** $p < 0.01$ con respecto al control).

En conclusión de estos estudios, el efecto neuroprotector de los inhibidores de CDC7 y TTBK1 estudiados y reflejado en la protección de la supervivencia celular en este modelo fenotípico, se correlaciona directamente con una bajada de la fosforilación de TDP-43 inducida de forma exógena mediante el AE. Por tanto, el potencial farmacológico de estos compuestos merece ser confirmado en otros modelos celulares de la proteinopatía de TDP-43 y en concreto de la ELA.

2.2. Desarrollo de un modelo celular de ELA basado en muestras humanas

La falta de buenos modelos que recapitulen las características patológicas de la ELA es una de las principales limitaciones tanto para el estudio de los mecanismos patogénicos de la neurodegeneración como para la búsqueda de tratamientos efectivos para esta enfermedad.

La ELA a día de hoy se considera un trastorno multisistémico donde las características histopatológicas presentes en el SNC de los pacientes se han descrito también en células de tejidos periféricos como son los fibroblastos y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En concreto, se han observado alteraciones en los mecanismos antioxidantes como consecuencia de un aumento en la expresión de proteínas como Bcl-2 o SOD-1, un aumento en la nitración de proteínas,^{219,220} alteraciones en los niveles intracelulares de calcio²²¹ o de la quinasa GSK-3²⁰⁵ y disfunción glutamatérgica y mitocondrial.^{222,223,224} En relación a la proteinopatía de TDP-43 se han encontrado agregados de esta proteína en el citoplasma de fibroblastos de pacientes con ELAe y en linfocitos de pacientes que presentan mutaciones en el gen *TARDBP*.^{105,225}

Las anomalías en el metabolismo de las CMSP se han descrito también en enfermedades como la esclerosis múltiple (EM), la EH y en la EA, por lo que este tipo celular se considera un buen modelo para el estudio de estas enfermedades neurodegenerativas que tienen difícil acceso al SNC.^{226,227,228}

Dada la importancia que ha adquirido el estudio de las células periféricas en las enfermedades del SNC, el grupo de investigación ha desarrollado durante la última década una línea centrada en el estudio de los mecanismos patológicos y la búsqueda de biomarcadores en las CMSP de pacientes con alteraciones neurológicas como la EA, y trastornos asociados a la patología de TDP-43. Concretamente se ha observado un aumento de la proliferación celular así como alteraciones en la expresión de proteínas como la calmodulina en CMSP de pacientes con EA.^{229,230} En relación a la proteinopatía de TDP-43, se ha descrito la presencia de agregados citosólicos de TDP-43 y un aumento de la proliferación celular asociado a la vía CDK6/pRb en las CMSP de pacientes con DFT-TDP con déficit de progranulina.^{231,232} Estos modelos se han utilizado como base de estudio para la evaluación del potencial terapéutico de posibles candidatos a fármacos.^{233,97} En el caso de los linfocitos de individuos con DFT-TDP, la actividad proliferativa, la acumulación citoplasmática y el grado de fosforilación de TDP-43 se vio disminuida en presencia de los inhibidores de CK-1, cuyo desarrollo preclínico en los diferentes modelos de ELA se ha desarrollado en el presente trabajo (**IGS 2.7** e **IGS 3.27**).⁹⁷

A partir de todo este conocimiento previo y con el fin de proporcionar un modelo humano de ELA (tanto genético como esporádico) donde poder estudiar la patogenia molecular y la respuesta de los diferentes fármacos en estudio, se procedió a la recogida de muestras de sangre de pacientes de ELAe y ELAf así como de individuos asintomáticos, para poder utilizarlos como controles. Estas muestras de pacientes y voluntarios sanos fueron obtenidas en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid y en el Hospital Universitario Donostia de San Sebastián, tras la información adecuada a los pacientes, firma del consentimiento informado (**Anexo 1**) y registro confidencial de los datos.

Una vez en el laboratorio, y con el fin de establecer líneas linfoblásticas inmortalizadas, se procedió inicialmente al aislamiento de las CMSP a partir de las muestras de sangre recibidas utilizando un protocolo basado en la diferencia de densidad que existe entre las diferentes poblaciones celulares (células polimorfonucleares, eritrocitos y CMSP) por medio de un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque. Posteriormente, los linfocitos se inmortalizaron por infección con el virus Epstein-Barr (según el protocolo detallado en materiales y métodos) obteniéndose los primeros clones linfoblásticos al cabo de 3-4 semanas. De esta forma, al día de hoy, hemos creado un biobanco con más de cincuenta líneas de linfoblastos inmortalizados de pacientes de ELA esporádicos y familiares con mutaciones en *SOD-1*, *C9orf71*, *TBK1*, *TARDBP* y *TUBA4A*, así como de un gran número de individuos control.

En el presente trabajo se han caracterizado líneas linfoblásticas de un total de 18 individuos, de los cuales 6 son pacientes con ELAe, 4 de ELAf con mutaciones en *SOD-1* (ELAf-*SOD1*) y 8 son controles asintomáticos de edad similar a los individuos de estudio (**Tabla S1**). Los casos de ELAe han sido analizados genéticamente y no han presentado ninguna mutación asociada al riesgo de padecer la enfermedad.

2.2.1. Caracterización de las líneas de linfocitos de pacientes con ELA esporádica

Una vez establecidas las líneas linfoblásticas se ha procedido al análisis individual de cada una de ellas con el objetivo de desarrollar un nuevo modelo celular de estudio de la enfermedad y a su vez poder diseñar un tratamiento personalizado en función de las características patológicas que presente cada individuo. En el caso de los ELAe, y con el fin de intentar encontrar una correlación entre estas células y las anomalías patológicas más frecuentes descritas en las motoneuronas de los pacientes, se analizaron las modificaciones que sufre TDP-43 asociadas a la

neurodegeneración como es la hiperfosforilación en las Ser409/410, la escisión de los fragmentos del extremo C-terminal, la deslocalización y acumulación citoplasmática.

En primer lugar se analizó el estado de fosforilación de TDP-43, tanto de la proteína completa como de los fragmentos patológicos de menor peso molecular mediante la técnica de WB con el anticuerpo específico de TDP-43 fosforilada en las Ser409/410 (**Figura 42**). Se utilizaron seis muestras diferentes procedentes de pacientes con ELAe y ocho muestras de voluntarios sanos.

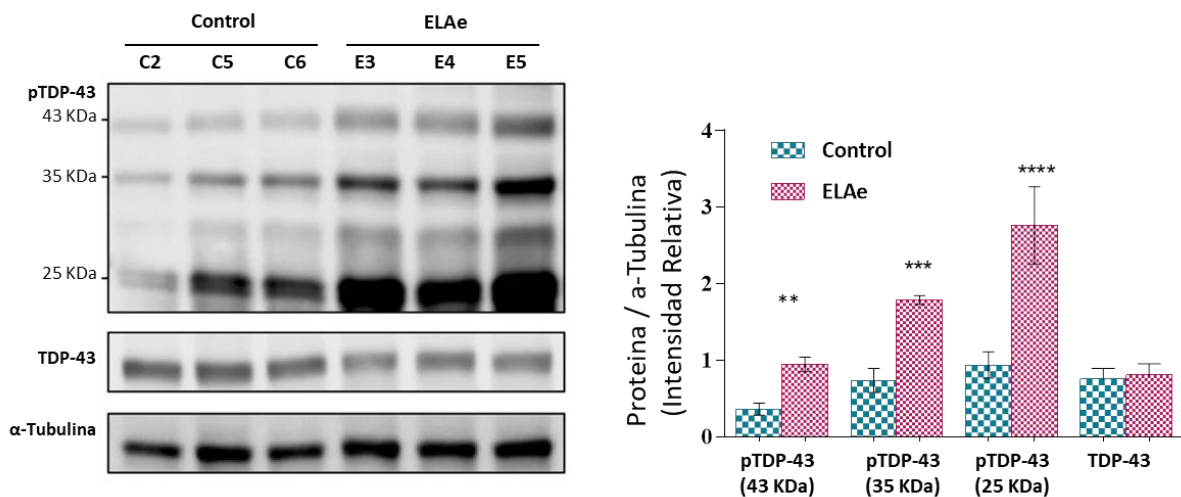


Figura 42. Inmunoblot representativo de los niveles de pTDP-43 en su forma completa y fragmentada (25 y 35 KDa) y de los niveles de TDP-43 total en linfoblastos de 3 pacientes con ELAe y 3 controles. Los datos representan la media \pm SEM de los 8 controles y los 6 ELAe analizados. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo control).

Como se observa en la **Figura 42**, hay un aumento significativo en los niveles de fosforilación de TDP-43 tanto en su forma completa (43 KDa) como fragmentada (25 y 35 KDa) en los pacientes con ELAe en comparación a los individuos sanos, sin apreciarse diferencias significativas en la concentración celular de TDP-43 entre ambos grupos de individuos. En este último caso se utilizó un anticuerpo específico del extremo N-terminal que detecta la proteína completa.

Por último, se estudió la localización subcelular de TDP-43 en estas muestras. Para ello se utilizó un protocolo de fraccionamiento celular en el que se separan las proteínas que se encuentran en el citosol de las nucleares. Posteriormente, y por técnicas de WB, se evaluó la presencia o no de TDP-43 en estos dos compartimentos celulares. Tras el análisis se observó que, en el caso de los individuos sanos, TDP-43 se localiza mayoritariamente en el núcleo, sin embargo, en los pacientes de ELAe se produce un desequilibrio en el tránsito núcleo-citosol encontrándose

mayores niveles de TDP-43 en la fracción citosólica (**Figura 43a**). Estos resultados se comprobaron con técnicas inmunocitoquímicas, observándose resultados similares al analizar la localización celular de TDP-43 utilizando los mismos anticuerpos y microscopia confocal (**Figura 43b**).

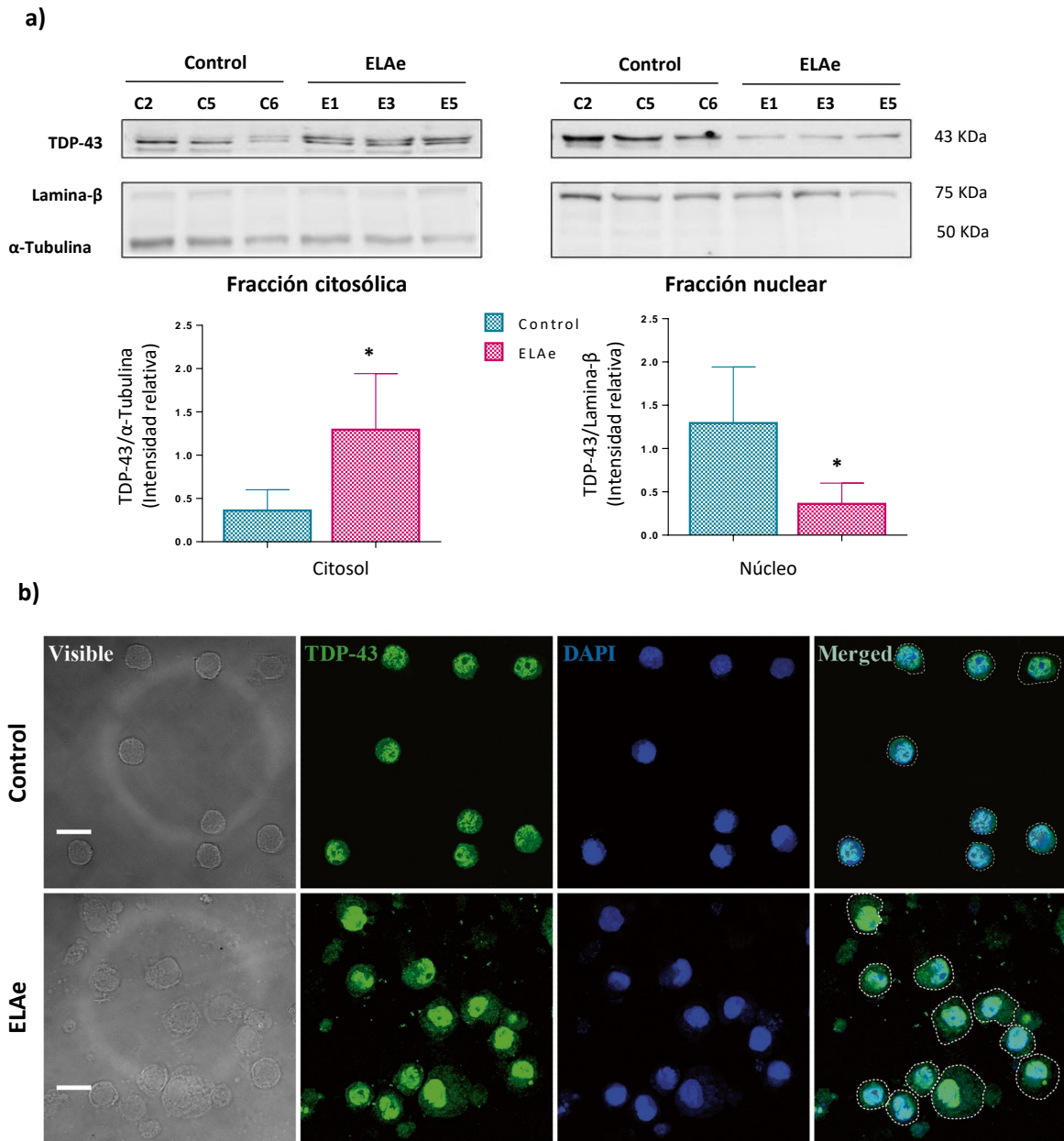


Figura 43. a) Inmunoblot representativo de la localización subcelular de TDP-43 en los linfoblastos de 3 individuos control y 3 ELAe. Como control de carga se ha utilizado Lamina-β para la fracción nuclear y α-Tubulina para la fracción citosólica. b) Análisis mediante inmunofluorescencia de la localización subcelular de TDP-43 (verde) en linfoblastos de 3 ELAe y 3 controles. DAPI se utilizó como marcador nuclear (azul). Barras de escala: 15 μm. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo control).

En conclusión, los linfocitos inmortalizados de los pacientes con ELAe se consideran un buen modelo para el estudio de la patología de TDP-43 puesto que recapitulan los aspectos patológicos observados en las motoneuronas de los pacientes. Entre ellas destacan las modificaciones post-traduccionales de TDP-43 como la fragmentación y la hiperfosforilación, así como un desequilibrio en la localización celular de la misma acumulándose mayoritariamente en el citoplasma.¹⁰⁴

El hecho de que TDP-43 esté hiperfosforilada puede ser consecuencia de un aumento de la expresión o de la actividad de las quinasas que median su fosforilación. Indicio de ello es el aumento en la expresión y/o actividad de GSK-3 β , CK-1 δ o TTBK1 descritas en medula espinal y corteza cerebral de pacientes con ELA y DFT así como la co-localización de CDC7 y TTBK1 con agregados de TDP-43 en el SNC de pacientes con esta proteinopatía.^{234,80,182,183,197}

Con el objetivo de seguir caracterizando el modelo de linfoblastos de pacientes, se procedió al estudio de la expresión de las quinasas que median la fosforilación de TDP-43 (CK-1, CDC7, TTBK1 y GSK-3 β) mediante la técnica de WB con anticuerpos específicos de cada proteína quinasa. En el caso de GSK-3 β se ha podido evaluar también el grado de actividad de la enzima que viene determinada por el estado de fosforilación de ciertos aminoácidos, estando hiperactiva cuando está fosforilada en la tirosina 216 (Tyr216) e inactiva cuando está fosforilada en la serina 9 (Ser9). Para ello se utilizaron tres muestras correspondientes a sujetos controles y seis pertenecientes a ELAe.

Comenzando con la expresión de CK-1 δ , se observó una bajada en la expresión de esta quinasa que es estadísticamente significativa al compararla con los controles (**Figura 44a**). No obstante, cabe destacar la variabilidad intrínseca del modelo debido a la variabilidad individual de cada paciente. Así, el individuo E1 presenta mayores niveles de expresión de CK-1 δ en comparación al grupo control.

En el caso de la expresión de CDC7, existe controversia en cuanto a los resultados puesto que 3 de los pacientes presentan una mayor expresión de esta quinasa (E4, E5 y E6), que los otros tres restantes (E1, E2 y E3). Este último grupo tiene menores niveles de CDC7 con respecto al grupo control (**Figura 44b**).

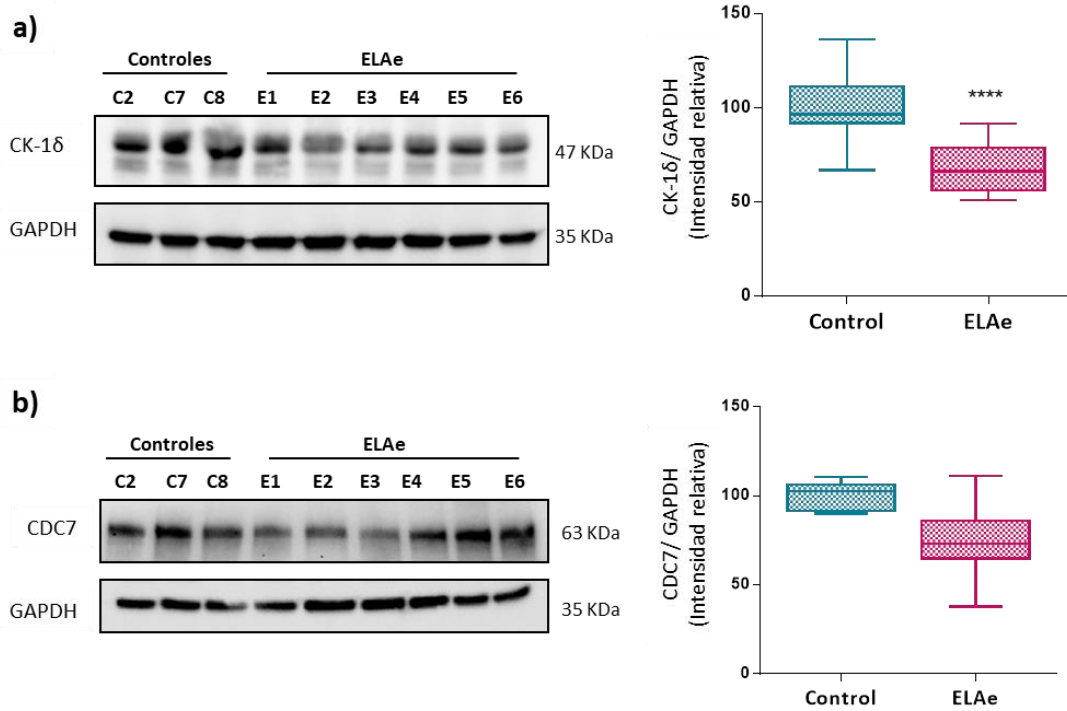


Figura 44. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de expresión de (a) CK-16 y (b) CDC7 en linfoblastos de los 6 pacientes con ELAe y 3 controles. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (**** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo control).

El aumento de la expresión de CK-1 en tejidos de médula espinal de pacientes con ELAe²³⁴ y la co-localización de CDC7 con agregados de TDP-43 en la corteza frontal de pacientes que sufren esta proteinopatía,⁸⁰ sería contrario a lo encontrado en los linfocitos de aquellos individuos donde se observa una disminución en la expresión de estas proteínas. No obstante, cabe destacar que el momento de extracción de la muestra varía en función del paciente y que probablemente en ninguno de estos casos se corresponda con la fase más severa de la enfermedad a la que pertenece el tejido *post mortem* analizado. Todo ello podría apuntar a que en etapas tempranas de la enfermedad, se está produciendo una regulación a la baja de aquellas proteínas implicadas en la fosforilación patológica de TDP-43 como mecanismo de defensa celular, ya que se trata de una proteína cuya homeostasis debe estar estrechamente controlada al regular más de 600 ARNm.⁵² Sin embargo, a medida que avanza la enfermedad el daño irreversible generado por la sinergia de diversos procesos celulares impide que esos mecanismos de defensa sean eficaces y por lo tanto se produzca un aumento en la expresión tal y como se observa en los tejidos *post mortem*.^{234,80}

Con el objetivo de poder validar este modelo para el estudio del potencial farmacológico de los inhibidores de TTBK1, se decidió evaluar la posible expresión de la misma en los linfocitos inmortalizados de los individuos de estudio, aun siendo un quinasa cuya expresión solo se ha descrito en el SNC.¹⁹⁶ Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal específico del epítipo localizado entre los aminoácidos 429-459 de TTBK1 humana. Como resultado se obtuvo una banda entre los marcadores de peso molecular de 150 y 250 KDa en todos los individuos estudiados (controles y pacientes) que corresponde al peso molecular de TTBK1 detectada mediante WB (230 KDa) (**Figura 45**). Si bien su peso molecular es de 142.7 KDa, en una electroforesis la proteína completa migra hasta los 230 KDa como consecuencia del alto contenido de aminoácidos con carga negativa en su estructura.¹⁹⁶ Ante estos resultados, queda demostrada por primera vez la expresión de TTBK1 fuera del SNC, concretamente en las CMSP de humanos.

En relación al grado de expresión de esta quinasa, no se apreciaron diferencias significativas entre las muestras de los 6 pacientes de ELAe y los 3 controles estudiados (**Figura 45**). No obstante, no hay que descartar que no esté involucrada en la hiperfosforilación patológica de TDP-43 observada en los linfoblastos analizados puesto que, aunque no está alterada la expresión, podría estar alterada su actividad.

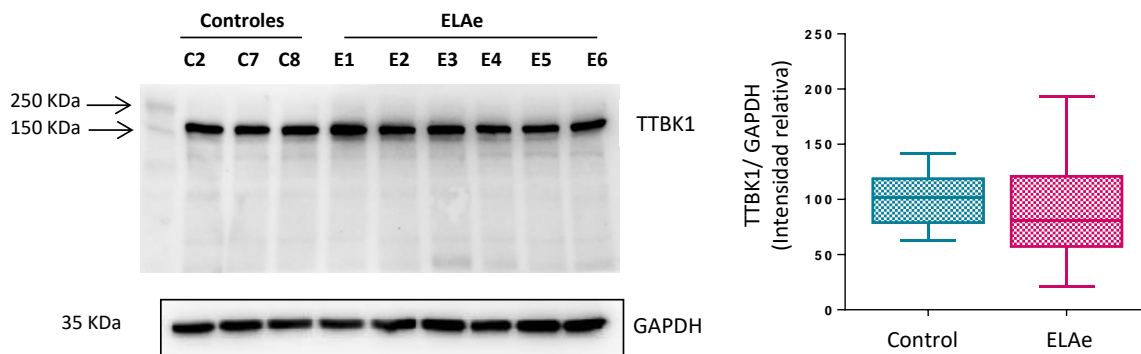


Figura 45. Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de expresión de TTBK1 en linfoblastos de 6 pacientes con ELAe y 3 controles. En la membrana la única banda que se observa (entre los marcadores de peso molecular 150-250 KDa.) corresponde a TTBK1. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

El patrón de expresión observado en GSK-3 β es similar al descrito en TTBK1, es decir, no se aprecian diferencias significativas entre los 3 controles y los 6 pacientes estudiados (**Figura 46a**). Sin embargo, a diferencia de TTBK1, se pudo evaluar el grado de actividad de la enzima mediante anticuerpos específicos que detectan la proteína hiperactiva (GSK-3 β -pTyr216) y la inactiva (GSK-

3 β -pSer9). El resultado obtenido muestra una hiperactividad de la quinasa reflejado en el aumento significativo de la forma hiperactiva GSK-3 β -pTyr216 con respecto a los controles estudiados (**Figura 46b**). Este hecho se correlaciona con lo previamente descrito en muestras de medula espinal, corteza cerebral y líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELAe caracterizadas por presentar un aumento anómalo de la actividad de GSK-3 β .^{182 183,205}

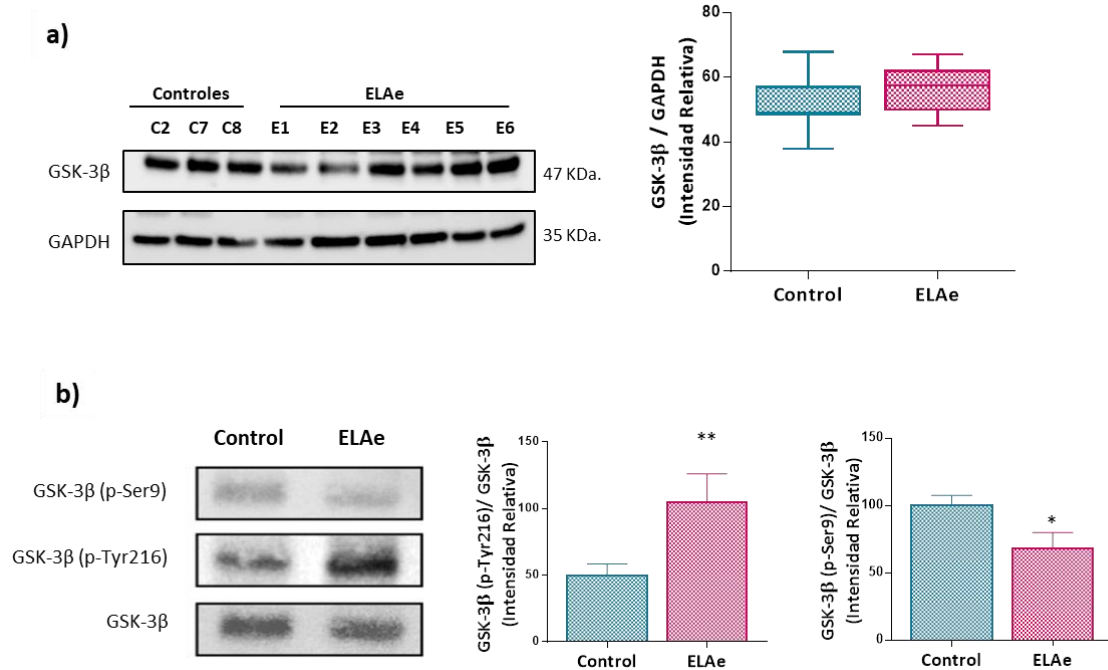


Figura 46. Inmunoblots representativos y cuantificación de (a) los niveles de expresión y (b) grado de actividad de GSK-3 β en linfoblastos de los 6 pacientes con ELAe y 3 controles sanos, utilizando el anticuerpo GSK-3 β -pSer9 para detectar la forma inactiva y GSK-3 β -pTyr216 para la forma hiperactiva. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* p < 0.05; ** p < 0.01 con diferencias significativas frente al grupo control).

En líneas generales y como resumen de este análisis de quinastas, el hecho de que estemos tratando con muestras humanas implica que haya mucha variabilidad entre individuos, ya que la fase de la enfermedad en la que se encuentra cada individuo en el momento de la extracción de la muestra puede variar. Además, los sujetos control que se consideran sanos, están exentos de patología ELA pero no se conoce si tuvieran otros procesos patológicos en el momento de la extracción. A pesar de todo, se han encontrado tendencias en la expresión de quinastas como CDC7 y CK-1 δ , en las que se ve una tendencia a la baja, siendo en el caso de CK-1 δ significativa. En relación a TTBK1 no se aprecian diferencias en la expresión al igual que en GSK-3 β , sin embargo, en este último caso se observa un aumento en la forma hiperactiva de esta proteína que se corresponde con lo descrito en la bibliografía. De todos los casos estudiados hay algunos individuos que, contrarios a la tendencia del conjunto del grupo, presentan mayor expresión de

alguna quinasa como es el caso del individuo E1 para CK-1δ y de los pacientes E4, E5 y E6 para CDC7.

2.2.2. Caracterización de los linfocitos de pacientes con ELA familiar (SOD-1)

Las muestras de pacientes con ELA que presentan alteraciones en el gen que codifica para la proteína antioxidante SOD-1 se engloban dentro del 20% de los casos de ELAf. Este grupo de pacientes junto con los que tienen mutaciones en FUS, corresponden al pequeño porcentaje de individuos que no presentan la patología de TDP-43, por lo que no se van a analizar los marcadores propios de esta proteinopatía.^{235,236}

A día de hoy el mecanismo por el cual la alteración genética en SOD-1 desencadena la enfermedad se desconoce, no obstante se sabe que no está estrictamente ligada a su actividad antioxidante puesto que los modelos animales que sobreexpresan la proteína desarrollan el fenotipo motor característico a diferencia de aquellos en los el gen que se ha silenciado, que no llegan a presentar síntomas motores, por lo que todo apunta a que se está produciendo una ganancia de función tóxica de la proteína. Una de las hipótesis propuestas es el reconocimiento por parte de SOD-1 mutada (SOD-1m) de nuevos sustratos como peroxinitratos o peróxido de hidrógeno catalizando reacciones de nitración de tirosinas así como la producción de radicales hidroxilo que resultan dañinos para el ADN, las proteínas y lípidos que conforman las membranas.²³⁷ Esta actividad anómala de SOD-1 puede estar produciendo alteraciones en la expresión y actividad de múltiples proteínas entre ellas las quinasas, afectando de esta forma a vías de señalización implicadas en procesos tan importantes como es el de la supervivencia celular (Figura 47).²³⁸

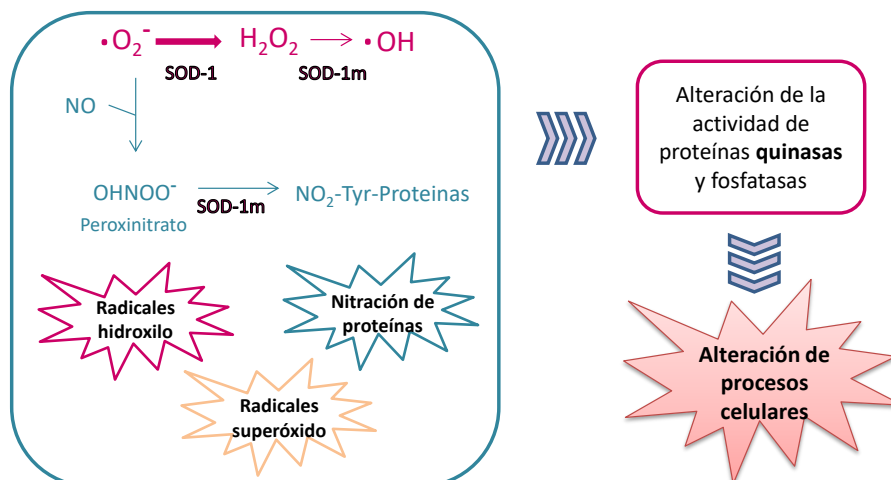


Figura 47. Esquema de un posible mecanismo patológico de la mutación en SOD-1.

Un estudio basado en el análisis de la actividad y expresión de 78 quinasas, 24 fosfatasa y 31 fosfoproteínas en ratones que presentan la mutación G93A en SOD-1, describe no solo las fluctuaciones que existe a nivel de expresión entre los ratones transgénicos y los ratones sanos sino que además, realiza un análisis comparativo entre la expresión proteica en el transgénico y lo descrito en muestras de tejidos de pacientes con ELAe, llegando a la conclusión de que la mutación en SOD-1 está produciendo alteraciones en la actividad y expresión de diversas quinasas y fosfatasa que por el contrario no están alteradas o se ven afectadas de diferente forma en los tejidos de pacientes con ELAe.²³⁹

En primer lugar describen un aumento del 157% en la expresión de CK-1δ en la médula espinal del transgénico SOD-1^{G93A} en comparación a los ratones no afectados.²³⁹ Este hecho se decidió estudiar en los linfocitos inmortalizados de nuestro biobanco. Para ello se utilizaron las muestras de los 4 pacientes que presentan mutaciones en SOD-1 y un número igual de individuos control. Cuantificando por WB la presencia de CK-1δ, se vio un aumento significativo de los niveles de esta proteína en ELAf-SOD1 en comparación al grupo control (**Figura 48**).

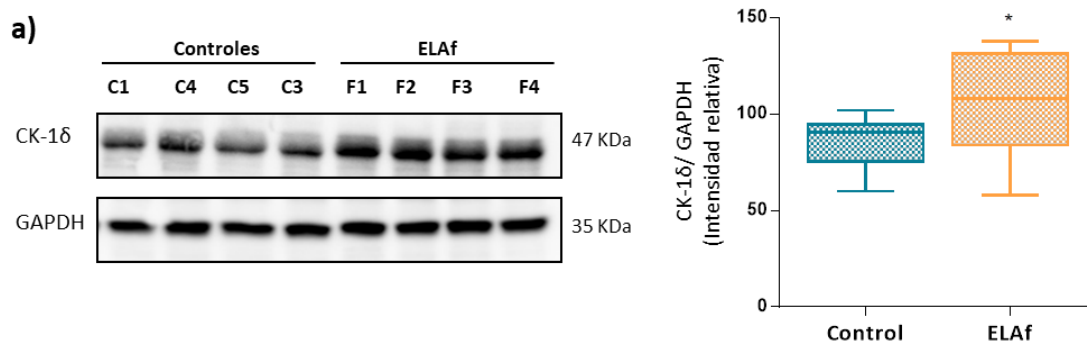


Figura 48. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de expresión de CK-1δ en linfoblastos de 4 pacientes con ELAf-SOD1 y 4 controles. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo control).

En relación a GSK-3β, los resultados descritos en la bibliografía en lo referente a los modelos de SOD-1 son contradictorios. Hay publicaciones en las que no se detectan alteraciones en la expresión ni en la actividad de GSK-3β mientras que en otras, el tratamiento con inhibidores de esta quinasa mejoran la viabilidad celular, y en los animales de SOD-1^{G93A}, no solo retrasan la aparición de los síntomas sino que además alargan la supervivencia de los mismos.^{239,184,185} En concreto, en un estudio realizado en 2007 por Koh *et al.*, el aumento de la actividad de GSK-3β observada en los lisados de la médula espinal de los ratones transgénicos SOD-1^{G93A}, se ve

reducida en los animales tratados con un inhibidor de GSK-3 β en una manera dosis dependiente.¹⁸⁷

Utilizando las muestras de ELAf-SOD1 de nuestro biobanco, se estudió por WB la expresión de GSK-3 β , viendo que en los linfocitos de pacientes con ELAf-SOD1 tampoco se aprecian alteraciones a nivel de expresión de GSK-3 β (**Figura 49a**), ahora bien, sí existe una clara inhibición en la actividad enzimática al haber un aumento significativo en los niveles de GSK-3 β -pSer9 (**Figura 49b**).

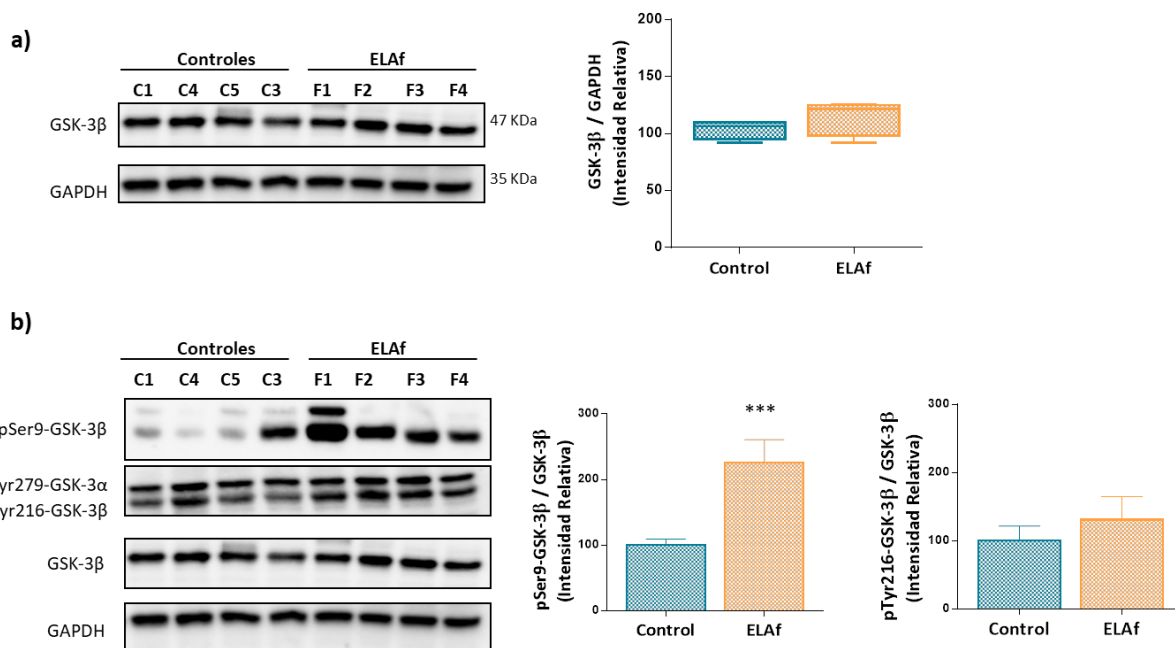


Figura 49. Inmunoblots representativos y cuantificación de (a) los niveles de expresión y (b) grado de actividad de GSK-3 β en los linfoblastos de 4 pacientes de ELAf-SOD1 y 4 controles utilizando el anticuerpo GSK-3 β -pSer9 para detectar la forma inactiva y GSK-3 β -pTyr216 para la forma hiperactiva. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes (***) $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo control).

Ante esta diversidad de datos se plantea la hipótesis de que la actividad de GSK-3 β en los individuos ELAf-SOD1 varía a lo largo del trascurso de la enfermedad. En etapas tempranas se puede decir que existe una inhibición significativa de la actividad de GSK-3 β a modo de mecanismo compensatorio que trata de neuroproteger frente al daño causado por la mutación en SOD-1. Este hecho se observa en las muestras de linfocitos inmortalizados de los pacientes, extraídas probablemente en fases tempranas y en el estudio del ratón transgénico SOD-1^{G93A} cuyas muestras son extraídas en una fase moderada-severa de la enfermedad.²³⁹ Por el contrario, a medida que avanza la enfermedad, estos mecanismos compensatorios no son suficientes para contrarrestar el daño generado y se produce un aumento de la actividad de GSK-3 β observada en

los modelos publicados de ELAf-SOD1 cuyas muestras *post mortem* corresponden a la fase severa de la enfermedad.^{187,184} En estos últimos casos, el tratamiento con inhibidores de GSK-3 β no solo retrasan la aparición de los síntomas sino que además prolongan la supervivencia de los animales restaurando factores relacionados con la supervivencia (HSTF-1), con la muerte celular (Citocromo-c, caspasa-3) y con la inflamación (Cox-2, Iba-1, ICAM-2).

Por último, en lo referente a la expresión de CDC7 y TTBK1 en las muestras de pacientes de ELAf-SOD1, se observa un patrón de expresión parecido al descrito en los ELAe, es decir, en el caso de TTBK1 no se aprecian cambios entre ambos grupos de individuos (**Figura 50b**), y en el caso CDC7 se observa una disminución en la expresión de la quinasa siendo en este caso estadísticamente significativa (**Figura 50a**). Debido a la reciente implicación de estas quinasas en la ELA, no hay nada descrito todavía sobre su expresión y actividad en modelos celulares ni animales, ni tampoco en muestras de pacientes de ELA con mutaciones en SOD-1 por lo que estos hallazgos quedan pendientes de confirmaciones futuras, pudiendo ser una posible explicación a la bajada en los niveles de CDC7, la alteración por alguna proteína que esté implicada de forma directa o indirecta en su regulación como consecuencia de la mutación en SOD-1.

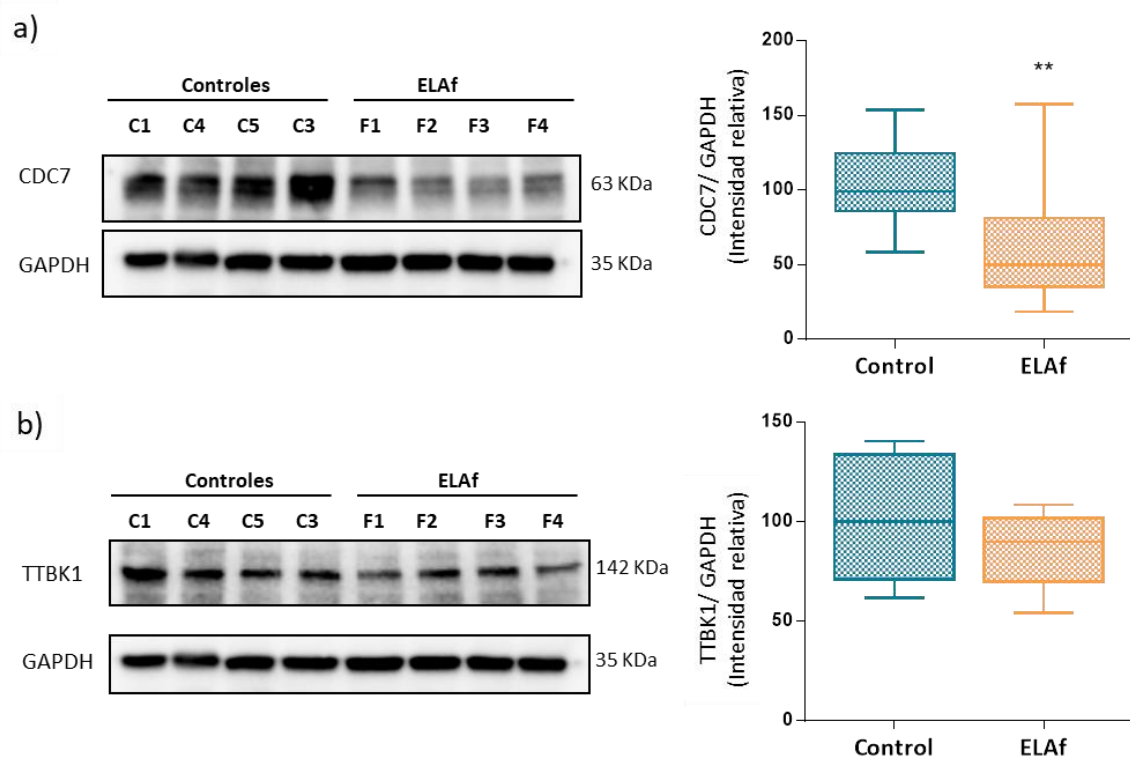


Figura 50. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de expresión de (a) CDC7 y (b) TTBK1 en linfoblastos de los 4 pacientes con ELAf-SOD1 y 4 controles. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo control).

Ante estos resultados cabe resaltar la homogeneidad que existe en líneas generales en esta cohorte de pacientes, puesto que, aun presentando diferentes mutaciones en SOD-1 (**Tabla S1**), el comportamiento en el patrón de expresión de las proteínas quinasas de estudio es muy similar.

En conclusión, existen diferencias en la expresión y actividad de las quinasas estudiadas en los linfocitos de pacientes con ELAe y ELAf, demostrando una vez más que son dos grupos de pacientes de ELA con características moleculares muy diferentes y por tanto con posibilidad de tratamientos también distintos. Lo más destacado es el aumento de CK-1 δ y la inhibición de la actividad de GSK-3 β en los individuos con ELAf-SOD1 en comparación a los ELAe en donde ocurre lo contrario.

Estas diferencias podrían ser explicadas considerando diferentes razonamientos. En primer lugar el factor o factores que desencadenan la enfermedad difieren entre ambos grupos de pacientes. En un caso se produce como consecuencia de la mutación en SOD-1 y en el otro se produce de forma esporádica, es decir, no hay ninguna mutación aparente que este asociada a la patogénesis de la enfermedad. Por lo tanto, la mutación en SOD-1 está produciendo alteraciones en determinadas vías de señalización celular y en consecuencia en la actividad y expresión de ciertas proteínas entre ellas las quinasas, que no tienen por qué verse alteradas en los pacientes con ELAe ya que no presentan la mutación.

Por otro lado, la hiperfosforilación de TDP-43 que se produce en la mayoría de pacientes entre los que se incluyen los ELAe, puede estar activando diferentes mecanismos compensatorios para regular la expresión y/o actividad de las proteínas quinasas implicadas en la fosforilación anómala de TDP-43. Este suceso no se estaría produciendo en los ELAf-SOD1 ya que pertenecen al pequeño porcentaje de individuos de ELA que no presentan las características propias de la proteinopatía de TDP-43.

Por último, el hecho de que exista variabilidad dentro de una misma cohorte de pacientes es indicio de que no todos se encuentran en la misma fase de la enfermedad en el momento de la extracción de la muestra ya que la expresión y actividad de las proteínas involucradas en los mecanismos patológicos de una enfermedad varía a lo largo del transcurso de la misma.

Si hay una característica que define a esta compleja y devastadora enfermedad es la heterogeneidad que existe entre pacientes y por consiguiente la dificultad para encontrar un tratamiento que sea eficaz para todos ellos. Tras décadas de investigación sigue sin haber una terapia efectiva por lo que las líneas investigación deberían ir encaminadas a la búsqueda de

tratamientos personalizados en función de las características patológicas que presente cada individuo.

2.2.3. Estudio de los inhibidores de quinasas en los linfoblastos de pacientes con ELAe

Con el fin de comprobar la eficacia en la disminución de la fosforilación de TDP-43 de los inhibidores de CK-1 δ , CDC7 y TTBK1 encontrada en la línea celular SH-SY5Y y AE, se procedió al estudio de estos inhibidores de quinasas en las líneas linfoblásticas de los individuos de ELAe que, como se ha descrito previamente, presentan los mismos aspectos patológicos de TDP-43 que los observados en el SNC de esta cohorte de paciente.

- Inhibidores de CK1:

En primer lugar se evaluó el efecto de los dos candidatos seleccionados que presentan actividad inhibitoria frente a CK-1 δ ; **IGS 2.7** e **IGS 3.27**. La dosis elegida fue en base a estudios previos del laboratorio en linfoblastos de pacientes con DFT, en los que la concentración óptima fue la de 5 μ M.⁹⁷

Tras un periodo de incubación de 24 horas con los dos compuestos, se analizan los niveles de pTDP-43 mediante la técnica de WB con un anticuerpo específico de las Ser409/410. En ambos casos el tratamiento es capaz de reducir los niveles de fosforilación de TDP-43 sin afectar a la concentración celular de la proteína y sin producir efectos aparentes sobre los controles sanos (**Figura 51**).

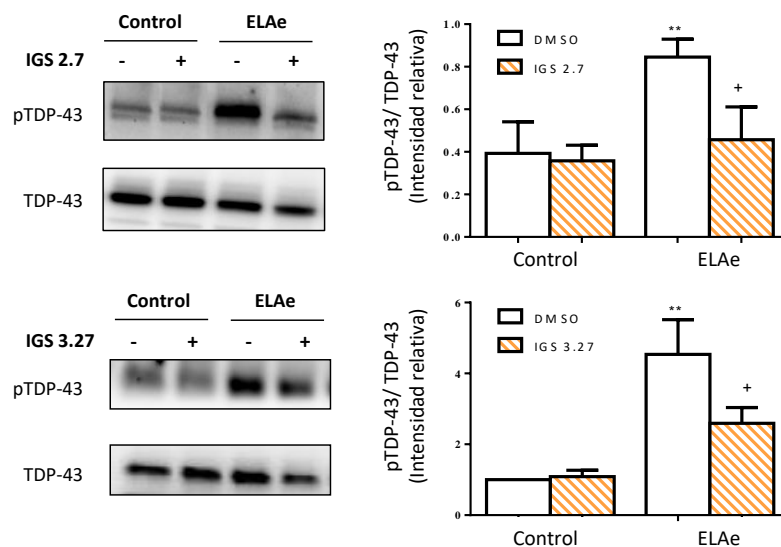


Figura 51. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de pTDP-43 y TDP-43 total en presencia o ausencia de los inhibidores de CK-1 (IGS 2.7 e IGS 3.27 a 5 μ M) en los linfoblastos de 3 pacientes con ELAe y 3 controles. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente a al grupo control y ⁺ $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

Como consecuencia de esta bajada en la fosforilación tóxica de TDP-43 cabría esperar una disminución en la formación de agregados y por lo tanto que se reestableciera el tránsito núcleo-citosol propio del estado fisiológico observándose una disminución en la concentración citosólica de TDP-43. Para verificar esta hipótesis se selecciona el compuesto **IGS 3.27** y se repite el experimento, pero en este caso realizando un fraccionamiento celular separando la fracción citosólica de la nuclear. Los niveles de TDP-43 total se evalúan mediante un anticuerpo específico del extremo N-terminal observándose como resultado una bajada en los niveles de TDP-43 en el citosol y en consecuencia un aumento en el núcleo (**Figura 52**).

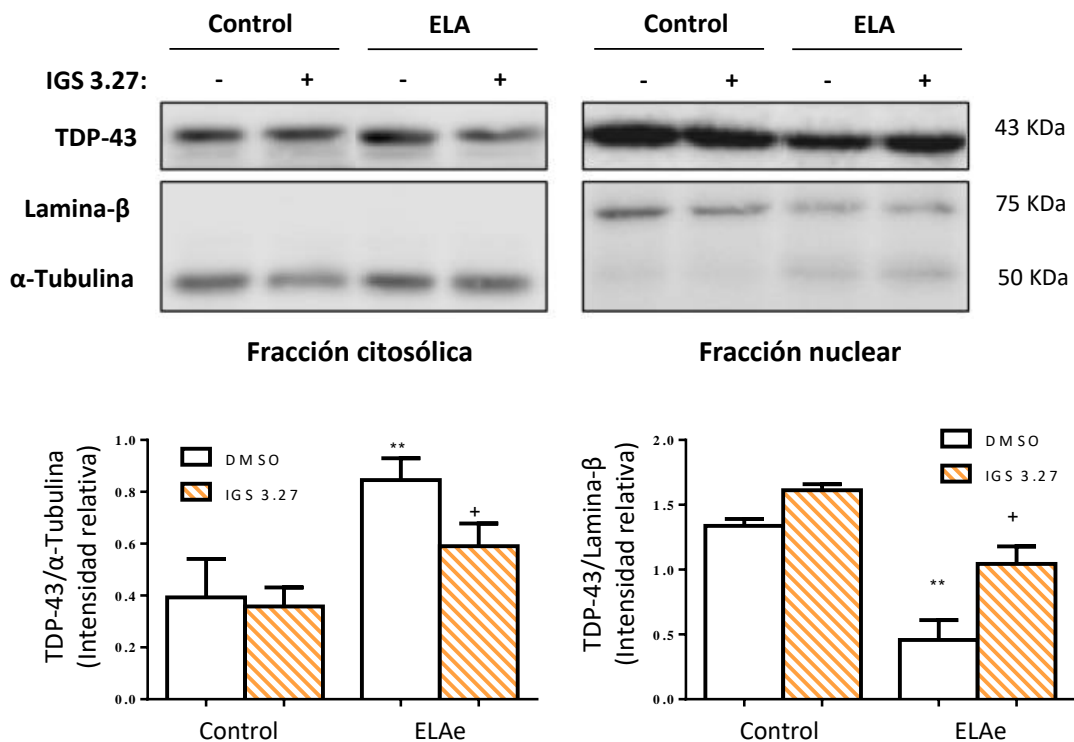


Figura 52. Localización subcelular de TDP-43. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de TDP-43 en los linfoblastos de un ELAe y un control en presencia o ausencia del inhibidor de CK-1 **IGS 3.27** (5 μM). Como control de carga para la fracción nuclear se ha utilizado Lamina-β y para la fracción citosólica α-Tubulina. Los valores representan la media ± SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente a al grupo control y $^+ p < 0.05$ con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

Resultados similares se obtuvieron al analizar la localización subcelular de TDP-43 en presencia de **IGS 2.7** mediante inmunocitoquímica (**Figura 53**). Es decir, el tratamiento con los inhibidores de CK-1 no solo disminuye la fosforilación patológica de TDP-43 sino que además reestablece el equilibrio de la misma al reducir la concentración citoplasmática que está contribuyendo a la degeneración neuronal.^{234,104}

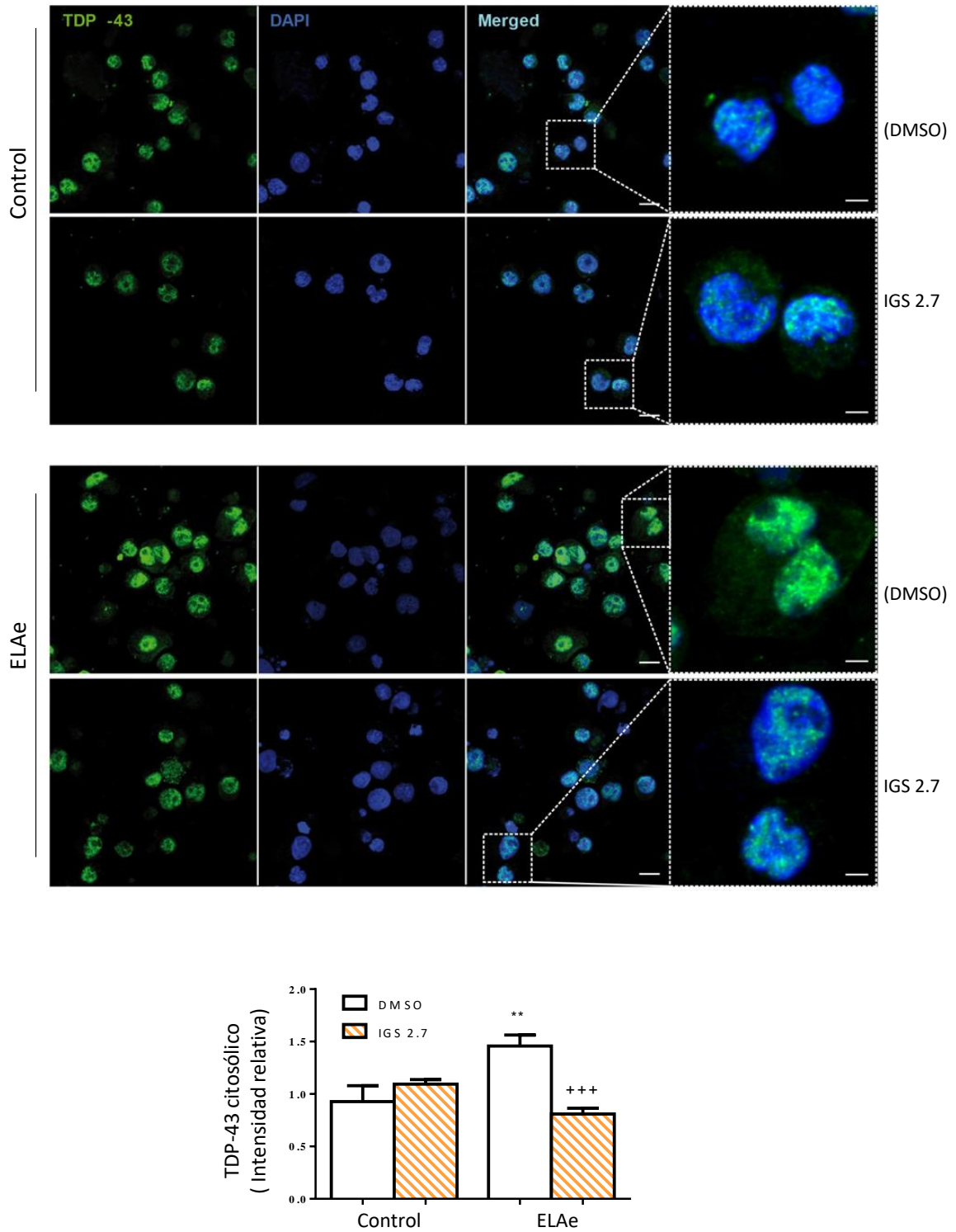


Figura 53. Análisis mediante técnicas inmunohistoquímicas de la localización subcelular de TDP-43 (verde) en linfoblastos de un paciente de ELAe y un control. DAPI se utilizó como marcador nuclear (azul). Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. Barras de escala de las imágenes representativas: 11 μ m y 3 μ m en las ampliadas. (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo control, *** $p < 0.001$ frente al ELAe sin tratamiento).

- Inhibidores de CDC7:

En el caso de los inhibidores de CDC7 se seleccionan a modo de muestra representativa 3 de los compuestos que presentaron un efecto neuroprotector en el modelo frente al ácido etacrínico: **C7**, **C16** y **C24**. El tratamiento con estos inhibidores a la concentración previamente establecida (10 μ M) en tres muestras de ELAe y un control resulta en una bajada significativa de la fosforilación de TDP-43 (**Figura 54a**) determinada por WB.

La potencial capacidad de reestablecer la homeostasis de esta proteína nuclear se estudió con los derivados **C7** y **C16**. Los resultados mostraron que, si bien no tiene efectos apreciables en los controles, el tratamiento con estos inhibidores de CDC7 es capaz de disminuir la acumulación citoplasmática de TDP-43 en los 3 pacientes estudiados recuperando la homeostasis de esta proteína (**Figura 54b**).²⁴⁰

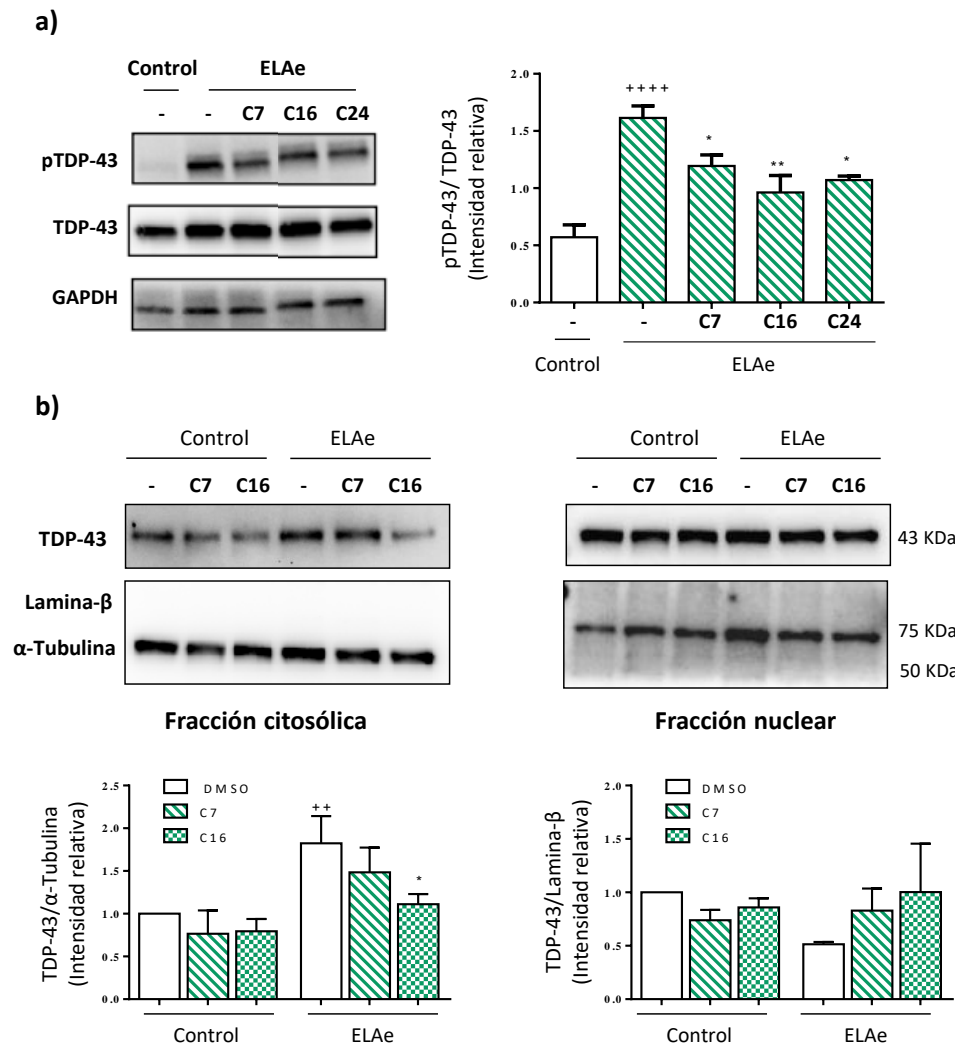


Figura 54. a) Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de pTDP-43 y TDP-43 total en presencia o ausencia de los inhibidores de CDC7 (C7, C16 y C24 a 10 μ M) en los linfoblastos de pacientes con ELAe y

2. Evaluación de la eficacia de los candidatos a fármaco en modelos celulares

controles. b) Localización subcelular de TDP-43 en los linfoblastos de ELAe y control en presencia o ausencia de los compuestos C7 y C16 (10 μ M). Como control de carga se ha utilizado Lamina- β para la fracción nuclear y α -Tubulina para la fracción citosólica. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente a al grupo control sin tratamiento y * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

- Inhibidores de TTBK1:

Por último, se han evaluado los compuestos con actividad inhibitoria frente a TTBK1 que fueron capaces de disminuir significativamente la fosforilación de TDP-43 en el modelo de neuroprotección; **T31** y **T25**. Ambos compuestos se incubaron con los linfoblastos de pacientes de ELAe y de individuos sanos a 5 y 10 μ M obteniéndose como resultado una bajada significativa en la fosforilación de TDP-43 a la concentración de 10 μ M en los linfoblastos de los ELAe sin observar efectos aparentes en el grupo control (**Figura 55a**).

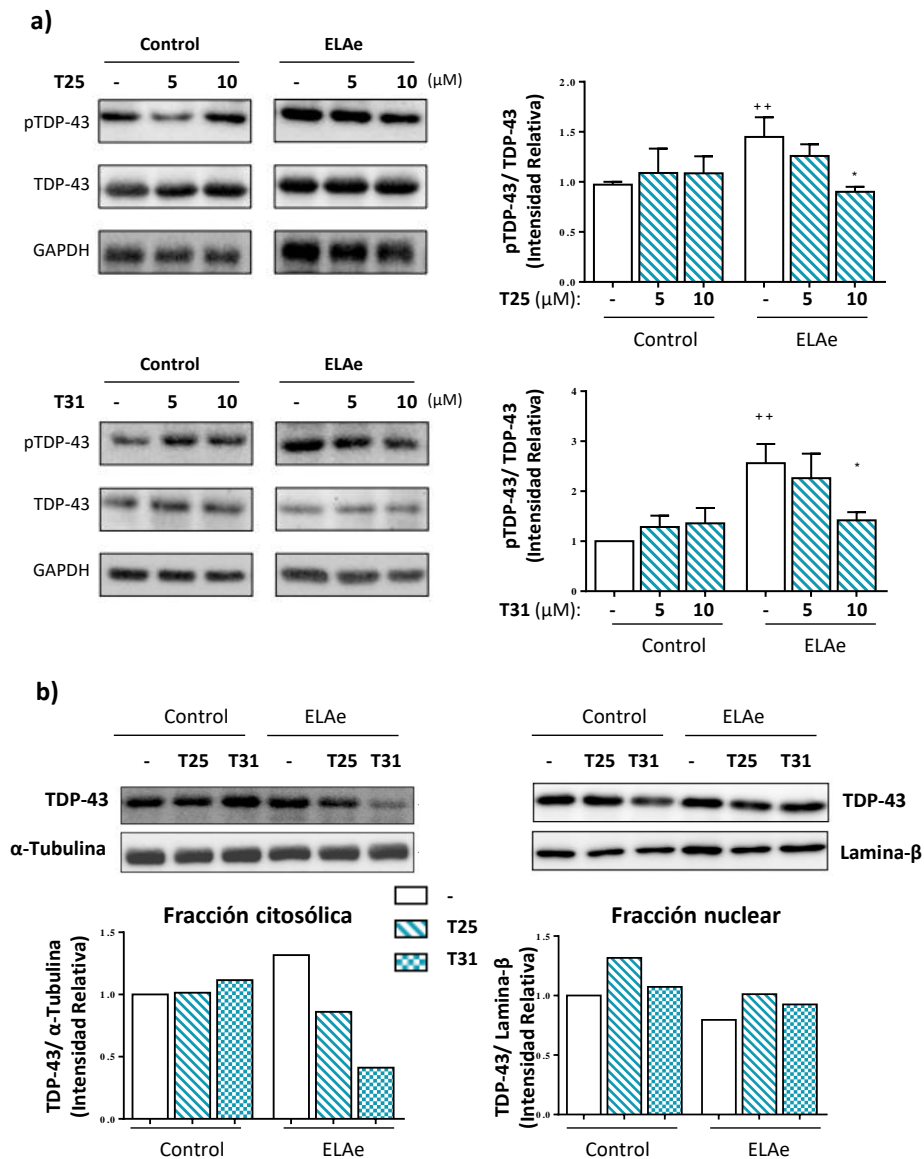


Figura 52. a) Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de pTDP-43 y TDP-43 total en presencia o ausencia de los inhibidores de TTBK1 (T25 y T31 a 5 y 10 μM) en los linfoblastos de pacientes con ELAe y controles. **b)** Localización subcelular de TDP-43 en los linfoblastos de ELAe y control en presencia o ausencia de los compuestos T25 y T31 (10 μM). Como control de carga se ha utilizado Lamina- β para la fracción nuclear y α -Tubulina para la fracción citosólica. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (++ p <0.01 con diferencias significativas frente a al grupo control sin tratamiento y * p <0.05 con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

A continuación se evaluó la capacidad para restituir la localización nuclear de TDP-43 a la concentración que resultó ser efectiva (10 μM). Los linfoblastos de los pacientes tratados con los inhibidores presentan una disminución de los niveles de TDP-43 en el citosol alcanzando niveles próximos a los de los linfoblastos del grupo control. Esta disminución en el citosol va acompañada de un aumento de TDP-43 en el núcleo (**Figura 55b**).

En conclusión, las características patológicas asociadas a la proteinopatía de TDP-43 que presentan los linfoblastos de los pacientes con ELAe (hiperfosforilación, fragmentación y acumulación citoplasmática de TDP-43), se reestablecen con el tratamiento de compuestos que tienen actividad inhibitoria frente a CK-1, CDC7 y TTBK1 quedando restituida la homeostasis de esta proteína nuclear tan importante. Por lo tanto, los inhibidores de estas quinasas involucradas en la fosforilación patológica de TDP-43, se pueden considerar potenciales fármacos para el tratamiento de las enfermedades consideradas TDP-43-patías y en concreto para la ELA.

2.3. Estudio del potencial inmunomodulador en un modelo de neuroinflamación

La ELA, al igual que la mayoría de enfermedades neurodegenerativas, es un trastorno multifactorial, es decir, la muerte neuronal es consecuencia de la suma de diversos procesos biológicos que se han visto alterados. La neuroinflamación es uno de estos procesos común a la mayoría de este tipo de trastornos neurodegenerativos en donde la glía ha ido adquiriendo cada vez más relevancia en la patogénesis.²⁴¹ Concretamente en la ELA, diversos estudios asocian las alteraciones descritas en las células gliales con el desarrollo y progresión de la enfermedad.¹⁹

Las células gliales (astrocitos, microglía, oligodendrocitos y ependimocitos) son los principales moduladores de la inflamación en el SNC caracterizadas también por dar soporte estructural, trófico y metabólico a las neuronas. En concreto la microglía, calificada como las células inmunes del SNC, está constantemente escaneando el microambiente activándose ante cualquier estímulo que altere la homeostasis del mismo. En función de la duración y del tipo de estímulo, la microglía activada o microglía reactiva adoptará un fenotipo proinflamatorio/ tóxico (M1), o por el contrario un fenotipo antiinflamatorio/ protector (M2). Ante un estímulo corto o moderado, la microglía se activa y adopta un fenotipo M2 expresando receptores de membrana implicados en la fagocitosis de patógenos (TREM2 y CD206) y secretando citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento como las interleuquinas IL-4, IL-10 y el factor transformador de crecimiento (TGF- β) que facilitan la fagocitosis de los restos celulares y promueven la reparación de tejidos. Por el contrario, cuando el estímulo es persistente, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la activación crónica de la microglía hace que adopte un fenotipo tóxico o M1 produciendo factores que van a potenciar la inflamación como citoquinas y quimioquinas inflamatorias IL-1, IL-6, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como un aumento en la expresión de enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o la enzima NADPH oxidasa produciéndose elevados niveles de óxido nítrico y ROS que contribuyen a la degeneración neuronal (**Figura 56**).²⁴²

La gliosis reactiva (microgliosis y astrogliosis), definida como la acumulación de células gliales involucradas en la respuesta neuroinmune alteradas morfológica y funcionalmente, es un marcador patológico presente tanto en pacientes con ELA como en los modelos animales que recapitulan la enfermedad.¹⁹ Diversos estudios con técnicas de imagen (tomografía por emisión de positrones o PET) muestran la presencia de gliosis reactiva en el SNC de este tipo de pacientes.^{243,244} Estos datos se correlacionan con lo observado en las muestras *post mortem* en donde se detecta no solo la presencia de microglía y astrocitos reactivos sino además la infiltración de células inmunes periféricas al SNC.^{245, 246}

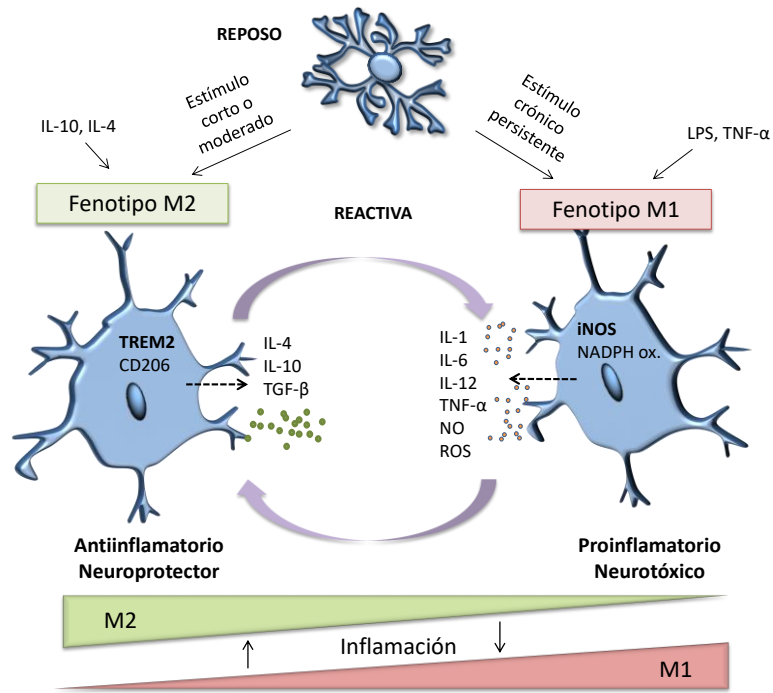


Figura 56. Proceso de activación de la microglía en función del tipo de estímulo y la presencia de determinados factores hacia un fenotipo antiinflamatorio y neuroprotector (M2) o proinflamatorio y neurotóxico (M1) con la liberación de las correspondientes citoquinas y quimioquinas pro o antiinflamatorias según el fenotipo que adopte.

El estudio de este proceso en modelos animales tiene la ventaja de poder analizar la evolución de la respuesta inflamatoria en las distintas etapas de la enfermedad. En el caso del modelo de ELAf ampliamente estudiado, el ratón transgénico SOD-1^{G93A}, han detectado la presencia de microglía reactiva en áreas cercanas a las motoneuronas antes de la aparición de los síntomas de debilidad muscular. En esa fase, los marcadores detectados corresponden a una microglía antiinflamatoria M2, sin embargo, conforme avanza la enfermedad se detecta un cambio en el fenotipo que viene marcado por la expresión y liberación de factores neurotóxicos propios del fenotipo M1.²⁴⁷

A día de hoy, el desarrollo de fármacos moduladores de las células gliales es una de las estrategias terapéuticas que se está llevando a cabo en clínica para la ELA.²⁴⁸ Ejemplo de ello es el fármaco Masitinib, actualmente en fase 3, cuyo mecanismo de acción está basado en bloquear la proliferación y activación de la microglía y de otras células inmunes como los macrófagos y mastocitos reduciendo la neuroinflamación y en consecuencia el daño neuronal (ID del ensayo clínico: NCT03127267).^{249,250} Por lo tanto, el estudio del potencial antiinflamatorio de los posibles candidatos a fármaco es de gran importancia para trazar un perfil farmacológico completo y

poder realizar así un cribado biológico más preciso a la hora de seleccionar el mejor candidato para llevarlo a la clínica.

El estudio del efecto antiinflamatorio de los inhibidores de CK-1 y GSK-3 β había sido analizado en trabajos previos, mostrando en ambos casos una disminución de la activación inflamatoria inducida por lipopolisacárido de pared bacteriana o LPS (uno de los agente proinflamatorios comúnmente utilizado para el estudio de la respuesta inflamatoria) en cultivos primarios de astrocitos y microglía.^{251,252} El presente trabajo se centró en el estudio del potencial antiinflamatorio/inmunomodulador de los inhibidores de CDC7 y TTBK1 realizado durante una estancia en el laboratorio del Prof. Bárbara Monti, en el Departamento de Farmacia y Biotecnología de la Universidad de Bolonia.

Concretamente se analizó el potencial inmunomodulador, es decir, la capacidad de los compuestos para inducir en la microglía el cambio del fenotipo M1 al M2, en un modelo de inflamación en cultivos primarios de microglía de rata. El ensayo consiste en inducir el fenotipo M1 mediante la exposición de las células al LPS y análisis posterior, mediante la expresión de diferentes marcadores, del fenotipo que presenta la microglía en presencia o ausencia de los compuestos de estudio. Los compuestos seleccionados son algunos de los estudiados en los modelos anteriores que presentaron resultados prometedores; **C16**, **C24** (inhibidores de CDC7) y **T25** (inhibidor de TTBK1).

2.3.1. Estudio de la viabilidad en cultivos primarios de neuronas de cerebelo de rata

En primer lugar, con el objetivo de determinar la dosis óptima de estudio de cada uno de los inhibidores de quinasas y siguiendo el protocolo del laboratorio de acogida, se realizó un estudio de viabilidad en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de rata tras el tratamiento con los compuestos a 2 concentraciones diferentes (5 y 25 μ M). Para ello, se extrae el cerebelo de las ratas con 7 días de vida, se retiran las meninges y se disocia mecánicamente en presencia de diferentes soluciones tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez obtenida una solución homogénea se incuban en placas de 96 pocillos con el medio de cultivo propio de este tipo celular. Con el fin de evitar la proliferación de las células gliales se añade citosina arabino-furanósido al cultivo, un inhibidor de la replicación del ADN. De esta forma obtenemos un cultivo formado mayoritariamente por neuronas granulares; un tipo celular frecuentemente utilizado para estudios de supervivencia/apoptosis en modelos de neurodegeneración/neuroprotección.²⁵³ Tras un periodo de 7 días de incubación, las neuronas

maduras se incuban con los compuestos de estudio a 5 y 25 μM , evaluándose la viabilidad celular 24 horas después mediante la técnica de MTT.

Como resultado se obtuvo una toxicidad con dos grados de significancia estadística para el compuesto **C16** a 25 μM , por lo que la concentración elegida para el estudio del potencial inmunomodulador de este compuesto fue 1, 2.5 y 5 μM (**Figura 57a**). En el caso del compuesto **C24** se aprecia un ligero efecto neurotóxico a la concentración de 25 μM , no obstante, la dosis de ensayo elegida fue 1, 5 y 25 μM (**Figura 57b**). Por último el compuesto **T25**, no presentó toxicidad a ninguna de las concentraciones ensayadas por lo que el efecto inmunomodulador se evaluó a 5 y 25 μM (**Figura 57c**).

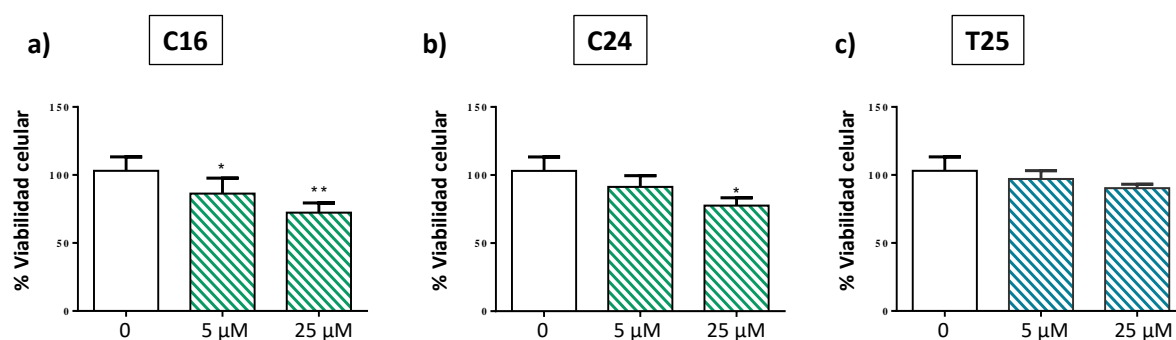


Figura 57. Viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo en presencia o ausencia de los inhibidores de CDC7 (C16 y C24) y TTBK1 (T25) a 5 y 25 μM . El porcentaje de células vivas se evaluó mediante la técnica de MTT tras 24 horas de incubación con los compuestos. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente a la condición sin tratamiento).

2.3.2. Estudio del potencial inmunomodulador en cultivos primarios de microglía de rata

Una vez seleccionada la dosis de estudio se pusieron a punto los cultivos de microglía de ratas de 1 a 3 días de vida según el protocolo detallado en materiales y métodos. Brevemente, se extrae el cerebro del animal y se aísla la parte de la corteza cerebral intentando que quede limpia de las meninges. A continuación, se disocia el tejido mecánicamente con determinadas soluciones hasta que quede completamente homogénea. La suspensión celular obtenida compuesta mayoritariamente de células gliales se incubó con el correspondiente medio de cultivo durante 7-8 días en frascos de cultivo previamente cubiertos con polilisina para que las células queden bien adheridas. Tras este periodo de incubación se obtiene un cultivo mixto formado por astrocitos y microglía. La microglía presenta una morfología redondeada y refulgente a diferencia de los astrocitos cuya morfología es más alargada y con pequeñas ramificaciones (**Figura 58**). Para separar ambos tipos celulares y obtener un cultivo puro de células microgliales basta con agitar

manualmente los frascos de cultivo. De esta forma, la microglía que está débilmente unida a la superficie se despega y queda suspendida en el medio de cultivo. Sin embargo, para levantar los astrocitos es necesario incubarlos con tripsina, ya que el movimiento mecánico no es suficiente.

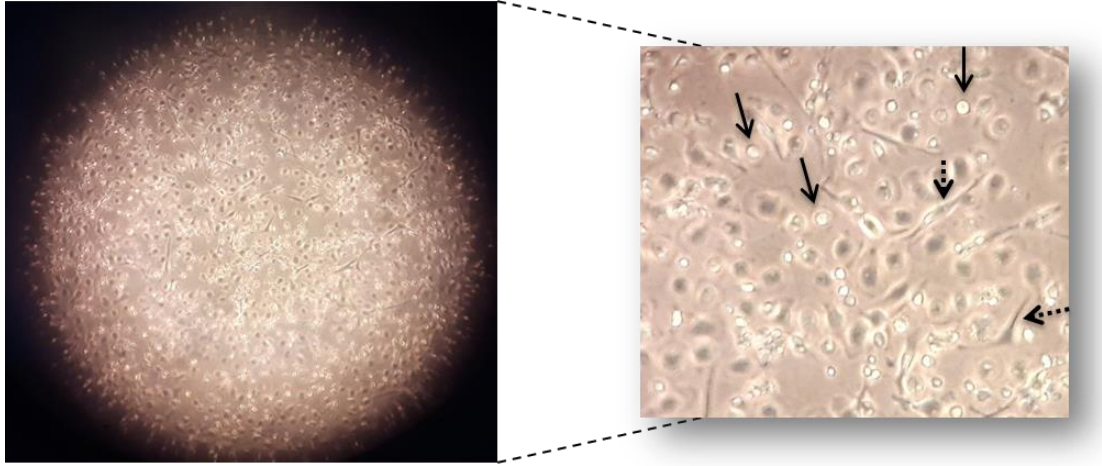


Figura 58: Imagen del cultivo primario mixto de astrocitos (flechas discontinuas) y microglía (flechas continuas) tras 7 días de incubación.

Una vez aislada la microglía se añaden 2×10^6 células en cada placa Petri (35 mm \varnothing) en donde una vez adheridas se llevará a cabo el ensayo. Para ello se incuban las células en presencia o ausencia de los compuestos de estudio a las concentraciones establecidas y se exponen una hora después al agente inductor de la inflamación; el LPS a 100ng/mL. El efecto inmunomodulador se evalúa 24 horas después mediante el análisis por WB de la expresión de marcadores propios de cada fenotipo como la enzima óxido nítrico sintasa inducible o iNOS cuya expresión aumenta en la microglía proinflamatoria (M1), y el receptor de membrana TREM2, del inglés «Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 protein» implicado en la función fagocítica, marcador de la microglía antiinflamatoria (M2).

Como resultado se obtuvo un aumento en la expresión de la iNOS en respuesta a la exposición de las células al LPS que fueron capaces de disminuir de manera significativa los inhibidores **C16** a 1, 2.5 y 5 μ M de forma dosis dependiente; **C24** a 1, 5 y 25 μ M y **T25** a 25 μ M (**Figura 59a**). Ninguno de los inhibidores de CDC7 altera de forma significativa la expresión de TREM2 por lo que la actividad fagocítica de las células no se está viendo afectada (**Figura 59b**). En el caso del **T25** se ve un ligero aumento en la expresión de este marcador (**Figura 59b**). Para evaluar el efecto inmunomodulador se realizó el ratio entre ambos marcadores TREM2/iNOS observándose un aumento significativo del fenotipo neuroprotector M2 de forma dosis

dependiente en los tres casos estudiados observándose un efecto más potente con el compuesto **C24** a 25 μM (**Figura 59c**). Ante estos resultados se puede decir que los inhibidores de CDC7 y TTBK1 estudiados tienen la capacidad de inducir el cambio del fenotipo neurotóxico M1 provocado por la exposición de las células al LPS, al neuroprotector M2.

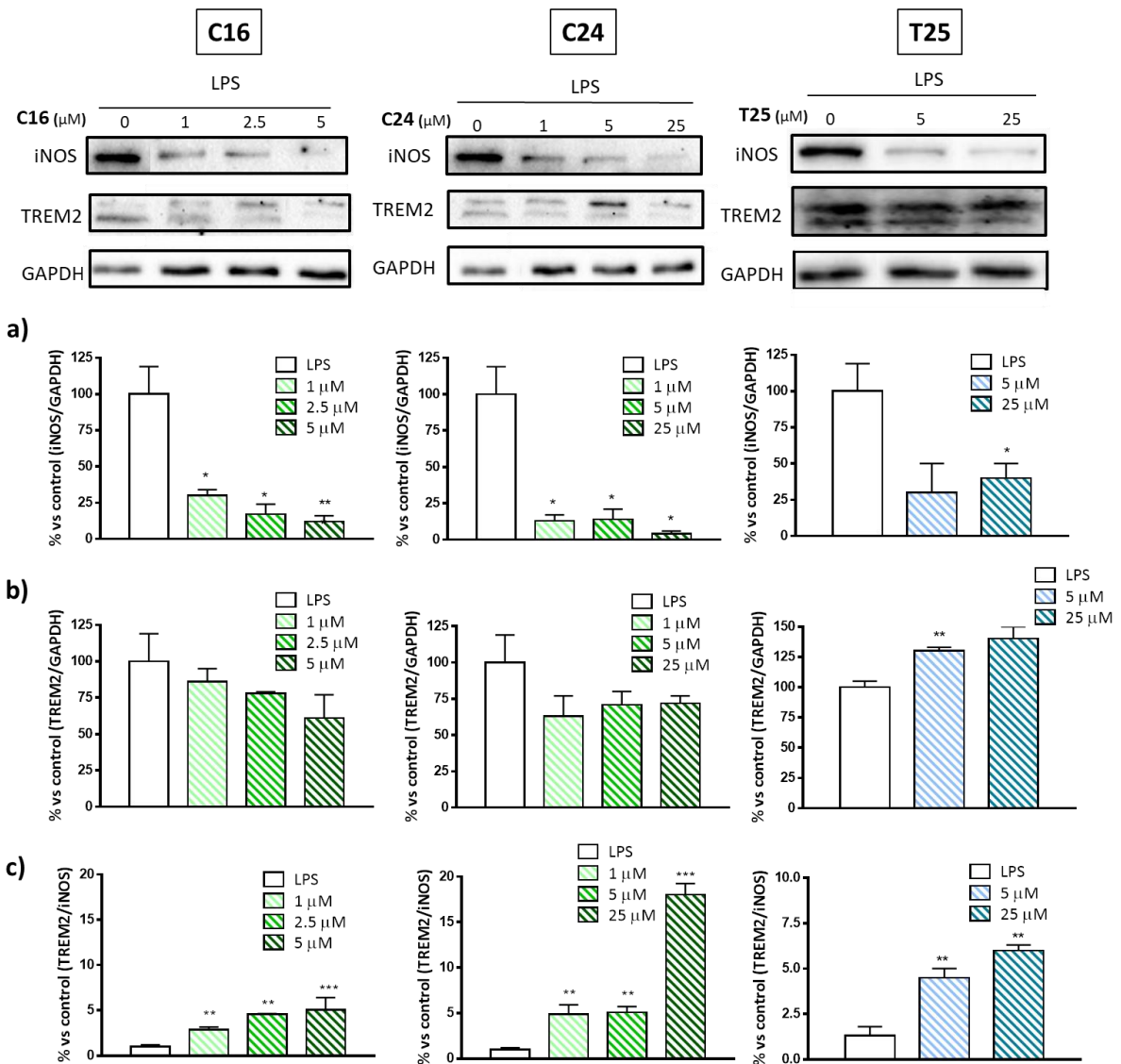


Figura 59. Efecto inmunomodulador de los inhibidores de CDC7 (**C16**, **C24**) y TTBK1 (**T25**) en cultivos primarios de microglía de rata. Las células fueron expuestas a LPS (100ng/mL) en presencia o ausencia de los compuestos a las concentraciones crecientes previamente establecidas. 24 horas después se analizan por WB los marcadores (a) iNOS, (b) TREM2 y (c) el ratio TREM2/iNOS. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al control tratado con LPS).

En conclusión, dado que la activación crónica de la microglía en respuesta a un daño persistente en el SNC hace que esta adopte un fenotipo tóxico (M1) liberando citoquinas y

quimioquinas inflamatorias contribuyendo de esta forma a la degeneración neuronal, la búsqueda de fármacos que potencien el cambio del fenotipo proinflamatorio al neuroprotector es hoy en día una realidad para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y en concreto para la ELA. Los resultados aquí obtenidos muestran que los inhibidores de CDC7 y TTBK1 estudiados podrían ser potenciales candidatos a fármaco mostrando la capacidad de inmunomodular la microglía. Estos inhibidores de quinasas favorecen el fenotipo antiinflamatorio M2 y en definitiva podrían reducir el daño neuronal producido como consecuencia de la activación prolongada de la microglía.

CAPÍTULO 3

**Evaluación de la eficacia de los candidatos a fármaco en el modelo transgénico de
ratón TDP-43^{A315T}**

3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS CANDIDATOS A FÁRMACO EN EL MODELO TRANSGÉNICO DE RATÓN TDP-43^{A315T}

La evaluación del potencial terapéutico de los fármacos en modelos animales es la última fase del desarrollo preclínico de un fármaco previa e ineludible a la entrada en fases clínicas. Por ello, el desarrollo de modelos animales que recapitulen una enfermedad es necesario no solo para el estudio de los mecanismos patológicos y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, sino también para la validación *in vivo* del potencial terapéutico de los candidatos a fármaco.

El modelo más utilizado para el estudio de la ELA ha sido el ratón transgénico SOD-1^{G93A}, desarrollado en 1994 tras el descubrimiento de la implicación de SOD-1 en la ELA.¹¹⁵ En él se ha estudiado el mecanismo de acción de Edaravona, uno de los dos fármacos paliativos aprobado por la FDA como tratamiento para esta enfermedad.¹³¹ No obstante, cabe destacar que este modelo tan solo representa a un 20% de los pacientes con ELA^f y a un 1-2% de los afectados con ELA^e, de ahí que muchos de los fármacos cuyo estudio preclínico se ha realizado en este modelo (creatinina, vitamina E, gabapentina),^{254,255} no resultaran ser efectivos en humanos.^{256,257,258}

El descubrimiento progresivo de nuevos genes asociados al riesgo de padecer la enfermedad ha permitido el desarrollo de nuevos modelos experimentales. Los modelos existentes para el estudio de la patología de TDP-43 se han diseñado con el objetivo de determinar si la causa de la neurodegeneración es debida a la pérdida de función de TDP-43 en el núcleo, o bien, a una ganancia de función por la formación de agregados citosólicos o nuevas interacciones con otras proteínas. Para ello se han desarrollado modelos basados en la sobreexpresión de TDP-43 (silvestre o mutada) o el silenciamiento de la misma.¹²¹ Aunque sigue siendo tema de debate a día de hoy, los estudios apoyan mayoritariamente la hipótesis de que la neurodegeneración se está produciendo como consecuencia de la pérdida de función a nivel nuclear y no por la agregación de TDP-43 en el citosol. Esta hipótesis se basa en la existencia de modelos que no presentan agregados citosólicos de TDP-43, pero que sin embargo, desarrollan la sintomatología motora típica de la ELA acompañada de microgliosis, astrogliosis y pérdida progresiva de motoneuronas.^{130,139,259}

3.1. Descripción del modelo

En colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Eva de Lago de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, se llevó a cabo la evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores de quinasas en el modelo de ratón transgénico Prp-hTDP-43^{A315T}.

Este modelo está basado en la sobreexpresión de TDP-43 humana con la mutación A315T en heterocigosis (sustitución de la alanina 315 por una treonina en uno de los dos alelos) en ratones C57BL/6.¹³⁴ El promotor utilizado es la proteína priónica de ratón (Prp), por lo que el constructo Prp-hTDP-43^{A315T} se expresa mayoritariamente en cerebro y médula espinal, según el patrón de expresión propio de dicho promotor.¹²⁷

El modelo murino Prp-hTDP-43^{A315T} es uno de los más utilizados para el estudio de la proteinopatía de TDP-43 puesto que recapitula la mayoría de características patológicas propias de esta cohorte de pacientes a nivel histológico y de fenotipo. Se caracteriza principalmente por presentar una pérdida de peso significativa, degeneración de las motoneuronas del tracto corticoespinal ventral y lateral (**Figura 60a**), agregados proteicos citoplasmáticos ubiquitinados (**Figura 60b**), gliosis (**Figura 60c-d**) y debilidad muscular como consecuencia de la atrofia de las fibras musculares por la falta de inervación muscular.^{134,260}

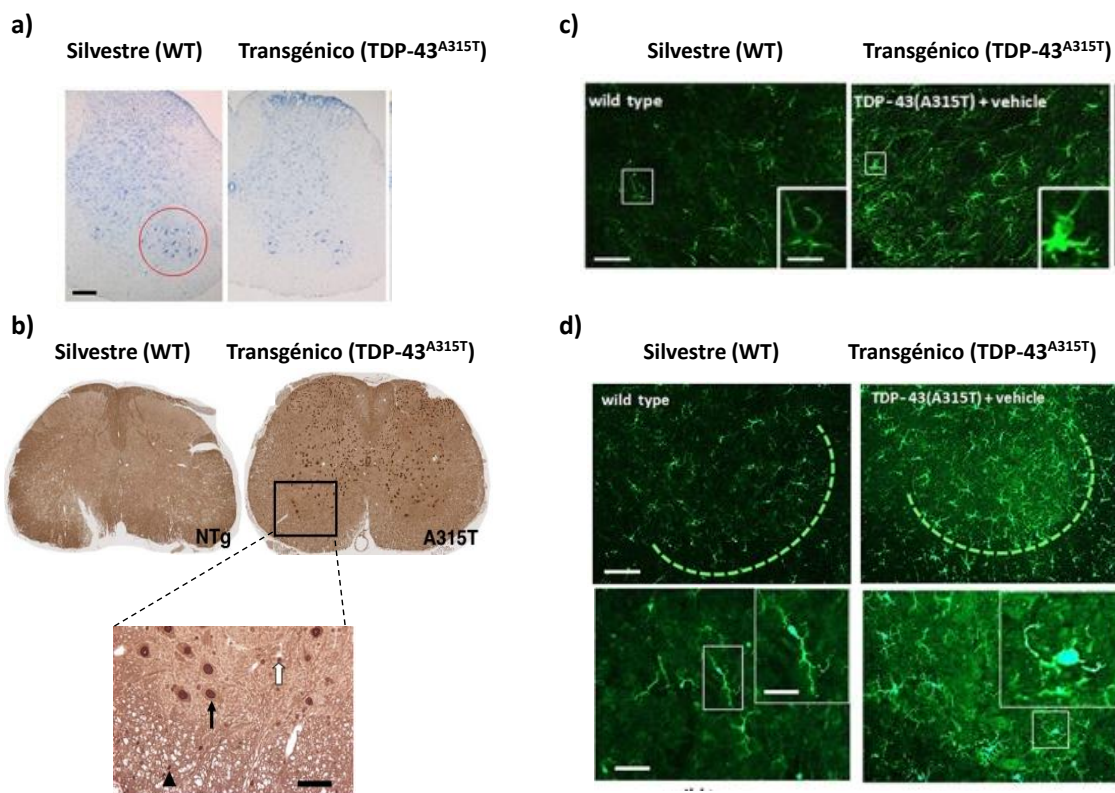


Figura 60. (Adaptada de Ref. 134 y 260) Caracterización del modelo transgénico de ratón TDP-43^{A315T} en comparación al ratón silvestre C57BL/6. a) Pérdida de motoneuronas en el tracto corticoespinal del asta ventral de la médula espinal (tinción de Nissl).²⁶⁰ b) Agregados proteicos positivos para ubiquitina en médula espinal.¹³⁴ c) Astroglia en el asta ventral de la médula espinal.²⁶⁰ d) Microglia reactiva en el asta ventral de la médula espinal.²⁶⁰

En relación a la patología de TDP-43 se ha descrito en las neuronas motoras de la médula espinal y corteza cerebral la pérdida de localización nuclear de TDP-43 (**Figura 61a**) acompañada de la presencia de fragmentos del extremo C-terminal de 25 y 35 KDa tóxicos para la célula (**Figura 61b**). Sin embargo, al igual que en otros modelos, no se ha detectado TDP-43 en los agregados citosólicos ubiquitinados mediante técnicas inmunohistoquímicas (**Figura 61c**), no siendo por tanto necesario para que se produzca la degeneración de las motoneuronas y en consecuencia la aparición del fenotipo motor.^{261,262}

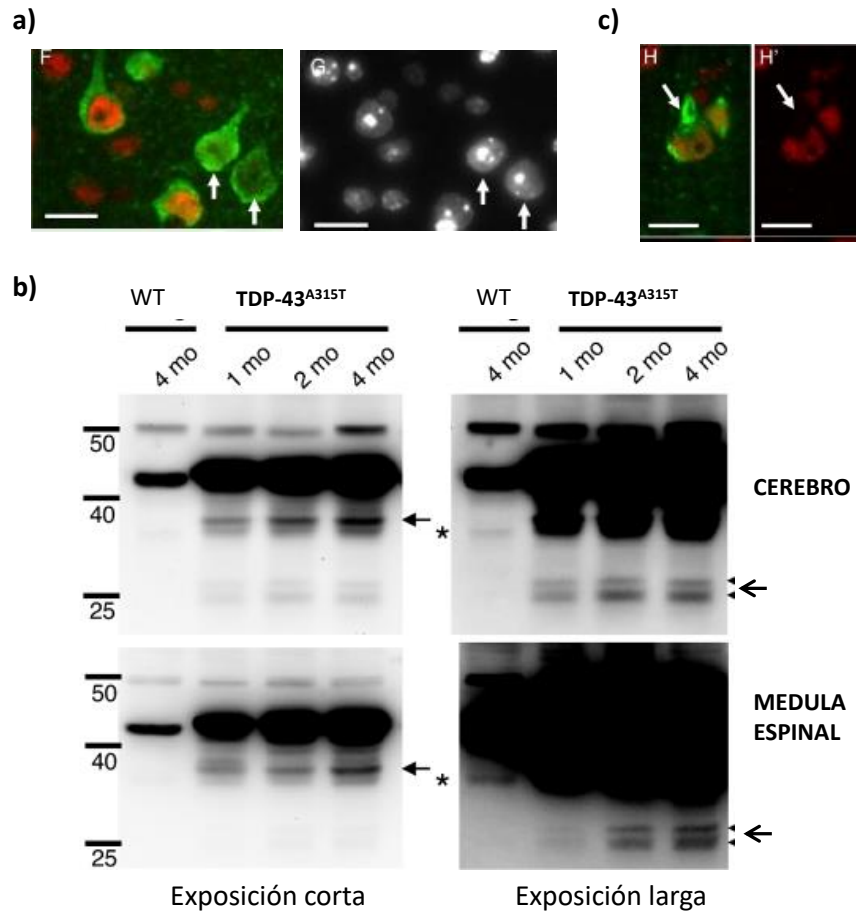


Figura 61. Inmunoblot e imágenes con doble marcaje inmunohistoquímico para TDP-43 (rojo) y ubiquitina (verde) en el ratón transgénico TDP-43^{A315T}. a) Salida de TDP-43 del núcleo al citoplasma (marcaje con DAPI en escala de grises). b) Detección de la proteína completa y de fragmentos de 25 y 35 KDa en una fase pre-sintomática (1-2 meses (1,2mo)) o sintomática avanzada (4^o mes (4mo)) en cerebro y médula espinal de los ratones silvestres o TDP-43^{A315T} ante una exposición corta o larga de la membrana. c) TDP-43 en el citoplasma no co-localiza con los agregados positivos para ubiquitina (*adaptada de Ref. 134*).

Los primeros síntomas de debilidad muscular aparecen entre los 70-80 días en las extremidades inferiores, produciéndose la pérdida completa de movilidad y muerte en torno a los 97 ± 11 días de vida. Este modelo lleva asociado una obstrucción intestinal provocada por la baja

motilidad del intestino como consecuencia de la neurotoxicidad que produce la sobreexpresión de TDP-43^{A315T} en el plexo mientérico del colon.²⁶³ Esta anomalía es la principal causa de muerte de los animales, que puede evitarse si se administra comida gelatinosa fácilmente digerible. En ese caso, la esperanza de vida media de los ratones aumenta hasta los 120 días.^{264,265}

Para el diseño del experimento se procedió en primer lugar al genotipado de las crías de ratón de entre 21-28 días de vida. Siguiendo el protocolo detallado en el apartado de materiales y métodos se realizó la extracción de ADN de las colas de los ratones, amplificando posteriormente mediante la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) un fragmento del ADN que codifica para la proteína TDP-43 endógena del ratón (200 pares de bases (pb)) y de la humana (400 pb) presente solo en los animales transgénicos. Mediante una electroforesis en gel de agarosa queda separado el ADN amplificado correspondiente a cada proteína, identificando de esta forma los ratones transgénicos y los silvestres (**Figura 62**).

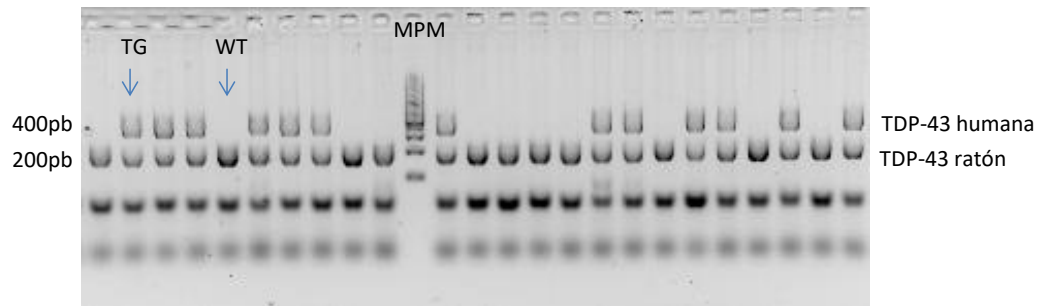


Figura 62. Electroforesis en gel de agarosa del ADN amplificado correspondiente a la TDP-43 humana (banda superior 400pb) y a la endógena del ratón (banda inferior 200pb). Ratón silvestre (WT; 1 banda), ratón transgénico TDP-43^{A315T} (TG; dos bandas). MPM: marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

Una vez genotipados los ratones, se procedió al diseño del experimento con una N mínima de 8 animales por grupo. Las hembras no presentan la sintomatología típica de la ELA por lo que quedan excluidas del estudio. El protocolo llevado a cabo fue aprobado por el órgano encargado del bienestar animal del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) (ref. PROEX 059/16) en cumplimiento de los artículos 33.1 y 38.1 del Real Decreto 53/2013, del 1 de Febrero (BOE 8 de Febrero) y de acuerdo a la normativa europea en relación al uso de animales para experimentación (2010/63/EU).

3.2. Evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores de CK-1 *in vivo*

Dado el potencial neuroprotector que presentan los inhibidores de CK-1 modulando la neurotoxicidad de TDP-43 en los modelos celulares de ELA estudiados, en los modelos celulares

asociados a la proteinopatía de TDP-43, e incluso en un modelo *in vivo* de mosca transgénica,^{97,179} se ha evaluado el efecto terapéutico que supone la inhibición de esta quinasa en el ratón transgénico TDP-43^{A315T} mediante el tratamiento con el compuesto **IGS 2.7**.

El primer objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento crónico con **IGS 2.7** en los ratones transgénicos TDP-43^{A315T} (TDP43-IGS2.7) y en los silvestres (WT-IGS2.7). Para monitorizar el ensayo se establecieron dos grupos adicionales a los que se les administró la solución vehículo sin el fármaco (TDP43-Veh y WT-Veh). El tratamiento se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 1 mg/Kg durante 25 días consecutivos, empezando en la fase pre-sintomática de la enfermedad; día 65 postnatal (P65) (**Figura 63**). La dosis fue determinada en base a los resultados obtenidos en un estudio farmacocinético realizado en ratón, previo a este trabajo.⁹⁷ La coordinación motora se analizó semanalmente mediante pruebas comportamentales. Después de su sacrificio los tejidos de la médula espinal fueron empleados para su análisis bioquímico e histológico.

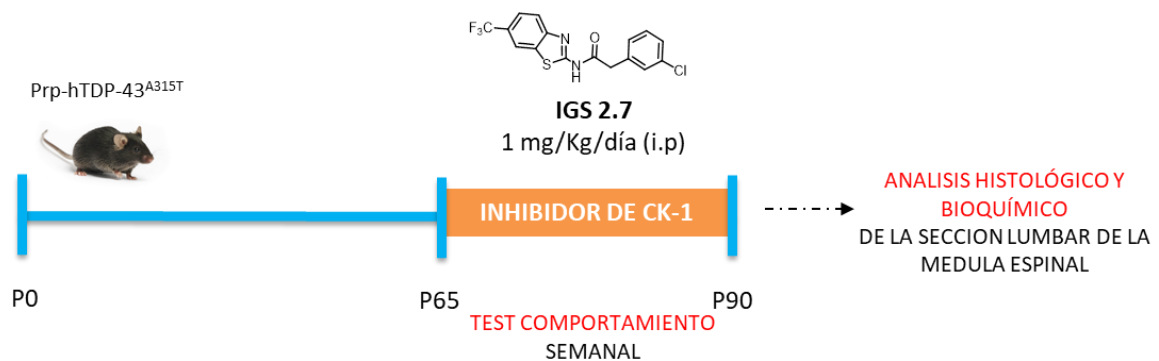


Figura 63. Diseño experimental del ensayo llevado a cabo en el ratón transgénico TDP-43^{A315T} con el inhibidor de CK-1; IGS 2.7 (i.p: intraperitoneal).

El peso de los animales se registró diariamente durante todo el periodo de tratamiento. Como cabía esperar se produjo una bajada en el peso de los animales TDP43-Veh en comparación a los WT-Veh con la progresión de la enfermedad (**Figura 64**). Esta disminución fue menos severa y apareció más tarde en el tiempo en los animales TDP43-IGS2.7, siendo desde el día 19 de tratamiento estadísticamente significativa en comparación al grupo TDP43-Veh (**Figura 64**). Además, no se apreciaron diferencias significativas entre los animales TDP43-IGS2.7 y los WT-Veh hasta dos días antes del sacrificio de los ratones (**Figura 64**).

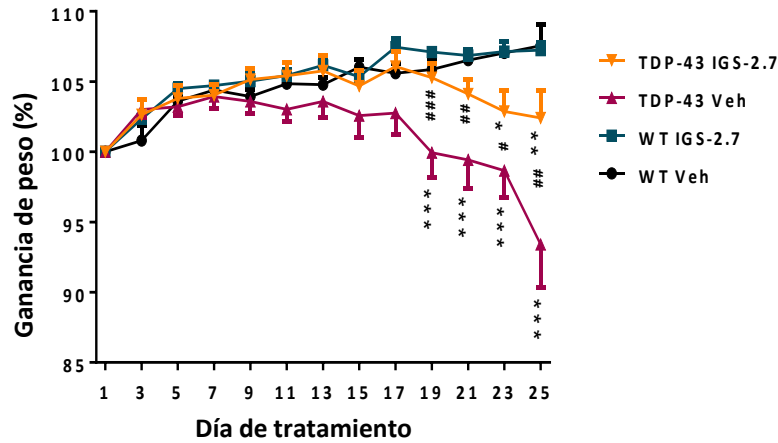


Figura 64. Registro del peso de los ratones silvestres (WT) y transgénicos (TDP43) durante los 25 días de tratamiento con el compuesto IGS2.7 o el vehículo. Los datos representan la media diaria del peso de los animales por grupo ($N \geq 6$ animales por grupo) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

La afectación motora se evaluó semanalmente con la prueba de actividad en rodillo conocido también como test de Rotarod. Esta prueba consiste en evaluar el tiempo que aguantan los ratones andando encima de un rodillo cuya velocidad aumenta gradualmente de 4 a 40 rpm en un periodo de 5 min. El ensayo consta de 3 pruebas realizadas con un intervalo de 15 min entre cada prueba, habiendo realizado previamente 3 entrenamientos en intervalos de 5 min. Como resultado se observaron diferencias significativas a partir de la segunda semana de tratamiento en el tiempo que aguantan los ratones silvestres encima del rodillo en comparación a los ratones transgénicos. Sin embargo, no hubo diferencia entre el grupo TDP43-IGS2.7 y el TDP43-Veh ni siquiera a punto final (**Figura 65**). Como se ha comentado en la descripción del ratón TDP-43^{A315T}, este modelo lleva asociado una obstrucción intestinal que en muchos casos es la principal causa de muerte de los animales.²⁶⁴ Ante estos resultados, consideramos que debido a la obstrucción intestinal y las molestias que ello conlleva, se podría estar enmascarando el efecto del tratamiento puesto que los animales aguantan menos tiempo en el rodillo como consecuencia del daño causado por la obstrucción y no por la falta de coordinación motora. Este problema fue solventado posteriormente para el estudio de los inhibidores de las otras quinasas mediante la administración de la comida en formato gel.

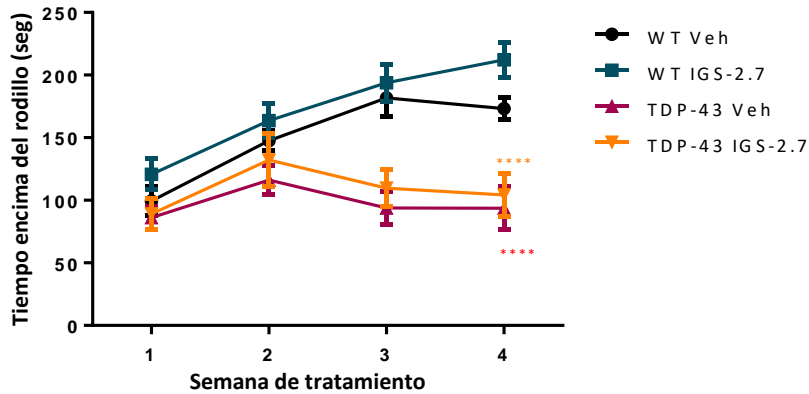


Figura 65. Prueba del Rotarod realizada una vez por semana durante todo el periodo de tratamiento a los 4 grupos de estudio. Se representa el tiempo medio \pm SEM (seg) que aguantan los animales en un rodillo cuya velocidad aumenta gradualmente de 4 a 40 rpm en un intervalo de 5 min ($N \geq 6$ animales por grupo) (**** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

Llegado el día 25 de tratamiento (P90), se sacrificaron los animales 24 horas después de la inyección de la última dosis y se extrajeron rápidamente las muestras congelándolas según el protocolo detallado en el apartado de materiales métodos, para su posterior procesamiento.

El análisis histológico comenzó con el recuento del número de motoneuronas en la médula espinal evaluando de esta forma el posible efecto neuroprotector del tratamiento crónico con **IGS 2.7**. Este análisis se realizó en la lámina IX del asta ventral de la médula espinal a nivel lumbar (**Figura 66**), donde se encuentran las motoneuronas inferiores que regulan el movimiento de músculos proximales y distales, entre los que se encuentran los músculos de las extremidades posteriores.

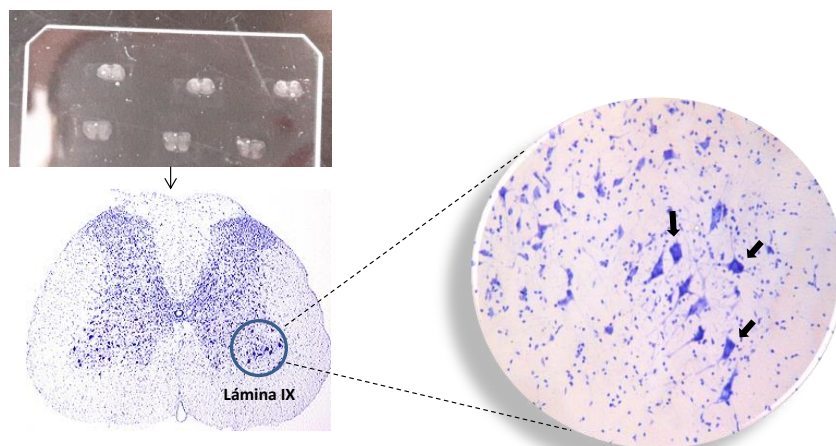


Figura 66. Secciones de la médula espinal de la porción lumbar (L4-L6). Ampliación de la lámina IX en donde se encuentran las motoneuronas inferiores marcadas con la tinción de Nissl (flechas negras).

Para ello se realizaron cortes de 20 μm en las secciones L4-L6 de la médula espinal con un criostato y se analizó el estado de las motoneuronas mediante la detección de los cuerpos de Nissl y la colina acetiltransferasa (ChAT). En el primer caso se realizó una tinción con violeta de cresilo, un colorante básico que tiñe las estructuras basófilas citoplasmáticas formadas por cúmulos de retículo endoplasmático rugoso con alto contenido en ARN, conocidos como los cuerpos de Nissl (**Figura 66**). En el segundo caso, se realiza un marcaje específico de motoneuronas colinérgicas mediante la detección por inmunofluorescencia de la enzima implicada en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina: la colina acetiltransferasa o ChAT.

El recuento de motoneuronas se realizó contando por un lado las motoneuronas ChAT inmunopositivas y por otro las que presentaban una fuerte tinción de los cuerpos de Nissl en la lámina IX del hasta ventral de la médula espinal. En ambos casos se observó una pérdida del 30-40% de motoneuronas en los ratones transgénicos TDP43-Veh en comparación al grupo silvestre WT-Veh, que fue capaz de prevenir de forma significativa el tratamiento con **IGS2.7** al haber un 80% de neuronas motoras positivas para estos marcadores (**Figura 67**).

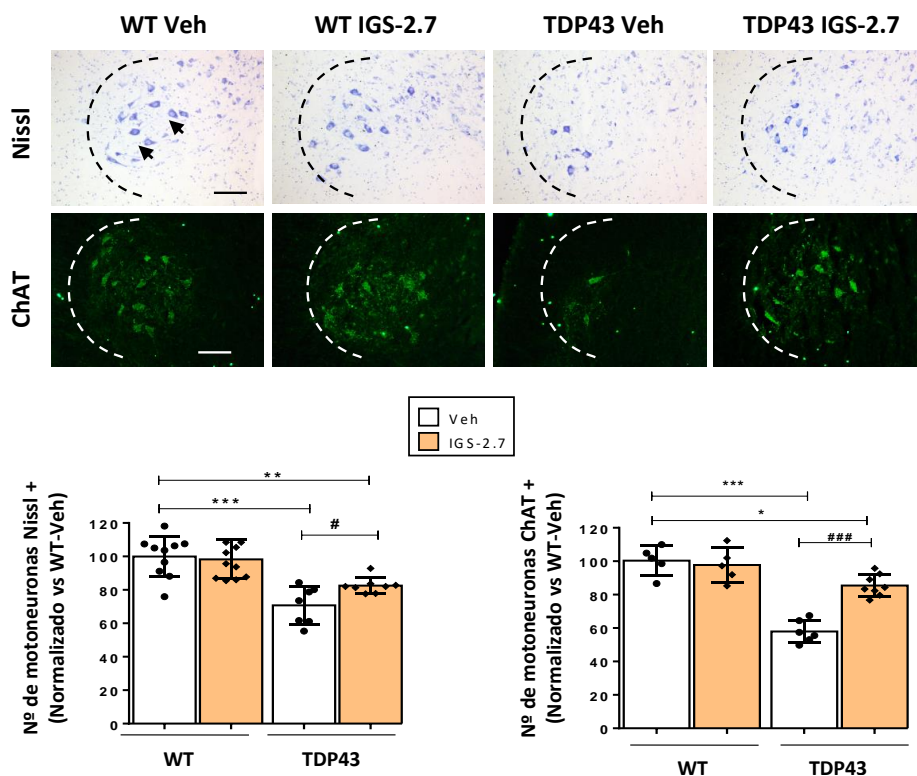


Figura 67. Cuantificación del número de motoneuronas marcadas con la tinción de Nissl (flechas negras) o inmunohistoquímicamente con un anticuerpo específico de la colina acetiltransferasa (ChAT) en la lámina IX del hasta ventral de la médula espinal (porción lumbar) en ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con IGS2.7 o el vehículo. Barras de escala de las imágenes representativas: 200 μm . ($N \geq 6$ animales por grupo) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

Con el objetivo de analizar si existe una correlación entre el efecto neuroprotector observado a nivel de médula espinal y los niveles de fosforilación de TDP-43, se evaluó la cantidad de proteína expresada y el estado de fosforilación de la misma en la médula espinal de los ratones. Para ello se procedió a la extracción del contenido proteico de la porción lumbar y se cuantificaron por WB los niveles de TDP-43 fosforilada en las Ser409/410, así como el contenido total de TDP-43. En la **Figura 68a** se aprecia como cabía esperar, una mayor expresión de TDP-43 en la médula espinal de ambos grupos de ratones transgénicos en comparación a los silvestres. Asimismo, se observa un aumento de la fosforilación de la proteína completa y la presencia de fragmentos fosforilados de 25 y 35 KDa en los ratones TDP43-Veh (**Figura 68b**), característica patológica presente en los tejidos *post mortem* de humanos.⁶⁴ Este aumento de la fosforilación de TDP-43 así como la presencia de los fragmentos de menor peso molecular, se vio reducido de manera significativa en los ratones que fueron tratados de forma crónica con el inhibidor de CK-1 (**Figura 68b**).

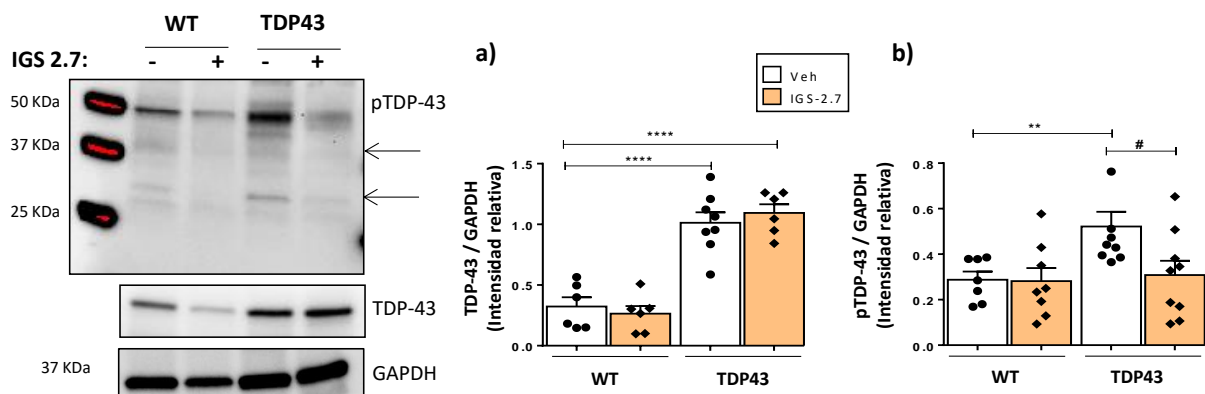


Figura 68. Niveles de TDP-43 total y fosforilada en las Ser409/410 presente en la sección lumbar de la médula espinal de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con IGS2.7 o el vehículo analizado por WB. (N ≥ 6 animales por grupo) (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh. # $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

Finalmente, basándonos en estudios previos en donde los inhibidores de CK-1 estudiados presentaron un buen perfil antiinflamatorio en cultivos primarios de microglía y astrocitos murinos,²⁵¹ se procedió al análisis del estado de activación de estas células gliales mediante técnicas inmunohistoquímicas marcando proteínas cuya expresión aumenta en estado reactivo, específicas de la microglía (Iba-1) y astrocitos (GFAP). Los resultados muestran la presencia significativa de microgliosis y astrogliosis en los ratones TDP43-Veh en comparación a los grupos silvestres, mientras que el tratamiento con **IGS2.7** reduce parcialmente la activación de los

astrocitos y de forma completa la activación de la microglía hasta niveles similares a los del grupo WT-Veh (Figura 69).

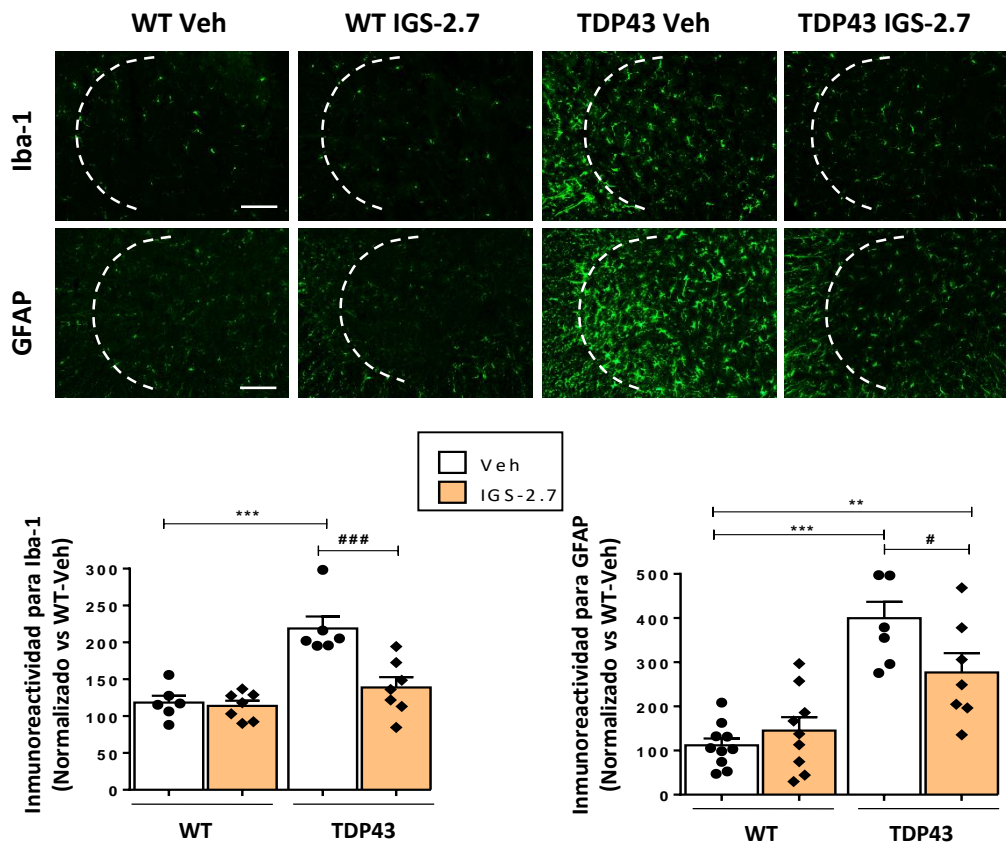


Figura 69. Estado de activación de la microglía (Iba-1) y astrocitos (GFAP) en la médula espinal a nivel lumbar de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con IGS2.7 o el vehículo analizado con técnicas inmunohistoquímicas. $N \geq 6$ animales por grupo. Barras de escala de las imágenes representativas: 200 μm . (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

Todos estos datos sugieren que la inhibición de CK-1 con el derivado de benzotiazol IGS-2.7 modula la toxicidad de TDP-43 *in vivo* al atenuar la pérdida de peso típica de este modelo, al evitar la muerte de las neuronas motoras espinales reduciendo la fosforilación y fragmentación de TDP-43, y al revertir la reactividad glial que afecta tanto a las células microgliales como a los astrocitos.²³⁴ Además, las motoneuronas preservadas estarían involucradas en la unión muscular ya que, la colina acetiltransferasa utilizada para su cuantificación, es una enzima esencial en la formación de sinapsis neuromusculares en mamíferos.²⁶⁶ Por ello, se podría estar confirmando la hipótesis previamente planteada por la que el resultado negativo obtenido en el test de Rotarod es debido al malestar provocado por la obstrucción intestinal y no a la debilidad muscular.

Es cierto que la recuperación de estos parámetros en líneas generales no es completa sino parcial, lo que enfatiza la necesidad de optimizar mejor este tratamiento, ya sea variando la dosis utilizada o combinando **IGS-2.7** con algún otro agente neuroprotector.

Recientemente, se ha iniciado el estudio preliminar de eficacia del inhibidor de CK-1, IGS-2.7, con respecto al único tratamiento paliativo aprobado para la ELA, Riluzol, y a su vez la posible sinergia de ambos fármacos en la modulación de TDP-43 a través de un tratamiento concomitante con ambos compuestos. Este hecho es importante pensando en una futura fase clínica del inhibidor de CK-1 y la imposibilidad de eliminar Riluzol como tratamiento habitual de los pacientes. Recientemente, se ha publicado la inhibición de Riluzol frente a CK-1 δ , con un valor de Cl_{50} de 16 μ M,²⁶⁷ casi cuatro órdenes de magnitud mayor que la correspondiente a IGS-2.7. El estudio se ha llevado a cabo en las líneas linfoblásticas de pacientes con ELAe. Para el tratamiento de Riluzol, se seleccionó una dosis utilizada en varios estudios anteriores y relacionada con la dosis administrada a los pacientes. Esta fue de 5 μ M. La dosis inicial utilizada para IGS-2.7 fue la misma que la establecida para los ensayos *in vitro* realizados en los modelos descritos anteriormente (5 μ M). Para el tratamiento concomitante se establecieron dos condiciones: Riluzol (5 μ M) + IGS-2.7 (5 μ M) y Riluzol (2.5 μ M) + IGS-2.7 (2.5 μ M). Este estudio se llevó a cabo en linfoblastos de 4 pacientes con ELAe y un control sano. Como resultado se pudo observar una bajada significativa en la fosforilación patológica de TDP-43 con las 4 condiciones establecidas en las células de los pacientes con ELAe en comparación al individuo control. No obstante, no se apreciaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ni efecto sinérgico de ambos compuestos a ninguna de las dos concentraciones con respecto al efecto individual de cada uno de ellos (**Figura 70a**).

Ante estos resultados, se planteó un segundo experimento en donde se redujo la dosis del tratamiento conjunto Riluzol (1 μ M) + IGS-2.7 (1 μ M) y la concentración individual de IGS-2.7 (2.5 μ M). En el caso de IGS-2.7 se esperaba seguir viendo un efecto modulador puesto que esta dosis sigue estando por encima de su Cl_{50} (23 nM). Como resultado se observó una bajada significativa tanto del tratamiento individual con Riluzol e IGS-2.7, como del concomitante siendo más notable el efecto de la sinergia de ambos compuestos a la hora de reducir la fosforilación patológica de TDP-43 (**Figura 70b**). Este resultado es muy relevante puesto que abre la posibilidad de un efecto terapéutico importante con dosis más bajas de ambos fármacos. Por otra parte, el hecho de que el Riluzol esté modulando la fosforilación de TDP-43, plantea la hipótesis de que podría estar actuando a través de alguna vía de señalización implicada en la fosforilación de esta proteína diferente a CK-1, ya que la dosis utilizada en el ensayo está muy por debajo de su Cl_{50} . Se están

llevando a cabo estudios adicionales para determinar potenciales proteínas quinasas implicadas en la fosforilación patológica de TDP-43 y moduladas por Riluzol.

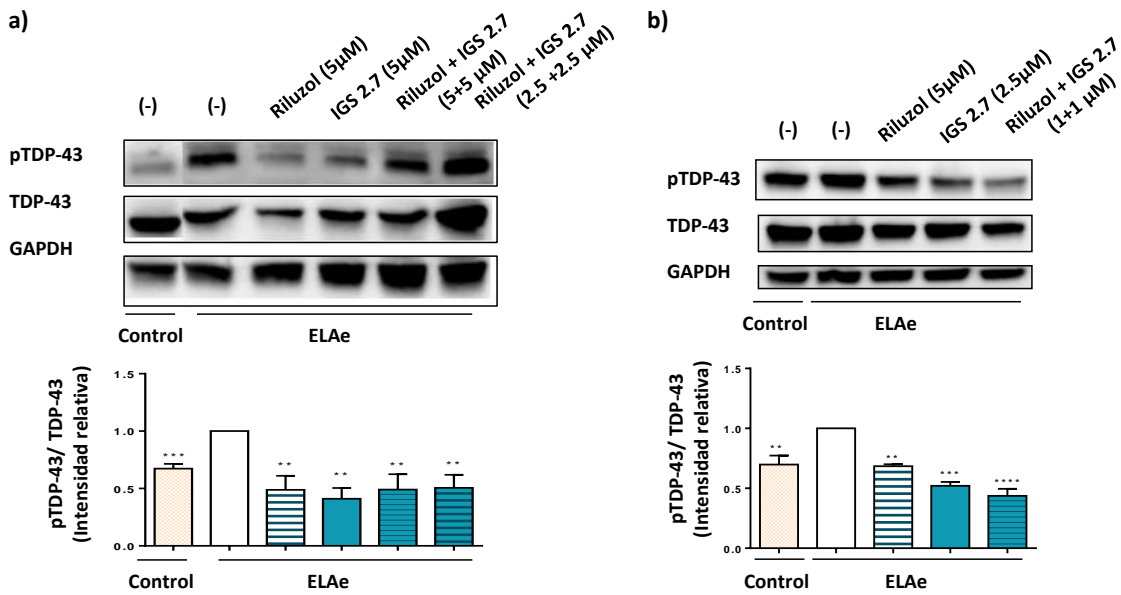


Figura 70. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de pTDP-43 en presencia o ausencia del tratamiento en los linfoblastos de 4 pacientes con ELAe y 1 control. a) Riluzol (5 μ M), IGS-2.7 (5 μ M), Riluzol + IGS-2.7 (5 μ M +5 μ M), Riluzol + IGS-2.7 (2.5 μ M +2.5 μ M). b) Riluzol (5 μ M), IGS-2.7 (2.5 μ M), Riluzol + IGS-2.7 (1 μ M +1 μ M). Los valores representan la media \pm SEM de 2 experimentos diferentes. (** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

Finalmente, se determinó también si esta combinación sinérgica era capaz de reestablecer la homeostasis de TDP-43. Para ello, se evaluó la localización celular de esta proteína mediante técnicas inmunocitoquímicas, observándose una mayor concentración de TDP-43 en el citosol de los linfoblastos de los pacientes con ELAe en comparación al individuo control, que fue capaz de ser revertida tras el tratamiento con IGS 2.7 (2.5 μ M) y en mayor medida por el tratamiento concomitante de IGS 2.7 y Riluzol (1 μ M + 1 μ M). Sin embargo, el Riluzol por sí solo no fue capaz de reestablecer la localización nuclear de TDP-43 observándose mayor concentración de esta proteína en el citoplasma celular (**Figura 71**).

En conclusión de estos resultados y puesto que la acumulación de TDP-43 en el citosol de las motoneuronas es una característica patológica presente en un 97% de los pacientes con ELA,⁴⁷ proponemos el tratamiento simultaneo de IGS-2.7 y Riluzol como una buena estrategia terapéutica para la ELA, ya que la administración conjunta de ambos compuestos presenta un efecto más notable a la hora de reestablecer la homeostasis de TDP-43, que la administración individual de cada uno de ellos en los linfoblastos de pacientes con ELAe.

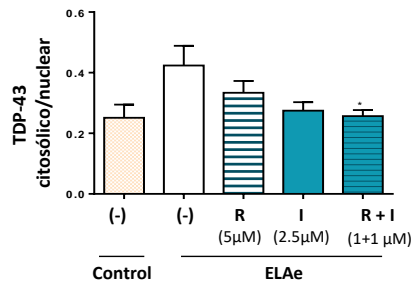
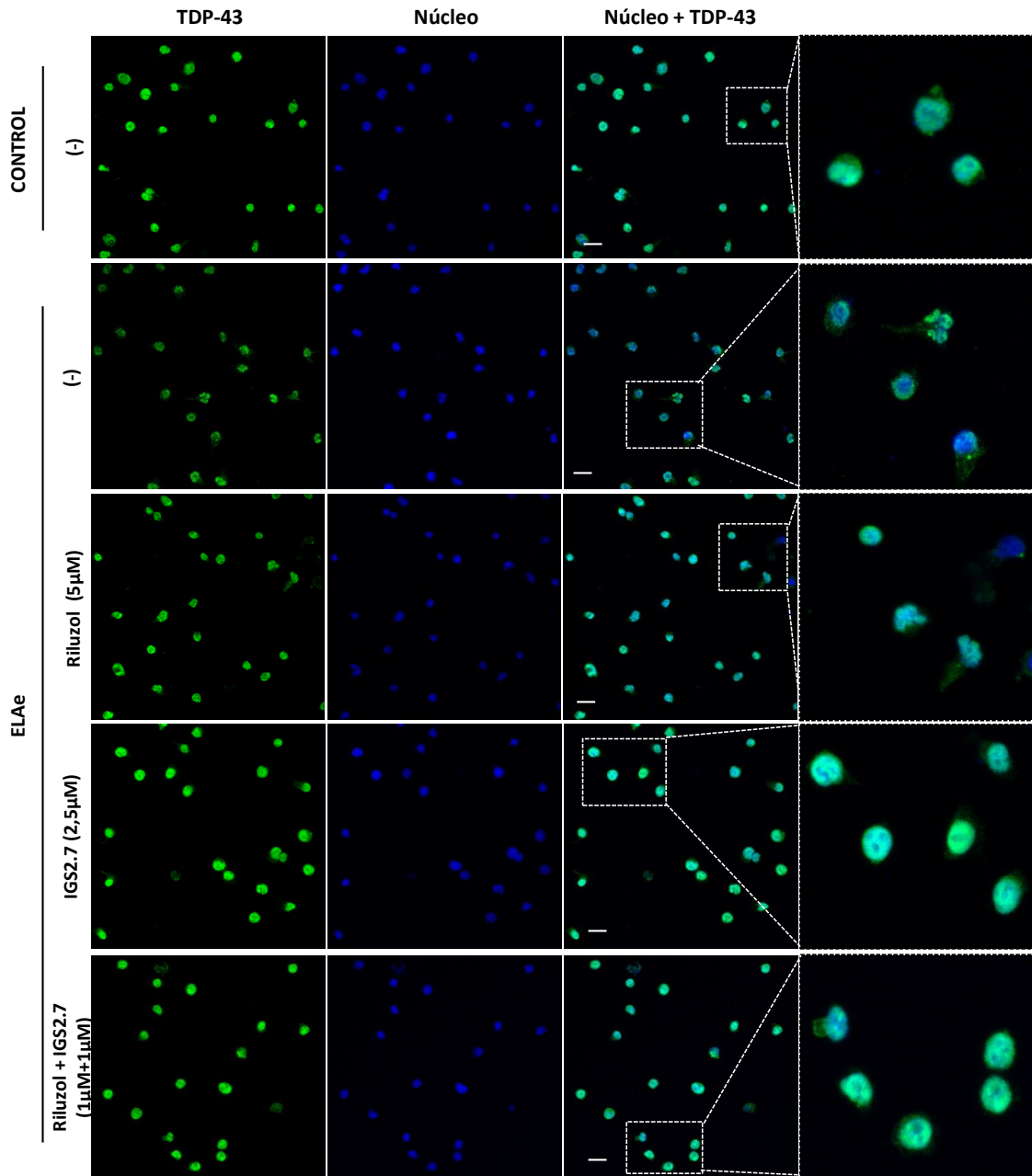


Figura 71. Detección y cuantificación mediante técnicas inmunocitoquímicas de la localización subcelular de TDP-43 (verde) en linfoblastos de 4 pacientes con ELAe y un control en presencia o ausencia de tratamiento (R: Riluzol, I: IGS-2.7). DAPI fue utilizado como marcador nuclear (azul). Barras de escala de las imágenes representativas: 15 μm. Los valores representan la media ± SEM de 2 experimentos diferentes. (* $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

Para poder trasladarlo a clínica en un futuro no lejano, se ha diseñado un estudio (actualmente en curso) en el modelo de ratón transgénico de TDP-43 (Prp-TDP43^{A315T}) en el que el principal objetivo es la evaluación del potencial neuroprotector del tratamiento concomitante de IGS-2.7 y Riluzol frente al tratamiento individual de cada compuesto.

3.3. Evaluación del potencial terapéutico de los inhibidores de CDC7 y TTBK1 *in vivo*

El efecto neuroprotector de los inhibidores de CDC7 y TTBK1 observado en los modelos celulares de ELA descritos en el capítulo anterior, fue evaluado en el modelo de ratón TDP-43^{A315T} con el objetivo de analizar el potencial terapéutico *in vivo*. En el ensayo se analizó en paralelo la eficacia del tratamiento crónico con el inhibidor de CDC7; **C24** y el inhibidor de TTBK1; **T25**, quedando establecidos de esta forma 6 grupos de estudio: 3 formados por ratones silvestres a los que se les administró el compuesto de estudio o vehículo para evaluar el posible efecto tóxico de la inhibición de la quinasa; WT-Veh, WT-C24, WT-T25 y 3 con ratones transgénicos; TDP43-Veh, TDP43-C24, TDP43-T25.

El diseño y monitorización del ensayo fue similar al descrito previamente para el inhibidor de CK-1 a diferencia de algunos parámetros como el tiempo de tratamiento y la dosis utilizada. En este caso, el ensayo pudo prolongarse en el tiempo ya que la esperanza de vida media de los animales aumentó como consecuencia de la disminución favorable de la obstrucción intestinal propia del modelo, al administrar comida gelatinosa fácilmente digerible. El tratamiento empezó en la fase pre-sintomática (día P65) y se administró durante 30 días consecutivos (P95) (**Figura 72**).

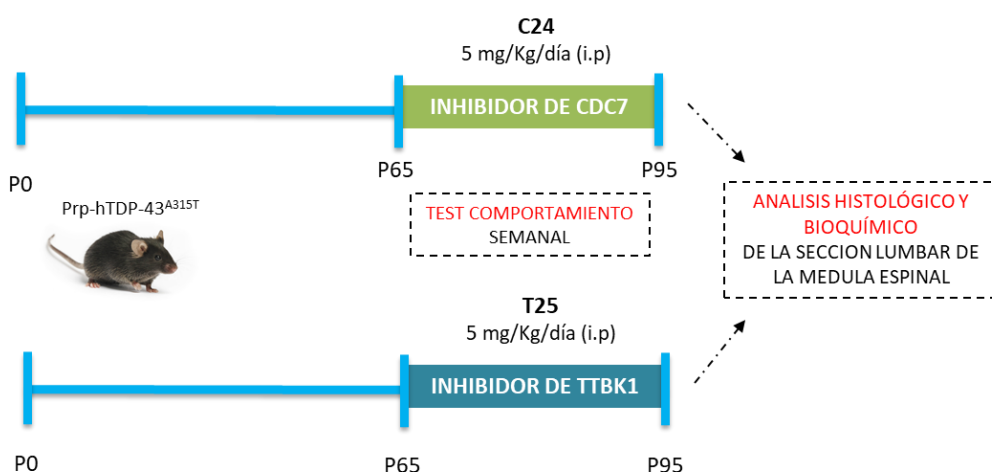


Figura 72. Diseño experimental del ensayo en el ratón transgénico TDP-43^{A315T} con el inhibidor de CDC7; C24 y el inhibidor de TTBK1; T25 (i.p: intraperitoneal).

La dosis administrada en ambos casos fue de 5 mg/kg/día intraperitonealmente. Esta dosis ha sido seleccionada en base a la CI_{50} (del orden submicromolar) que presentan ambos compuestos y a los resultados obtenidos en los estudios realizados en los modelos celulares descritos en el capítulo anterior.

La coordinación y debilidad muscular se monitorizó durante el periodo de tratamiento con la prueba del Rotarod y con un test conocido como “Clasping” una vez por semana. El fenotipo motor denominado “clasping” refleja un componente de espasticidad en el cual se observan contracciones involuntarias o distonía de los miembros traseros del animal cuando son suspendidos por la cola. Mientras que la respuesta motora típica de un ratón cuando se le sostiene por la cola es la extensión de las patas traseras, los ratones que presentan *clasping* contraen sus patas hacia el tronco. Los parámetros establecidos para evaluar la afectación motora tienen un valor de 0 a 3 en función de si: 0) no contrae ninguna extremidad posterior; 1) contrae una extremidad; 2) contrae ambas extremidades; 3) contrae ambas extremidades y adopta una posición corporal encorvada, característica propia de la fase más severa de la enfermedad (**Figura 73**). Se considera un fenotipo *clasping* positivo cuando en un intervalo de 1 min de tiempo contrae una o las dos patas posteriores de forma reiterada.

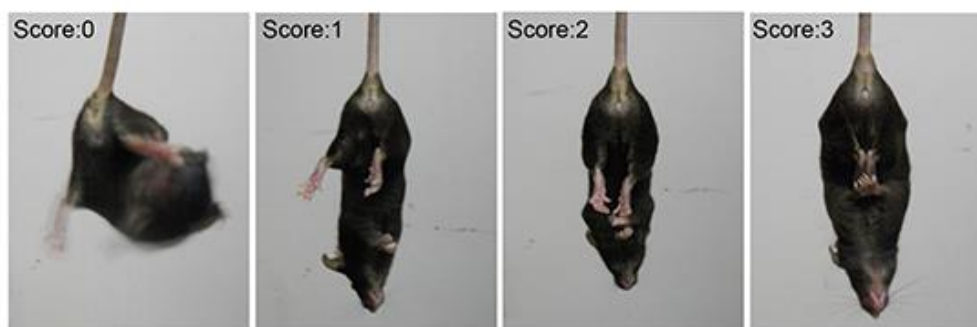


Figura 73. Prueba del *Clasping*. Valoración del grado de distonía que presentan los ratones en las extremidades posteriores. 0: no contrae ninguna extremidad posterior, 1: contrae una extremidad, 2: contrae ambas extremidades, 3: contrae ambas extremidades y adopta una posición corporal encorvada (*adaptada de Ref.268*).

Una vez finalizado el tratamiento, los animales se sacrificaron y se procedió al análisis bioquímico e histológico de la médula espinal.

3.3.1. Resultados de la evaluación de la inhibición de CDC7

En primer lugar, el registro del peso diario durante el periodo de tratamiento refleja una bajada significativa del mismo en los animales transgénicos frente a los silvestres, que no fue

capaz de prevenir el tratamiento crónico con el inhibidor de CDC7 (**Figura 74**). No se aprecia efecto tóxico del compuesto sobre el peso en todo el experimento.

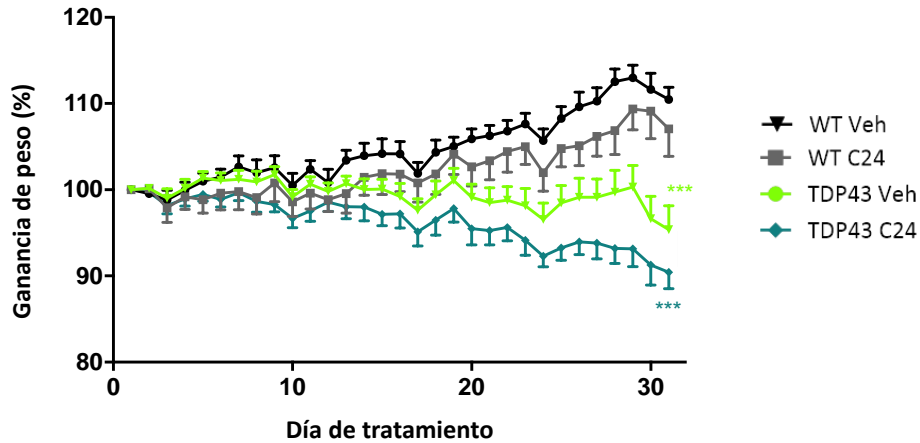


Figura 74. Registro del peso de los ratones silvestres (WT) y transgénicos (TDP43) durante los 30 días de tratamiento con el compuesto C24 o el vehículo. Los datos representan la media diaria del peso de los animales por grupo ($N \geq 6$ animales por grupo) (***) $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

La evaluación de la afectación motora y espasticidad mediante la prueba del *clasp*ing resultó en una mejora altamente significativa en los animales tratados con **C24**, siendo especialmente notable en la tercera semana de tratamiento en donde todavía no se apreciaban síntomas motores (**Figura 75a**). Aunque la distonía fue progresivamente aumentando en las últimas semanas, a término, los animales tratados seguían presentando una mejora significativa en este parámetro en comparación al grupo TDP43-Veh. Asimismo, las diferencias que aparecieron desde la segunda semana entre los TDP43-Veh y los WT-Veh, no aparecieron en el grupo de ratones transgénicos tratados con **C24** hasta la cuarta semana de tratamiento (**Figura 75a**).

En la prueba del Rotarod, se observó un incremento significativo en el tiempo que permanecen los ratones TDP43-C24 encima del rodillo en comparación a los TDP43-Veh en la última semana del ensayo (**Figura 75b**). La inhibición de CDC7 no tuvo efecto negativo en la coordinación motora de los animales silvestres.

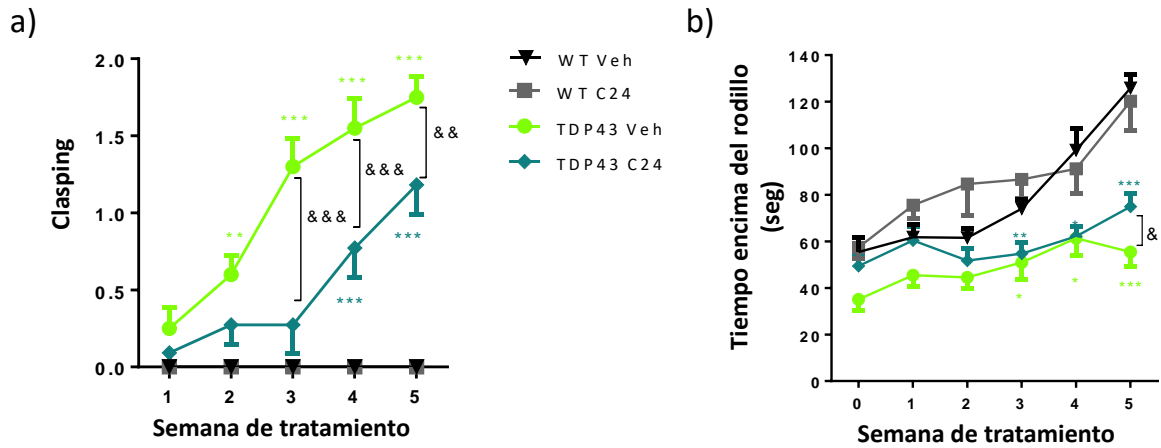


Figura 75. Pruebas comportamentales. Los resultados del *claspings* (a) y del Rotarod (b) de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con C24 o el vehículo. (N ≥ 6 animales por grupo) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh y $^{\delta}p < 0.05$, $^{\delta\delta}p < 0.01$ $^{\delta\delta\delta}p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

A pesar de los prometedores datos comportamentales de los animales tratados con este compuesto, a nivel histológico el tratamiento con **C24** no consigue prevenir la degeneración de las motoneuronas observándose, al igual que en los ratones TDP43-Veh, una muerte de aproximadamente el 40% de las neuronas motoras (**Figura 76**). El número de motoneuronas analizado mediante ambas técnicas (tinción de Nissl e inmunohistoquímica con anti-ChAT), fue similar (**Figura 76**). El hecho de que no haya una correlación positiva entre la eficacia del tratamiento en la coordinación motora de los animales TDP43-C24 y el número de motoneuronas inferiores en la médula espinal podría deberse a que la inhibición de CDC7 está ejerciendo un efecto neuroprotector a nivel de la unión neuromuscular. Es decir, el tratamiento con **C24** podría estar preservando el botón sináptico de las motoneuronas que no se han visto afectadas, favoreciendo la inervación del músculo y en definitiva el tono muscular. Las motoneuronas son capaces de inervar una amplia placa motora y si su unión neuromuscular está preservada podría estar explicando la atenuación de los síntomas motores observada en el grupo tratado. Por el contrario, en los animales TDP43-Veh la unión neuromuscular se estaría viendo afectada produciéndose la pérdida de inervación de la musculatura de las extremidades y en consecuencia la aparición del fenotipo motor severo que caracteriza a estos ratones.

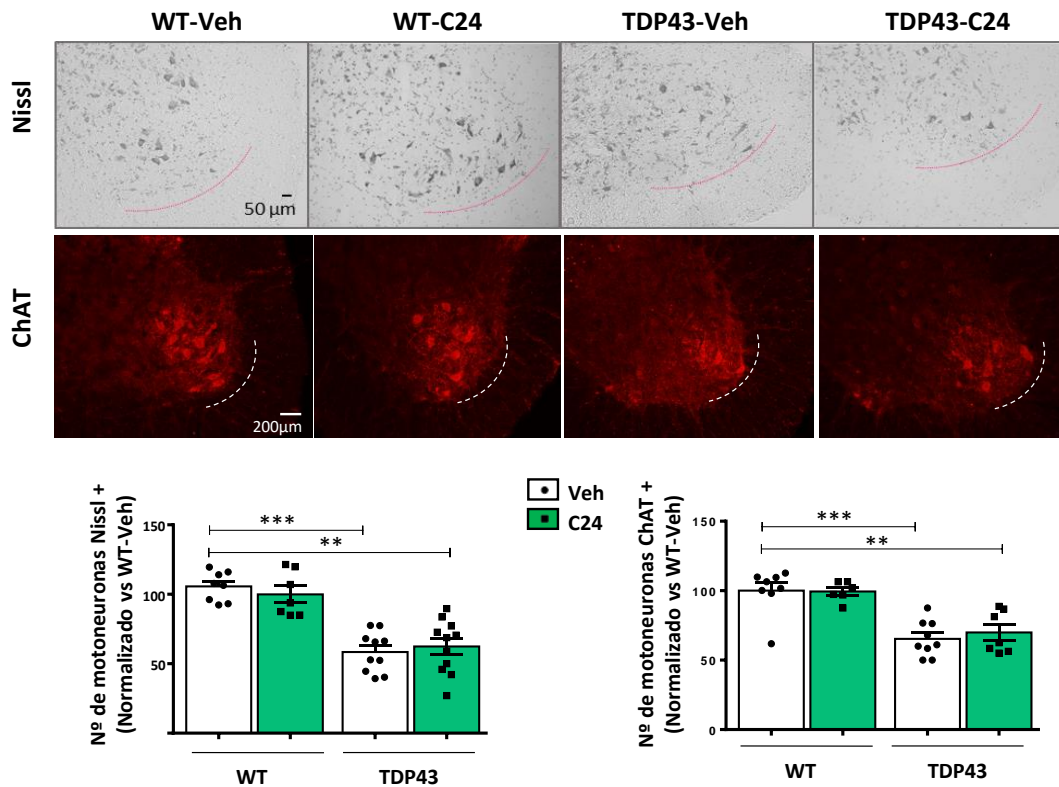


Figura 76. Cuantificación del número de motoneuronas marcadas con la tinción de Nissl o inmunohistoquímicamente con un anticuerpo específico de ChAT, en la lámina IX del asta ventral de la médula espinal (porción lumbar) de ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con C24 o el vehículo. (N ≥ 6 animales por grupo) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

A continuación, con el objetivo de validar *in vivo* el efecto observado en los diferentes modelos estudiados en el capítulo anterior, se procedió al análisis del estado de fosforilación de TDP-43. En primer lugar, se detectó el mismo nivel de expresión de TDP-43 en ambos grupos de animales TDP43-Veh y TDP43-C24, siendo tres veces superior a la de los ratones silvestres (**Figura 77a**). Al analizar el estado de fosforilación de la proteína, se observó una bajada significativa de pTDP-43 en los ratones tratados con el inhibidor de CDC7 con respecto al grupo TDP43-Veh (**Figura 77b**). Esta es la primera vez que se describe la modulación de pTDP-43 en el ratón transgénico Prp-hTDP-43^{A315T} tras el tratamiento con un inhibidor de CDC7 y confirma de esta manera su potencial terapéutico así como el efecto sobre la modulación de TDP-43 que presentó **C24**, y otros inhibidores de esta quinasa, en los linfoblastos de pacientes con ELA y en el modelo desarrollado en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y.

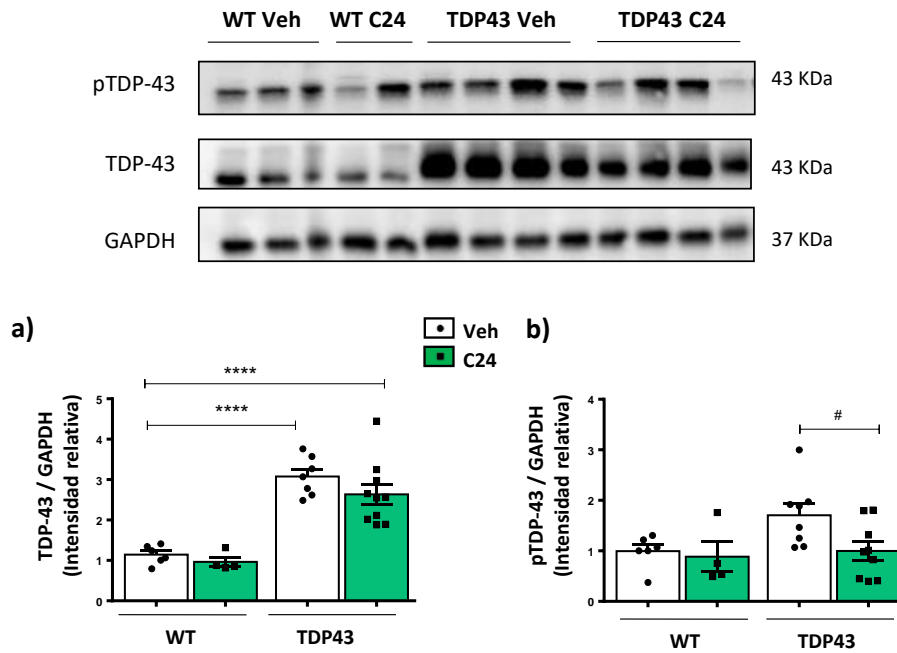


Figura 77. Niveles de TDP-43 total y fosforilada en las Ser409/410 presente en la sección lumbar de la médula espinal de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con C24 o el vehículo analizado por WB. (N ≥ 6 animales por grupo) (**** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; # $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

El siguiente paso fue el estudio del efecto antiinflamatorio de **C24** *in vivo*. Para ello se analizaron inmunohistoquímicamente las secciones de médula espinal de los ratones con los anticuerpos específicos de la microglía y astrocitos reactivos (Iba-1 y GFAP, respectivamente).

La inhibición de CDC7 tras el tratamiento con **C24** resultó en una ligera mejoría de la astrogliosis de los animales tratados. Aunque no se observen diferencias significativas entre los dos grupos de ratones transgénicos, sí que se pierde un nivel de significancia cuando se compara TDP43-C24 con el grupo control WT-Veh (**Figura 78a**). En el estudio de la microgliosis no se observó un efecto aparente del inhibidor **C24**, mostrando una reactividad similar en ambos grupos de ratones transgénicos (**Figura 78b**). En cualquier caso, y con el fin de confirmar o no los datos encontrados previamente para los cultivos primarios de microglía descritos en el capítulo anterior, se estudió si esta activación de la microglía se corresponde con un fenotipo proinflamatorio M1 o por el contrario neuroprotector M2. Para ello, se procedió a la evaluación de los marcadores propios de cada fenotipo en los extractos proteicos de la médula espinal a nivel lumbar mediante la técnica de WB.

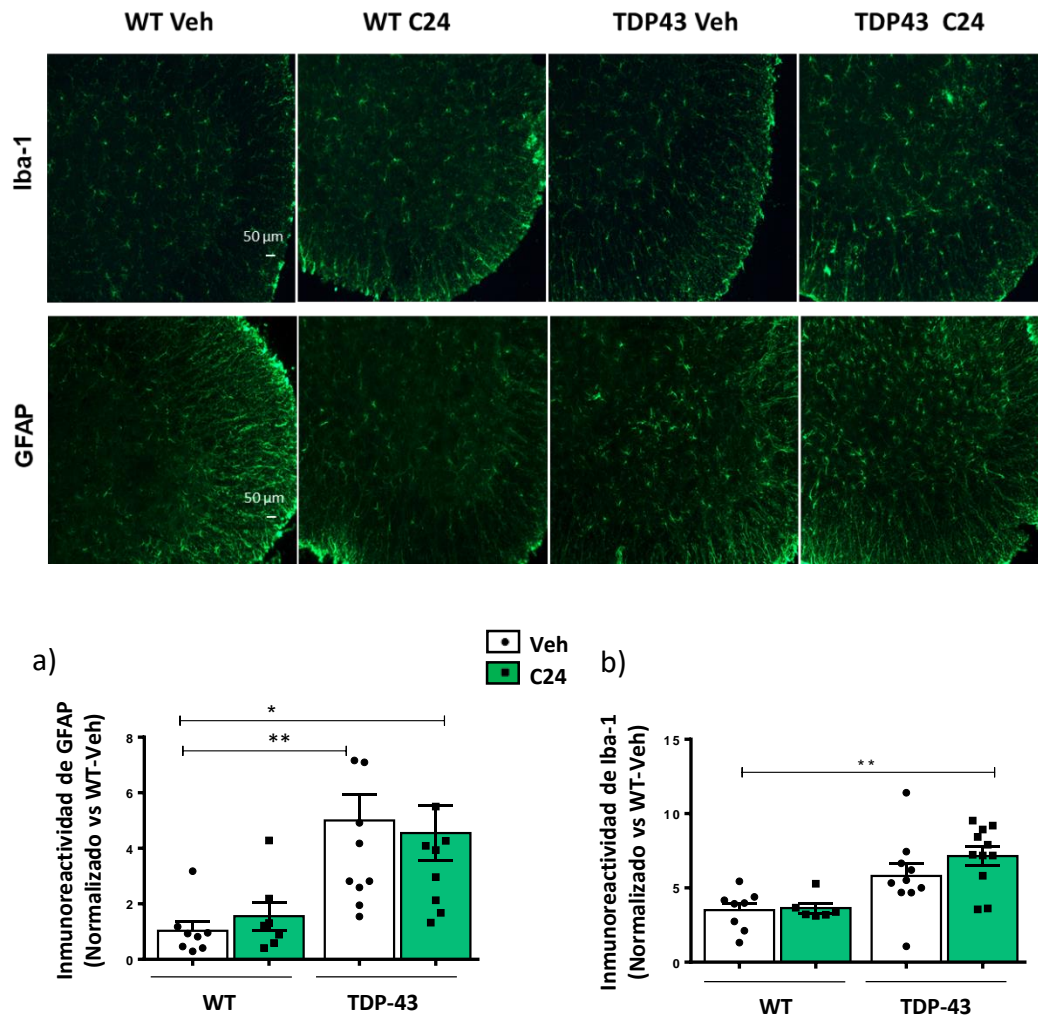


Figura 78. Estado de activación de la microglía (Iba-1) y astrocitos (GFAP) en la médula espinal a nivel lumbar de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con C24 o el vehículo analizado con técnicas inmunohistoquímicas. (N ≥ 6 animales por grupo) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

Los resultados obtenidos muestran un ligero aumento no significativo en la expresión de TREM2 (biomarcador del fenotipo antiinflamatorio M2) en los ratones transgénicos tratados con respecto a los TDP43-Veh (**Figura 79a**). Aunque no se observa una clara disminución de la enzima iNOS (marcador del fenotipo proinflamatorio M1) (**Figura 79b**), al hacer el ratio TREM2/iNOS se detecta una mínima tendencia del fármaco a potenciar el fenotipo neuroprotector (**Figura 79c**), lo que estaría en concordancia con lo reportado en los estudios previos de inmunomodulación realizados en cultivos primarios de microglía murina.

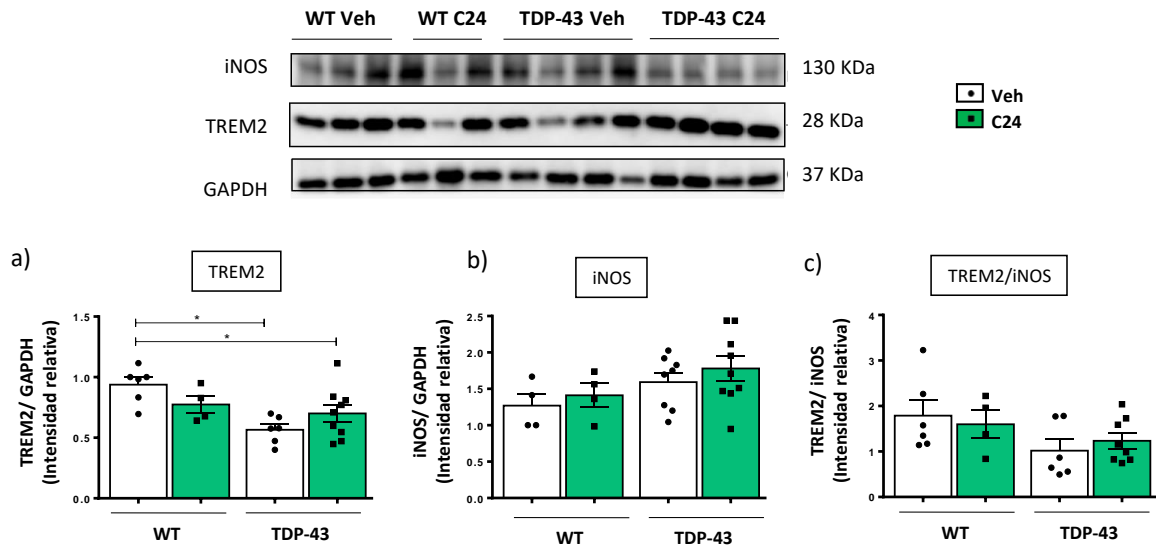


Figura 79. Efecto inmunomodulador del tratamiento con C24 o vehículo en los ratones silvestres (WT) y transgénicos (TDP43) analizado por WB. iNOS marcador del fenotipo M1 de la microglía y TREM2 del fenotipo M2. (N ≥ 4 animales por grupo) (*p < 0.05 con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

En conclusión, el inhibidor de CDC7 **C24** es capaz de atravesar la BHE, como había sido predicho con la metodología PAMPA, y llegar a su diana en el SNC, en donde ejerce un efecto neuroprotector. Este se refleja en el retraso de la aparición de los síntomas motores y en la atenuación de la distonía propia del modelo. A su vez, el efecto neuroprotector frente a la hiperfosforilación de TDP-43 que presentó el compuesto **C24** en los modelos celulares de ELA, se ha visto confirmado en el modelo de ratón TDP-43^{A315T} al reducir la fosforilación patológica de TDP-43 *in vivo* a nivel de médula espinal. Esta bajada en la fosforilación tóxica de TDP-43 también se observó en un estudio realizado simultáneamente en un modelo de *C.elegans* que sobreexpresa hTDP-43 al tratar a los gusanos con el inhibidor **C24**.²¹⁸ Ante estos resultados se puede proponer a los inhibidores de CDC7 como potenciales candidatos a fármaco para el tratamiento de aquellas patologías que cursen con la proteinopatía de TDP-43 como la ELA y la DFT.

3.3.2. Resultados de la evaluación de la inhibición de TTBK1

Se siguió el diseño experimental descrito anteriormente y el perfil del registro de pesos de los animales sometidos al tratamiento con el inhibidor de TTBK1 no mostró ningún efecto tóxico en los animales silvestres, ni favorable en los transgénicos a la hora de prevenir la pérdida de peso (**Figura 80**).

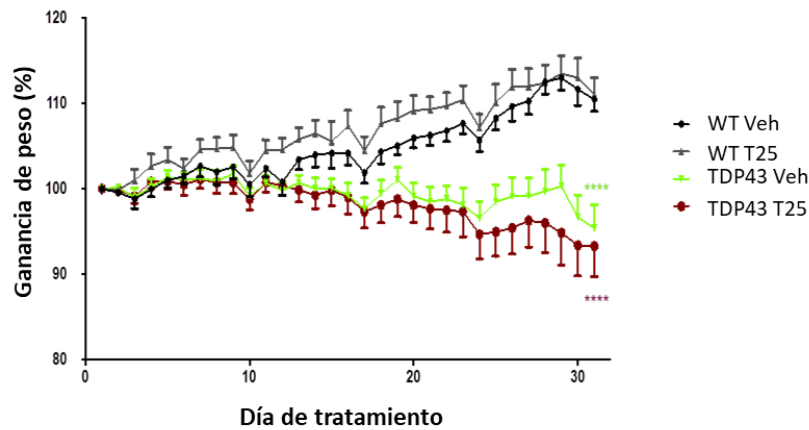


Figura 80. Registro del peso de los ratones silvestres (WT) y transgénicos (TDP43) durante los 30 días de tratamiento con el compuesto T25 o el vehículo. Los datos representan la media diaria del peso de los animales por grupo (N ≥ 6 animales por grupo) (**** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

A nivel de comportamiento, la afectación motora evaluada mediante el estudio de *claspings* o de Rotarod no presenta una mejora significativa con el tratamiento a punto final. No obstante, cabe destacar que el inhibidor de TTBK1 fue capaz de prevenir la distonía propia de los ratones transgénicos durante la primera semana de tratamiento (**Figura 81a**). En ese periodo, apareció ya una diferencia significativa entre los ratones TDP43-Veh y los WT-Veh, que por el contrario no se detectó entre los TDP43-C24 y los WT-Veh hasta la tercera semana del ensayo. En las semanas consecutivas, este efecto se pierde apareciendo un comportamiento similar al del grupo TDP43-Veh (**Figura 81a**). En el test de Rotarod, la inhibición de TTBK1 no consiguió mejorar la coordinación motora de estos animales ni siquiera tras la primera semana del estudio (**Figura 81b**).

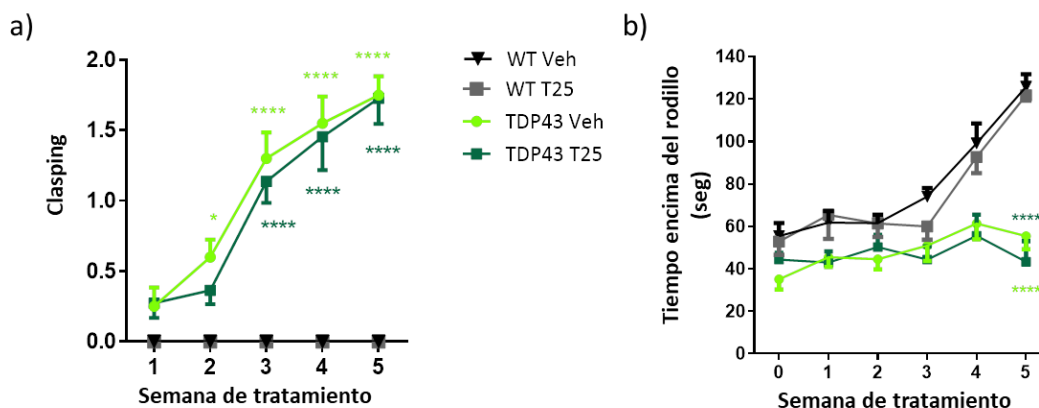


Figura 81. Pruebas comportamentales. Los resultados del *claspings* (a) y del Rotarod (b) de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con T25 o el vehículo. (N ≥ 6 animales por grupo) (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh).

A nivel histológico, el tratamiento con **T25** resultó ser bastante eficaz en la neuroprotección de las motoneuronas espinales de los animales transgénicos. El recuento de este tipo de neuronas mediante ambas técnicas (tinción de Nissl e inmunofluorescencia con ChAT) ha resultado en un aumento significativo del número de neuronas motoras colinérgicas en los animales TDP43-T25 en comparación a los TDP43-Veh. (**Figura 82**). Los animales silvestres tratados con el compuesto **T25** no mostraron ningún efecto toxico en la supervivencia de las motoneuronas.

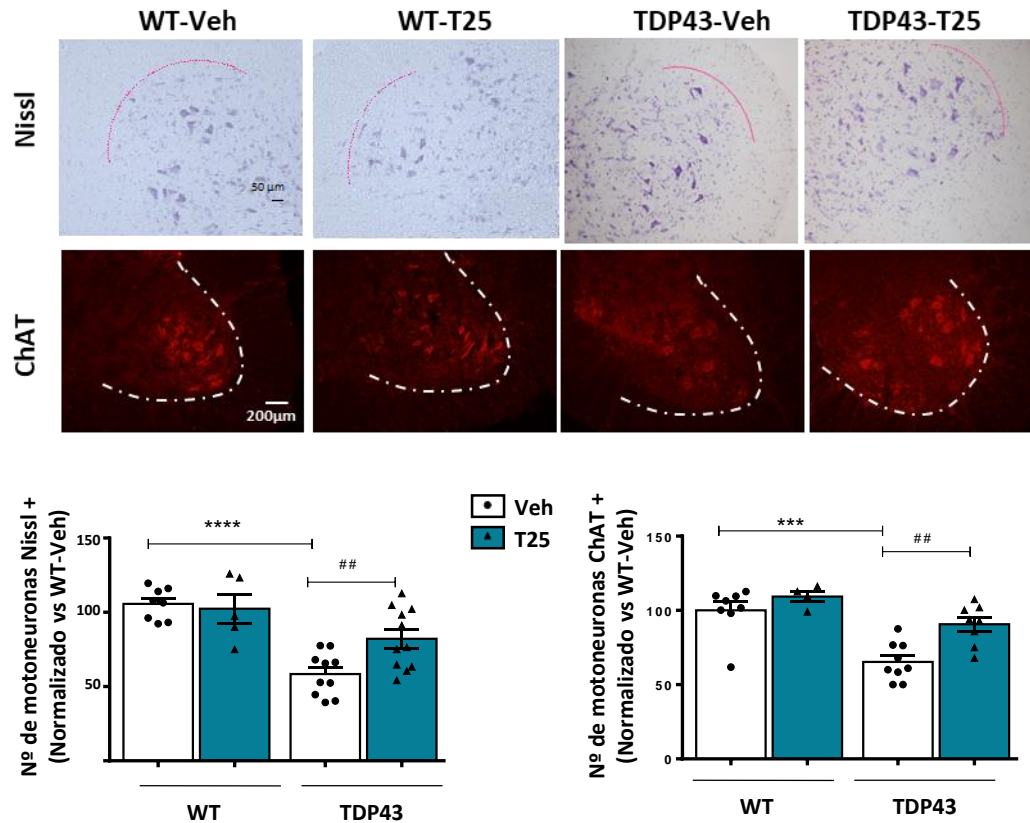


Figura 82. Cuantificación del número de motoneuronas marcadas con la tinción de Nissl o inmunohistoquímicamente con un anticuerpo específico de ChAT, en la lámina IX del hasta ventral de la médula espinal (porción lumbar) de ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con T25 o el vehículo. (N ≥ 6 animales por grupo) (**** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; ## $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

Ante estos resultados se plantea la hipótesis de que el efecto neuroprotector que está produciendo el tratamiento en los animales transgénicos a nivel de médula espinal, no se ve reflejado en la coordinación motora porque, contrario a lo que sucede con el inhibidor de CDC7, se está viendo alterada la unión neuromuscular y en consecuencia la pérdida del tono muscular reflejada en la aparición de los síntomas motores. Para verificar dicha hipótesis habría que realizar un estudio adicional en donde evaluar el estado de la unión neuromuscular.

El siguiente paso fue la comprobación de la posible correlación entre el efecto neuroprotector observado a nivel de médula espinal y el potencial de **T25** para modular la neurotoxicidad de TDP-43 fosforilada en las Ser409/410. Para ello se analizó por WB el grado de expresión de TDP-43 así como el estado de fosforilación de la misma en la médula espinal de los ratones. Como resultado se observó un aumento en los niveles de TDP-43 fosforilada en los ratones transgénicos en comparación a los silvestres, que en el caso de los ratones TDP43-T25, se vieron reducidos de forma significativa en respuesta al tratamiento (**Figura 83a**). El nivel de expresión de TDP-43 es el mismo en ambos grupos de animales transgénicos (**Figura 83b**).

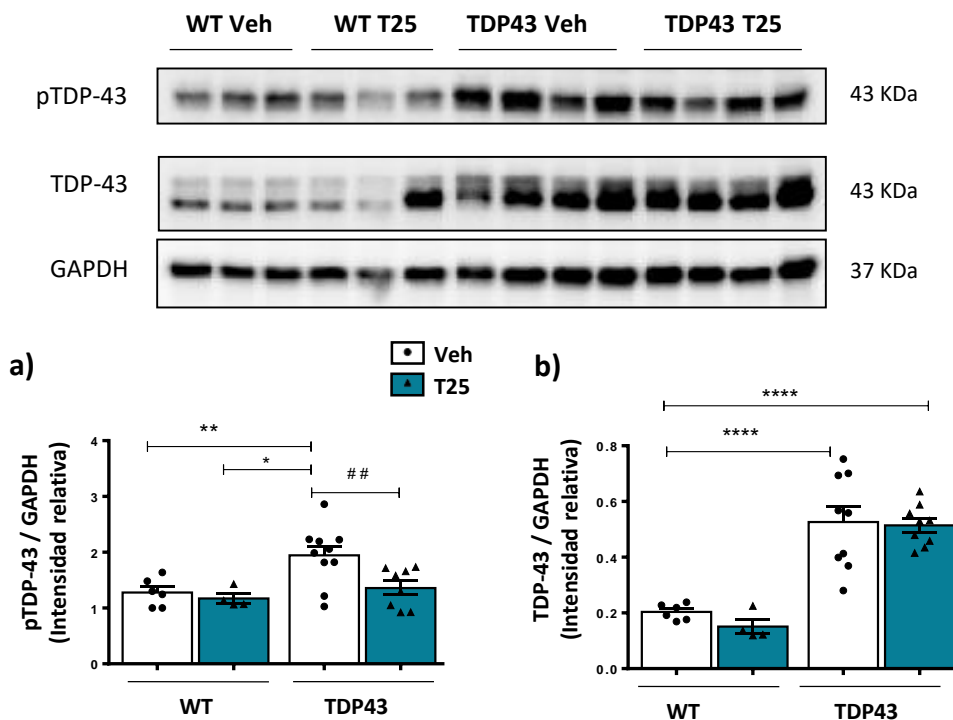


Figura 83. Niveles de TDP-43 total y fosforilada en las Ser409/410 presente en la sección lumbar de la médula espinal de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con T25 o el vehículo analizado por WB. (N ≥ 6 animales por grupo) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; ## $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

Finalmente, se procedió a la evaluación del potencial antiinflamatorio de **T25** mediante el análisis del estado de activación de la microglía y astrocitos en la médula espinal de los ratones.

La inhibición de TTBK1 resultó en una disminución significativa de la microgliosis en los ratones TDP43-T25 frente a los ratones TDP43-Veh llegando a un estado de activación similar al encontrado en los ratones silvestres (**Figura 84a**). El estudio de la astrogliosis marcó una tendencia a la baja en el número de atrocitos reactivos en los animales tratados con el inhibidor,

que, aunque no es estadísticamente significativa, pierde un nivel de significancia respecto a los WT-Veh (**Figura 84b**).

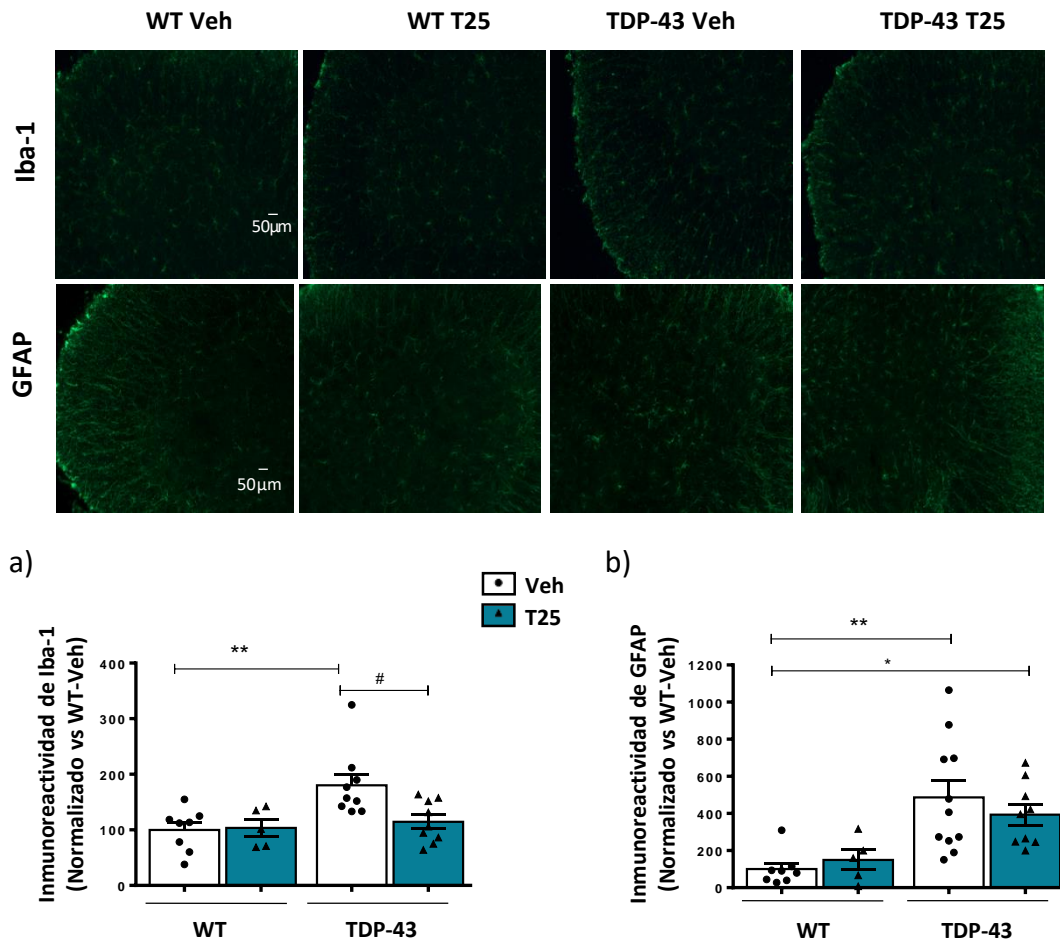


Figura 84. Estado de activación de la microglía (Iba-1) y astrocitos (GFAP) en la médula espinal a nivel lumbar de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con T25 o el vehículo analizado con técnicas inmunohistoquímicas. (N ≥ 6 animales por grupo) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; # $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

El potencial inmunomodulador analizado mediante la expresión de los marcadores propios de cada fenotipo de la microglía (M1: iNOS y M2: TREM2), resultó en una disminución de la enzima iNOS acompañado de un aumento significativo en la expresión de TREM2 en los ratones TDP43-T25 (**Figura 85a**). Por lo tanto, el tratamiento con el inhibidor de TTBK1 **T25** está potenciando el cambio de una microglía proinflamatoria que favorece la degeneración de las neuronas, a una microglía antiinflamatoria/neuroprotectora tal y como se observa al hacer el ratio TREM2/iNOS (**Figura 85b**). Estos resultados confirman el efecto inmunomodulador

observado en el modelo inflamatorio de cultivos primarios de microglía de rata descrito en el capítulo anterior.

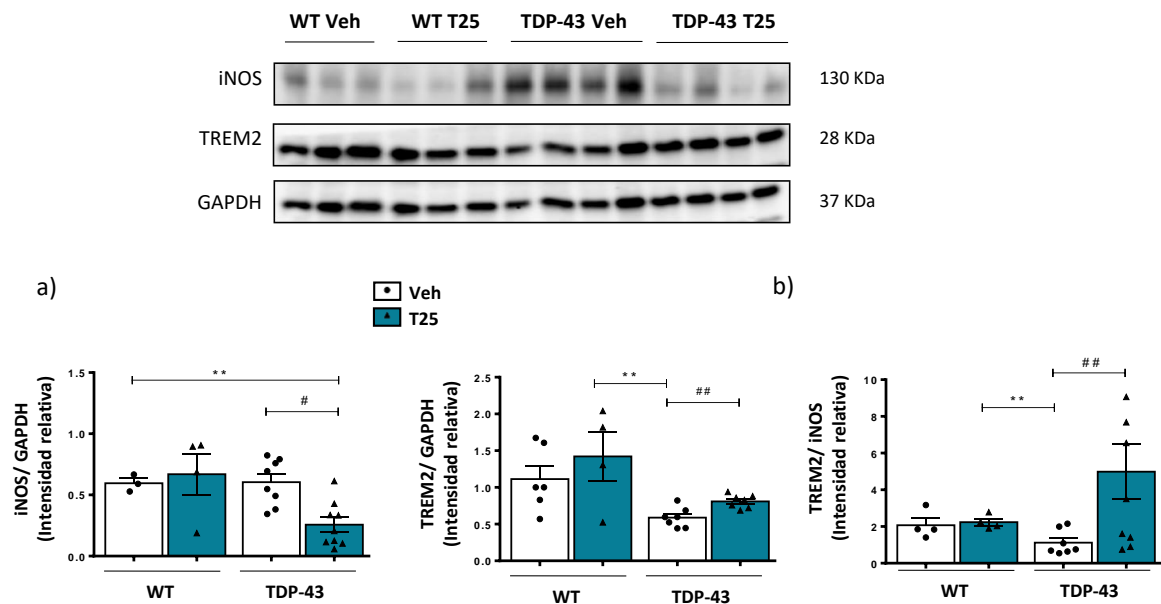


Figura 85. Efecto inmunomodulador del tratamiento con T25 o vehículo en los ratones silvestres (WT) y transgénicos (TDP43) cuantificado por WB. iNOS marcador del fenotipo M1 de la microglía y TREM2 del fenotipo M2. (N ≥ 4 animales por grupo) (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

En conclusión, el tratamiento con el inhibidor de TTBK1 **T25** presenta un efecto neuroprotector frente al daño causado por la sobreexpresión de TDP-43^{A315T} en el ratón, reflejado en la preservación significativa del número de motoneuronas presentes en la porción lumbar de la médula espinal. Este efecto es consecuencia de la sinergia de varios procesos intra e intercelulares como es la bajada en de la fosforilación patológica de TDP-43 mediante la inhibición de TTBK1, así como el efecto inmunomodulador que presenta **T25** al inducir el cambio del fenotipo proinflamatorio de la microglía (M1) al antiinflamatorio reduciendo de esta forma la liberación de citoquinas proinflamatorias y otros factores que contribuyen a la degeneración neuronal. Sin embargo, este efecto no fue suficiente para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas motores propios de la enfermedad. Ante esta realidad se plantea la hipótesis de que se esté viendo afectada la unión neuromuscular, ya que el número de motoneuronas que inervan las extremidades posteriores no se está viendo alterado en comparación a los ratones silvestres. Para comprobar dicha hipótesis habrá que modificar el diseño del estudio optimizando la dosis activa e incluyendo en el análisis el estado de la unión neuromuscular.

Todos los resultados descritos son prometedores y avalan la inhibición de las quinasas que modulan la fosforilación patológica de TDP-43 descrita en la mayoría de pacientes con ELA,⁷² como una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de esta proteinopatía y en concreto para la ELA. Es importante señalar que es la primera vez que se administra a este modelo de ratón transgénico (Prp-hTDP-43^{A315T}) un tratamiento farmacológico basado en la inhibición de quinasas. Por ello, y para poder dar el salto a la clínica habría que realizar estudios adicionales en otro modelo murino y posteriormente en modelos de otra especie de rango superior, optimizando el tratamiento o incluso combinándolo con otro agente neuroprotector como es el Riluzol.

CAPÍTULO 4

Reposicionamiento de Tideglusib como tratamiento para la ELA

4. REPOSICIONAMIENTO DE TIDEGLUSIB COMO TRATAMIENTO PARA LA ELA

La relevancia que adquiere la búsqueda de fármacos para la ELA surge como consecuencia de la falta de terapias efectivas, ya que los dos únicos fármacos aprobados para esta devastadora enfermedad tan solo alargan la vida del paciente de 3 a 6 meses. Si bien el desarrollo de un fármaco es un proceso de larga duración con un elevado coste económico, el reposicionamiento de fármacos cuya seguridad en humanos es conocida, bien porque estén en ensayos clínicos o porque ya hayan sido aprobados por las agencias reguladoras, es la estrategia más rápida.²⁶⁹

En los últimos años, el avance en la optimización de las propiedades de los candidatos a fármaco mediante diferentes aproximaciones y metodologías con el fin de acelerar el largo proceso del desarrollo de un fármaco, ha reducido notoriamente la elevada tasa de fracaso encontrada en clínica. No obstante, la búsqueda de nuevas aplicaciones terapéuticas a fármacos cuya seguridad en humanos ya ha sido estudiada, para aquellas enfermedades que no tienen tratamiento, o que lo tienen pero no es efectivo, sigue siendo la mejor estrategia para minimizar el coste y acelerar dicho proceso.²⁷⁰

Por ello, consideramos una buena aproximación la búsqueda de nuevas aplicaciones terapéuticas a Tideglusib, un fármaco que nació en este grupo de investigación y cuya seguridad y eficacia ha sido probada en humanos en diferentes ensayos clínicos para la enfermedad de Alzheimer,^{271,208} parálisis supranuclear progresiva,²⁷² autismo y distrofia miotónica.^{273,274} Actualmente se encuentra en fase clínica II/III pre-aprobatoria para distrofia miotónica congénita. Tideglusib es un inhibidor ATP-no competitivo de GSK-3 β que fue diseñado en el grupo de investigación dentro de un programa de química médica enfocado al desarrollo de inhibidores de GSK-3 β como potenciales fármacos para todas aquellas patologías, principalmente neurológicas, que presentan un aumento anómalo de la actividad de esta quinasa.²⁷⁵

GSK-3 β es una de las principales quinasas involucradas en los mecanismos patológicos de enfermedades humanas muy importantes tales como la diabetes, cáncer, trastornos del estado de ánimo y diversas enfermedades neurodegenerativas.²⁷⁶ Esta serina/treonina quinasa está implicada en la regulación de numerosas vías de señalización relacionadas con la expresión génica, la estructura celular, inflamación y apoptosis.²⁷⁷ Es una quinasa muy conservada en diversas especies. En humanos tiene una expresión ubicua y era conocida desde los años 70 por estar involucrada en la síntesis del glucógeno. A final del siglo pasado, se descubrió su expresión también en el SNC donde juega un papel fundamental en los procesos fisiológicos neuronales. El aumento de la expresión y actividad de GSK-3 β se ha asociado con la degeneración y muerte

neuronal en diversas enfermedades como la EA y la EP al fosforilar de forma anómala las proteínas tau y α -sinucleína respectivamente, marcadores patológicos de estas enfermedades neurodegenerativas.²⁷⁸

4.1. GSK-3 β y ELA

GSK-3 β es también considerada como posible diana terapéutica para la ELA desde que se describió por primera vez un aumento anómalo en la expresión y actividad de esta quinasa en muestras de pacientes con ELA y en diferentes modelos celulares y animales que recapitulan esta enfermedad.^{181,184} Concretamente, en el año 2003 un estudio en donde se analizó el grado de expresión de 78 quinasas en muestras *post mortem* de pacientes con ELA, reveló un aumento de del 220% de la forma hiperactiva de GSK-3 β (GSK-3 β -pTyr216) en la médula espinal a nivel torácico de estos individuos en comparación a los controles sanos.¹⁸² Más adelante, otro estudio describió un aumento tanto de la expresión como de la actividad de GSK-3 β en el lóbulo frontal y temporal de la corteza cerebral de pacientes con ELAe y con un tipo de ELA que cursa con deterioro cognitivo.¹⁸³

En el año 2013, con el objetivo de buscar biomarcadores en tejidos periféricos para el diagnóstico y estudio de la evolución de la enfermedad, este grupo de investigación en colaboración con el Hospital Carlos III de Madrid, analizó el estado de GSK-3 β en células mononucleares de sangre periférica de 44 pacientes con ELAe. A su vez se analizó la posible correlación entre los niveles de esta quinasa y la progresión de la enfermedad evaluada mediante el parámetro conocido como ALSFRS-R o escala revisada de valoración funcional de la ELA. La ALSFRS-R es una medida basada en la evaluación de aspectos neurológicos y funcionales de los pacientes que se utiliza en ensayos clínicos para monitorizar la progresión de la enfermedad. Como resultado del estudio se obtuvo un aumento significativo de GSK-3 β en los pacientes con respecto a los individuos sanos observándose a su vez una correlación negativa entre los niveles de expresión de esta quinasa y los valores de ALSFRS-R, es decir, se detectaron mayores niveles de GSK-3 β en aquellos pacientes que presentaban una sintomatología más acusada (**Figura 86**).²⁰⁵

En diversos modelos celulares y animales tanto de ELA familiar como esporádica, se ha demostrado que el tratamiento con compuestos que tienen actividad inhibitoria frente a GSK-3 β , atenúa los síntomas motores y restaura los procesos celulares alterados como consecuencia de la enfermedad.

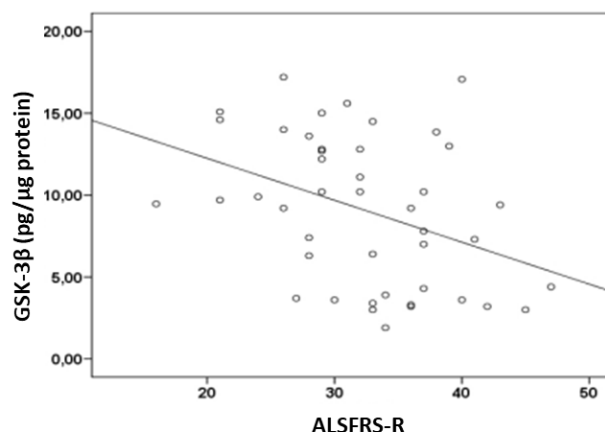


Figura 86. Relación entre los valores obtenidos de ALSFRS-R y los niveles de GSK-3 β en sangre periférica de 44 pacientes con ELA. *Pearson's r*: -0.39; *P*:0.01. (Adaptada de Ref.200).

En el caso de los modelos celulares, el tratamiento con inhibidores de GSK-3 β en cultivos de motoneuronas murinas ya sean transfectadas con plásmidos que llevan integrada la proteína mutada SOD-1 (A4V, G93A) o procedentes de células madre embrionarias de ratones que *per se* llevan inserta la mutación, ha resultado no solo en restaurar los niveles de GSK-3 β cuya expresión se había visto aumentada, sino que además disminuye significativamente la muerte celular en presencia de inhibidores de GSK-3 β .^{279,189} Este aumento de la supervivencia celular también se observó en motoneuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas de pacientes con ELA que fueron tratadas con Kenpaulona.¹⁸³

En relación a la proteínopatía de TDP-43, la inhibición de la actividad enzimática de GSK-3 β disminuyó de forma selectiva la concentración de gránulos de estrés que contienen TDP-43 en un modelo celular en donde la formación de éstos se induce mediante un estímulo estresante. En este mismo estudio se observó una disminución en la concentración celular de los fragmentos citotóxicos del extremo C-terminal de TDP-43 al tratar las células con inhibidores de GSK-3 β (**Figura 16**).⁸²

En relación a los modelos animales, el aumento anómalo de los niveles y/o actividad de GSK-3 β se ha descrito en determinados modelos desarrollados en moscas transgénicas que sobreexpresan diferentes formas de TDP-43 mutada,^{280,281} y en diversos modelos murinos que emulan la ELA tanto familiar como esporádica.^{124,187,239} La inhibición de la actividad de esta quinasa en los diferentes modelos, ha resultado en líneas generales en un retraso de la aparición y atenuación de los síntomas motores que se correlaciona con el efecto neuroprotector observado a nivel histológico.

Ejemplo de ello es el modelo que desarrolló el grupo del Prof. Rosa María Arahuetes de la Facultad de Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid en colaboración con este de grupo de investigación. Este proyecto tenía como objetivo establecer un modelo de ELA esporádico basado en la exposición de los animales, en este caso ratas, a la toxina L-BMAA para poder estudiar la patología y a su vez evaluar el potencial farmacológico de los candidatos a fármaco en un modelo que representa al 90% de los pacientes con ELA. Como se comentó en la introducción, la exposición de los individuos a este aminoácido tóxico es una de las causas que desencadena el desarrollo de la ELA, de ahí que las zonas geográficas en donde abunda esta toxina tengan una incidencia de 50-100 veces superior, como es el caso de la Isla de Guam.⁷ Tras la optimización de los diferentes parámetros, se estableció un modelo que recapitula las características fisiopatológicas propias de la ELA como es la pérdida de volumen muscular de las extremidades traseras, una reducción de la corteza motora acompañado de una hipertrofia ventricular, una sintomatología neurológica típica, alteraciones a nivel mitocondrial y de retículo endoplásmico, un aumento en los niveles de TDP-43 y un incremento de la expresión y actividad de GSK-3 β en la médula espinal y en la corteza cerebral motora de las ratas (**Figura 88**).^{124,125}

Una vez establecido el modelo se procedió a evaluar, a modo de prueba de concepto, el potencial terapéutico de uno de los inhibidores de GSK-3 β diseñado y sintetizado en el grupo de investigación, conocido como VP-2.51. Los resultados obtenidos fueron muy positivos puesto que el tratamiento diario con este inhibidor durante 2 semanas, redujo de forma completa los síntomas neurológicos en aquellas ratas que fueron tratadas con este compuesto.¹⁸⁸

La inhibición de esta quinasa ha demostrado eficacia no solo en este modelo de ELAe sino también en modelos de ELA familiar. El tratamiento con inhibidores comerciales de GSK-3 β como el ácido valproico, inhibidor indirecto de GSK-3 β , o el compuesto AR-A014418 en el modelo murino de SOD-1^{G93A}, suprime en el primer caso la progresión de la enfermedad,¹⁸⁶ y en el segundo retrasa la aparición de los síntomas motores y prolonga la esperanza de vida de los animales de una manera dosis dependiente.¹⁸⁷ El litio, primer inhibidor descrito de GSK-3 β , presentó también un efecto neuroprotector en el modelo de ratón SOD-1^{G93A} reflejado en la conservación del número de motoneuronas, en la reducción de la astrogliosis y en el retraso del inicio y duración de la enfermedad viéndose asimismo prolongada la esperanza de vida de los animales.¹⁸⁵ Por otro lado, el silenciamiento o la disminución de la expresión de GSK-3 β en diversos modelos de mosca transgénica, reduce la toxicidad producida por la sobreexpresión de TDP-43 propia del modelo.^{282,281}

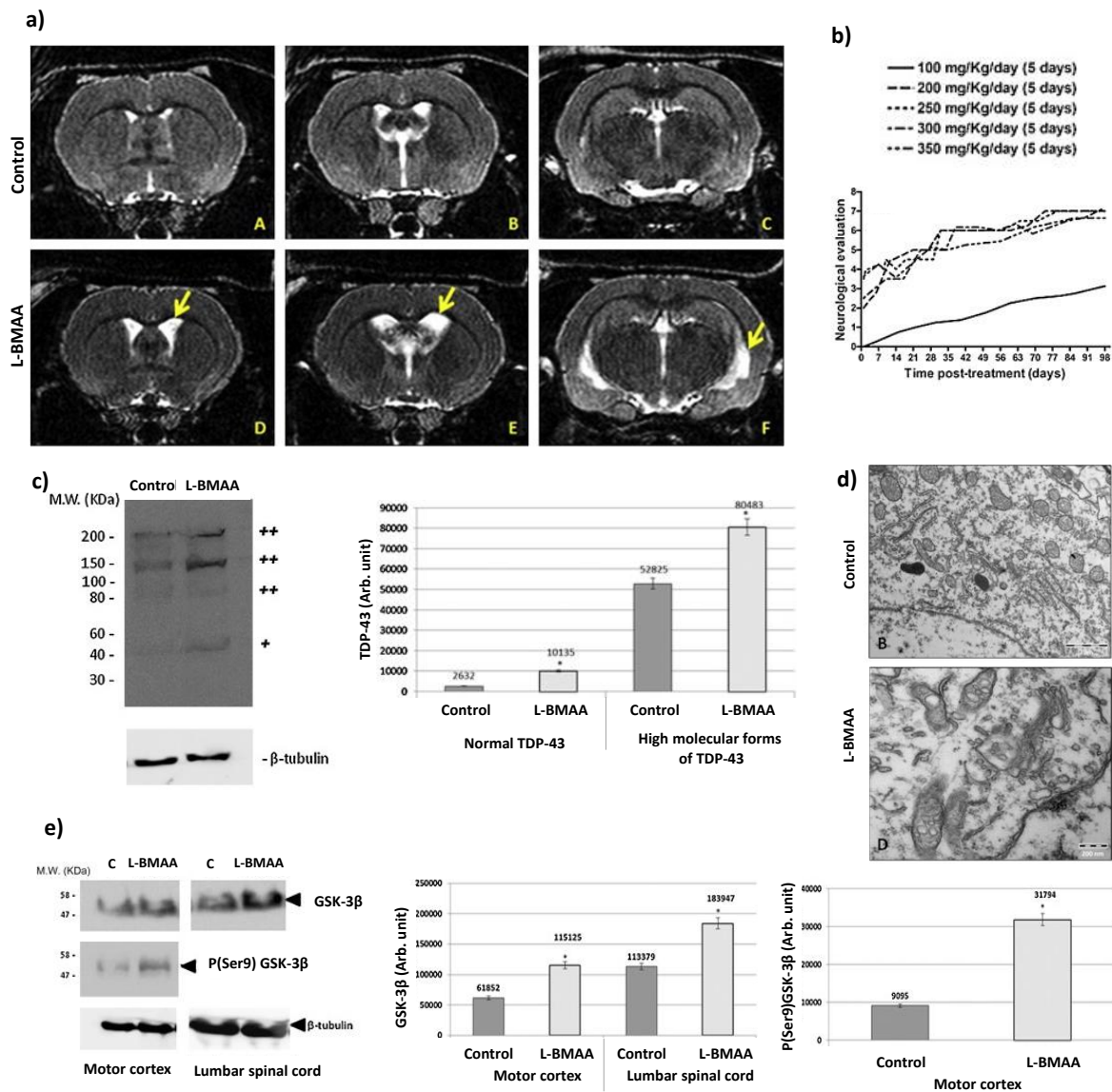


Figura 88. (Adaptada de Ref. 124 y 125) Caracterización del modelo de ELAe tras la exposición de las ratas a la toxina L-BMAA. a) Hipertrofia ventricular (flechas amarillas), b) evaluación neurológica, c) niveles de TDP-43 en la corteza cerebral, d) imágenes de microscopía electrónica de las mitocondrias y del retículo endoplásmico en las motoneuronas espinales, e) niveles de GSK-3 β y GSK-3 β -pSer9 en la corteza motora y en la médula espinal lumbar.

Ante estos resultados, y puesto que el litio y el ácido valproico son fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades neurológicas como la depresión, trastorno bipolar y epilepsia, se llevó a cabo el diseño de un ensayo clínico en el que se administró de forma conjunta el litio y el ácido valproico a 18 pacientes con ELAe (NCT03204500). Los resultados obtenidos fueron muy prometedores puesto que la supervivencia de los pacientes aumentó considerablemente en comparación a los individuos control reestableciéndose a su vez los parámetros de estudio relacionados con el estrés oxidativo y la excitotoxicidad.²⁸³ No obstante, este estudio se detuvo en

fase clínica 2 por el abandono de un tercio de los pacientes debido a los efectos adversos que sufrían como consecuencia en parte, de la elevada concentración de litio en sangre. Sin embargo, la inhibición de GSK-3 β no presentó ningún efecto tóxico aparente, por lo que la búsqueda de inhibidores de esta quinasa es una estrategia terapéutica prometedora,¹⁸⁴ por ello, el reposicionamiento de Tideglusib como tratamiento para la ELA podría ser un hecho accesible e inmediato puesto que la bioseguridad de este fármaco ya ha sido probada en humanos.

4.2. Antecedentes de Tideglusib

La búsqueda de fármacos para aquellas patologías que cursan con un aumento anómalo de la actividad y expresión de GSK-3 β , como la EA, EP y la parálisis supranuclear progresiva (PSP) entre otras, ha sido una de las líneas de investigación de este grupo durante años. Este proyecto comenzó a finales de los 90 con el desarrollo de un programa de química médica basado en el diseño y síntesis de pequeñas moléculas con actividad inhibitoria frente a GSK-3 β , cuyo objetivo es reducir la fosforilación anómala de aquellos sustratos considerados marcadores patológicos de este tipo de enfermedades, al agregar y precipitar en las células del SNC de los pacientes como consecuencia de esta modificación estructural. Entre estos sustratos se encuentran la proteína tau, biomarcador de enfermedades como EA, PSP y DFT, y α -sinucleína en la EP. Uno de los potenciales fármacos obtenidos con una Cl_{50} del rango bajo micromolar fue TDZD-8. Hoy en día TDZD8 está disponible comercialmente y es muy utilizado por la comunidad científica como herramienta farmacológica para estudiar el papel fisiológico y patológico de GSK-3 β en diversos modelos de la enfermedad.²⁸⁴ La transferencia de los resultados a la empresa NeuroPharma, optimizó las propiedades tipo fármaco de TDZD-8 con el fin de aumentar la semivida de este compuesto y poder llegar así a un candidato que pudiera ser administrado solo una vez al día. Así surgió NP031112, que luego se llamaría NP-12, VP-4.55 y al entrar en ensayos clínicos se denominó Tideglusib.²⁸⁵ Tras un estudio preclínico extenso en donde este compuesto mostró un efecto neuroprotector, antiinflamatorio y neurogénico en diferentes modelos celulares y animales de neurodegeneración,^{252,286} se propuso como candidato para evaluar su eficacia en clínica para aquellas enfermedades en las que el aumento anómalo de la actividad de GSK-3 β contribuye a la degeneración de las neuronas.

La primera vez que Tideglusib se administró a humanos fue en el año 2006 para demostrar su seguridad y comportamiento farmacocinético en voluntarios sanos. A continuación se inició un ensayo clínico fase II pivotal diseñado para el tratamiento de la **enfermedad de Alzheimer** (NCT00948259). El principal objetivo fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de este fármaco en

pacientes. La administración diaria del tratamiento durante un periodo de 20 semanas a una dosis creciente desde 400mg a 1000mg, no mostró indicio de toxicidad ni efectos adversos relevantes. A su vez, el tratamiento con Tideglusib, mostró una eficacia cognitiva en estos pacientes evaluada mediante una serie de pruebas que examinan el grado de demencia (MMSE) y el estado cognitivo y comportamental (ADAS-cog+).²⁷¹ Así pues, se inició en el 2011, un segundo ensayo fase II en la que el principal objetivo fue evaluar la eficacia de Tideglusib en pacientes con un Alzheimer leve-moderado que de rutina estaban recibiendo un tratamiento con inhibidores de acetilcolinesterasa (NCT01350362). El tratamiento se administró durante 26 semanas a una dosis de 500 o 1000 mg por día o cada dos días. Además de monitorizar la eficacia con las pruebas cognitivas (MMSE y ADAS-cog+) se evaluaron diferentes biomarcadores como niveles de la proteína tau fosforilada (p-tau), BACE1 y β -amiloide en LCR de los pacientes. Aunque la eficacia del tratamiento no llegó al ambicioso objetivo establecido en el diseño del estudio en los 226 individuos que recibieron el tratamiento con Tideglusib, en el análisis *post hoc*, se observó una mejora significativa a nivel cognitivo y en el grado de demencia en una cohorte de pacientes con Alzheimer leve, así como una reducción significativa de BACE1 y p-tau, y una tendencia, probablemente no significativa por el corto periodo de tratamiento de β -amiloide en LCF (**Figura 89**).²⁰⁸

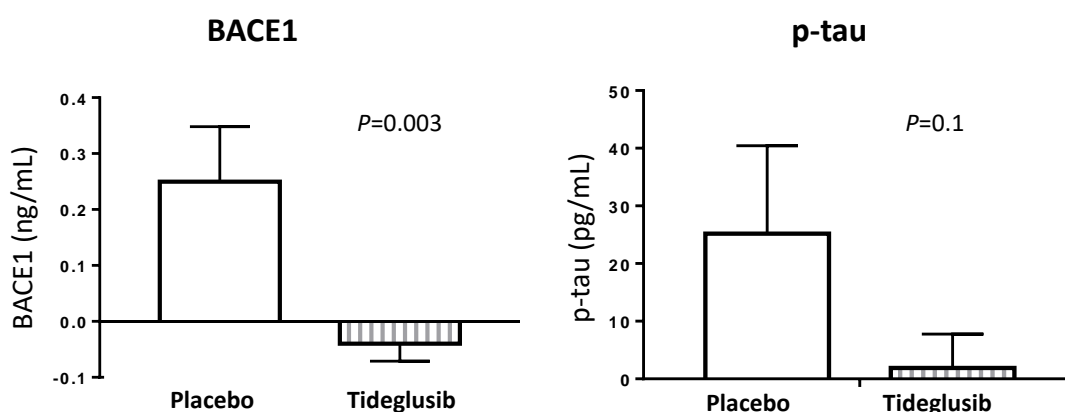


Figura 89. Niveles de BACE1 y p-tau en LCF de pacientes que recibieron el placebo (N=6) o Tideglusib (N=15) (adaptada de Ref. 208).

De forma simultánea se inició otro ensayo clínico en donde Tideglusib se propuso como tratamiento para la **parálisis supranuclear progresiva** o PSP (NCT01049399). Esta enfermedad neurodegenerativa cursa con afectación motora, siendo una de sus características neuropatológicas principales la acumulación de la proteína p-tau en las células neuronales de los pacientes, acompañado de un aumento en los niveles de expresión de GSK-3 β .²⁸⁷ La

administración diaria de Tideglusib durante 52 semanas produjo una disminución de la atrofia cerebral de forma dosis dependiente, demostrando una vez más que el fármaco es capaz de atravesar la BHE y llegar a su órgano diana en donde ejerce un efecto neuroprotector significativo.²⁷² Si bien el potencial terapéutico de este fármaco era evidente, la compañía que entonces tenía la patente de Tideglusib no pudo seguir con su desarrollo clínico, al cerrar esta empresa en la crisis económica del 2012.

Años más tarde, y tras la publicación del efecto terapéutico de los inhibidores de GSK-3 β en la mejora cognitiva de los animales modelo del síndrome de frágil X,²⁸⁸ la empresa Authism Therapeutics decide retomar el desarrollo de este fármaco, iniciando en el 2016 un ensayo clínico para evaluar la seguridad y eficacia de Tideglusib en niños que padecían el **trastorno del espectro autista** o TEA (NCT02586935). Este tipo de pacientes presentan patrones de conducta restringidos y repetitivos, y se caracterizan por las dificultades que tienen en la comunicación e interacción social. Los modelos animales diseñados para el estudio de esta patología presentan un aumento anómalo de la actividad de GSK-3 β , por ello Tideglusib se propuso como candidato a fármaco para este trastorno.²⁸⁹ Tras las 12 semanas de tratamiento, la conducta adaptativa de los niños evaluada mediante determinadas pruebas conductuales a las que se sumaron los comentarios de los propios padres, resultó en una mejora significativa en aquellos pacientes que recibieron como tratamiento Tideglusib.²⁷³ Así, este candidato a fármaco mostró una vez más una eficacia significativa en un trastorno neurológico caracterizado por la hiperactividad de GSK-3 β .

Por último, y tras la publicación de la relevancia de la inhibición de GSK-3 β en modelos de distrofia miotónica,^{290,291} se inició paralelamente en 2016 un ensayo clínico para la **distrofia miotónica congénita** (DMC). La DMC es una enfermedad neuromuscular compleja caracterizada por la debilidad y atrofia del músculo esquelético. GSK-3 β es considerada diana terapéutica de esta patología desde que se identificó un aumento en la expresión de esta quinasa en el músculo esquelético de estos pacientes.²⁹⁰ El potencial terapéutico tan relevante que presentó TDZD-8 en los modelos animales de DMC, llevó al diseño de un ensayo clínico reposicionando Tideglusib que reclutó a 16 pacientes con este trastorno (NCT02858908). La administración de Tideglusib durante 12 semanas resultó en una mejora de la función cognitiva, de los síntomas neuromusculares como la hipotonía y la fatiga, y de la capacidad para realizar actividades de la vida cotidiana.²⁷⁴ Los buenos resultados de esta fase II, unido a la eficacia mostrada en modelos animales de distrofia miotónica congénita de Tideglusib,²⁹² han llevado al diseño de la tercera y última fase que empezará con el reclutamiento de pacientes, en este caso niños con distrofia miotónica congénita, en cuestión de semanas (NCT03692312).²⁰⁶

El recorrido clínico que ha tenido Tideglusib en todas estas patologías que tienen en común el aumento de la expresión y actividad de GSK-3 β , se ha caracterizado por la seguridad y los signos de eficacia que ha mostrado, siendo capaz de penetrar al SNC y ejercer el efecto neuroprotector previamente observado en los estudios preclínicos de estas enfermedades. El hecho de que GSK-3 β se considere biomarcador patológico de la ELA por el aumento de la expresión y la actividad de la misma en los tejidos *post mortem* y en las células mononucleares de sangre periférica de estos pacientes, así como la eficacia que han mostrado los inhibidores de GSK-3 β en los modelos que recapitulan esta enfermedad, ha hecho que el reposicionamiento de Tideglusib se proponga como posible estrategia terapéutica para la ELA.

Por ello, durante la presente Tesis Doctoral se ha realizado el estudio preclínico de Tideglusib en los modelos establecidos de la proteinopatía de TDP-43, con el objetivo de evaluar su eficacia farmacológica y poder proponerlo como fármaco para esta enfermedad.

4.3. Evaluación del potencial terapéutico de Tideglusib en modelos celulares de ELA

La primera vez que se evaluó el potencial farmacológico de Tideglusib en la modulación de la patología de TDP-43, fue en la puesta a punto del ensayo de neuroprotección frente al ácido etacrínico en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Este ensayo fue desarrollado con el fin de evaluar el efecto neuroprotector de los agentes farmacológicos de estudio frente a la hiperfosforilación de TDP-43 y en consecuencia la acumulación citoplasmática de la misma, hecho que se considera marcador patológico de la enfermedad al estar presente en la mayoría de pacientes con ELA tanto familiar como esporádica.⁴⁷ Para establecer el control interno del ensayo se realizó un estudio comparativo de eficacia entre dos inhibidores de quinasas cuyo desarrollo preclínico estaba avanzado; IGS 2.7 y Tideglusib, inhibidores de CK-1 y GSK-3 β , respectivamente. Finalmente, Tideglusib fue elegido como control puesto que presentó un efecto neuroprotector más significativo a la hora de prevenir la muerte celular causada por el AE (**Figura 34**). El efecto farmacológico de Tideglusib no solo se vio reflejado en la reducción de la muerte celular evaluada por MTT (**Figura 90a**), sino también en la modulación de TDP-43 al prevenir la hiperfosforilación patológica de esta proteína evaluada mediante WB (**Figura 90b**).

La fosforilación aberrante de TDP-43 está relacionada con la alteración del tránsito núcleo-citosol de esta proteína, observándose una acumulación de TDP-43 con diferentes modificaciones post-traduccionales en el citoplasma de las células afectadas.⁴⁷ Por ello, cabría esperar que la reducción en la fosforilación patológica de TDP-43 mediante la inhibición de GSK-3 β , reestableciera el equilibrio fisiológico de TDP-43 favoreciendo la localización nuclear de la misma.

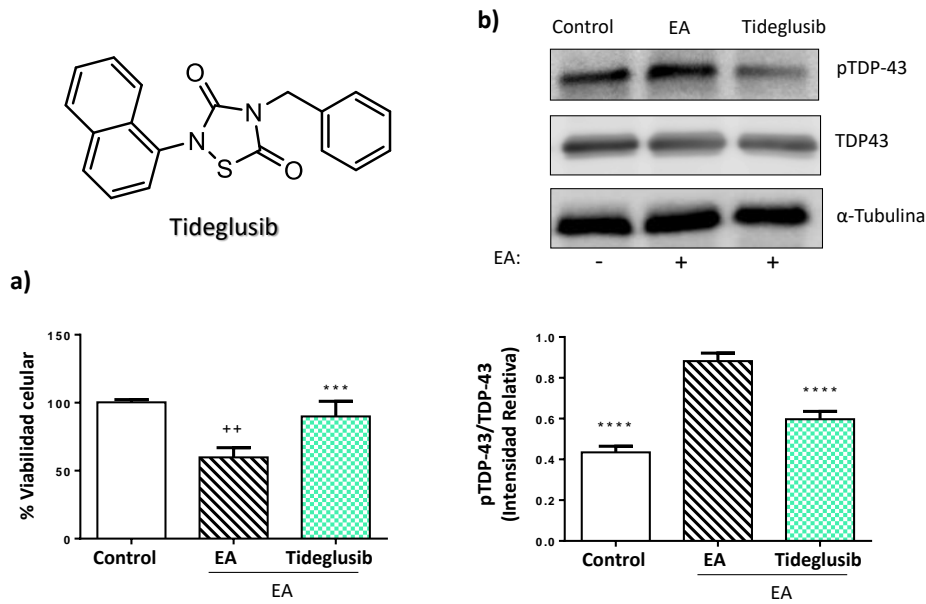


Figura 90. Estructura química y efecto neuroprotector de Tideglusib frente al AE. Viabilidad celular evaluada mediante MTT (a) y niveles de pTDP-43 evaluado por WB (b) en la línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuestas a 30 μ M de AE en presencia o ausencia de Tideglusib (5 μ M). Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. ($^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$ con diferencias significativas frente a las células tratadas con AE y $^{++}p < 0.01$ con respecto al control).

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se llevó a cabo un ensayo en donde se evaluó la localización subcelular de TDP-43 en esta misma línea celular en presencia o ausencia de Tideglusib (5 μ M), induciendo las modificaciones tanto en la estructura como en la localización mediante la exposición de las células al AE. Como resultado se observó un aumento significativo de TDP-43 en el citosol de las células tratadas con AE en comparación al control, en donde el pretratamiento con Tideglusib (5 μ M) favoreció el tránsito de forma significativa de TDP-43 al compartimento nuclear (**Figura 91**).

Con el fin de comprobar la eficacia de Tideglusib en otro modelo celular, se evaluó el potencial neuroprotector de este inhibidor en los linfoblastos de pacientes con ELAe. Las líneas linfoblásticas establecidas a partir de las muestras de sangre de los donantes enfermos, recapitulan la patología de TDP-43 observada en los tejidos *post mortem* de este tipo de pacientes al presentar; un aumento de la fosforilación de TDP-43, mayores niveles de esta proteína en el compartimento citosólico, así como la presencia de fragmentos citotóxicos del extremo C-terminal (**Figura 42**). A su vez la caracterización de estas células mostró un aumento anómalo de la actividad de GSK-3 β reflejada en el incremento significativo de la forma hiperactiva (GSK-3 β -pTyr216) acompañado de una bajada en los niveles de la forma inactiva (GSK-3 β -pSer9) (**Figura**

46), considerándose un modelo óptimo para evaluar la eficacia de compuestos con actividad inhibitoria frente a GSK-3 β .

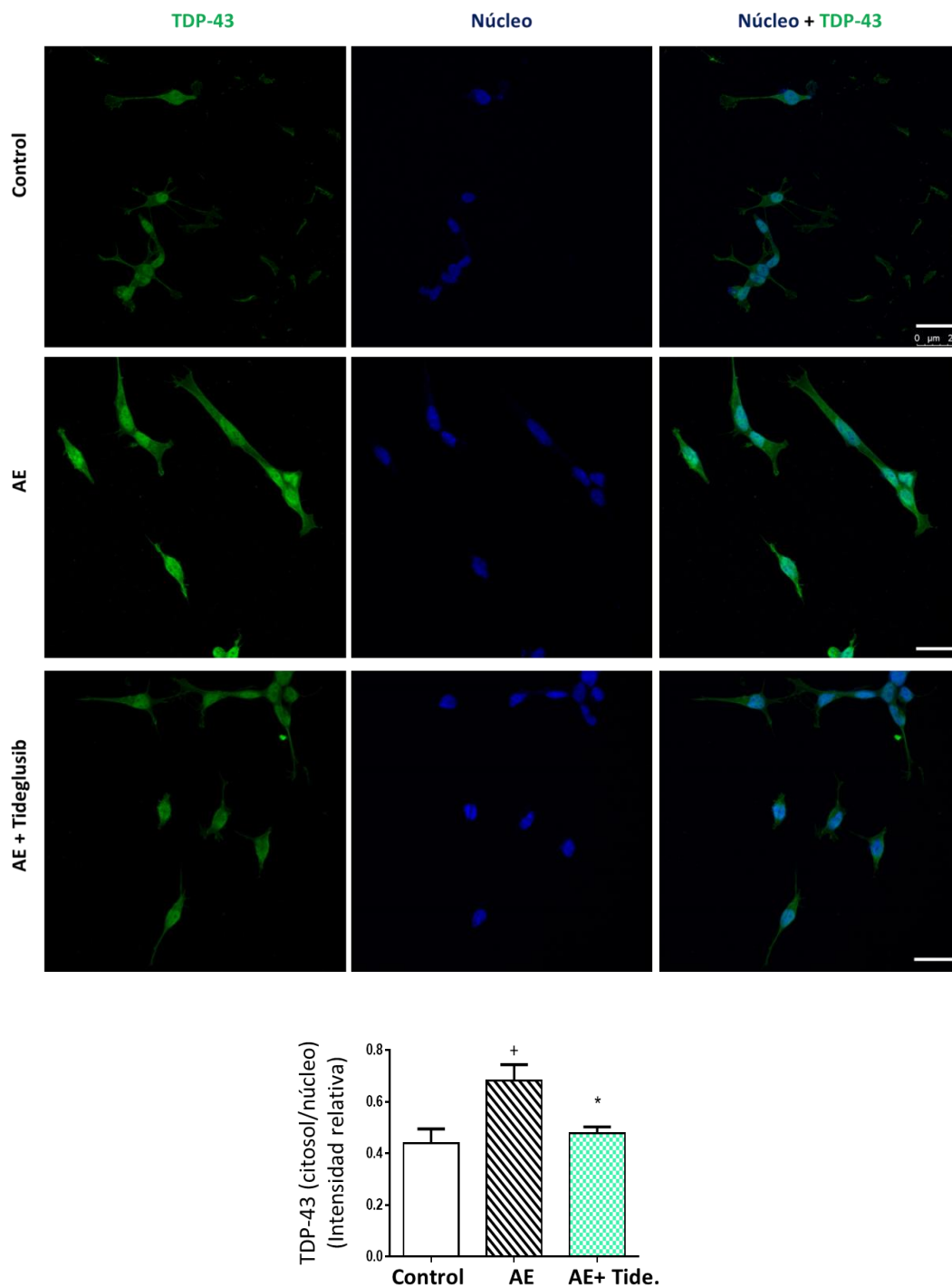


Figura 91. Análisis mediante técnicas inmunocitoquímicas de la localización subcelular de TDP-43 en la línea SH-SY5Y, 24 horas después de haber sido expuestas a 30 μ M de AE en presencia o ausencia de Tideglusib (5 μ M). Como marcador nuclear se utilizó DAPI. Barras de escala de las imágenes representativas: 25 μ m. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes.

El tratamiento de las líneas linfoblásticas de 3 pacientes con ELAe y 3 individuos control con Tideglusib (5 μ M) durante 24 horas, no mostró ningún efecto tóxico en las células de los individuos sanos. En las células de los pacientes con ELAe se observó una reducción significativa de la fosforilación patológica de TDP-43, sin apreciarse alteraciones en los niveles normales de expresión de esta proteína (**Figura 92a**). A su vez, se evaluó la capacidad de este fármaco para restituir la homeostasis de TDP-43 evaluando su localización celular después de 24 horas en presencia del tratamiento. Los resultados mostraron que, si bien no tiene efectos apreciables en los controles, el tratamiento con Tideglusib reduce la acumulación citoplasmática de TDP-43 en los 3 pacientes estudiados alcanzando niveles próximos a los de los linfoblastos del grupo control, recuperando de esta forma la localización nuclear de esta proteína necesaria para el control de múltiples procesos regulados en ese compartimento celular (**Figura 92b**).

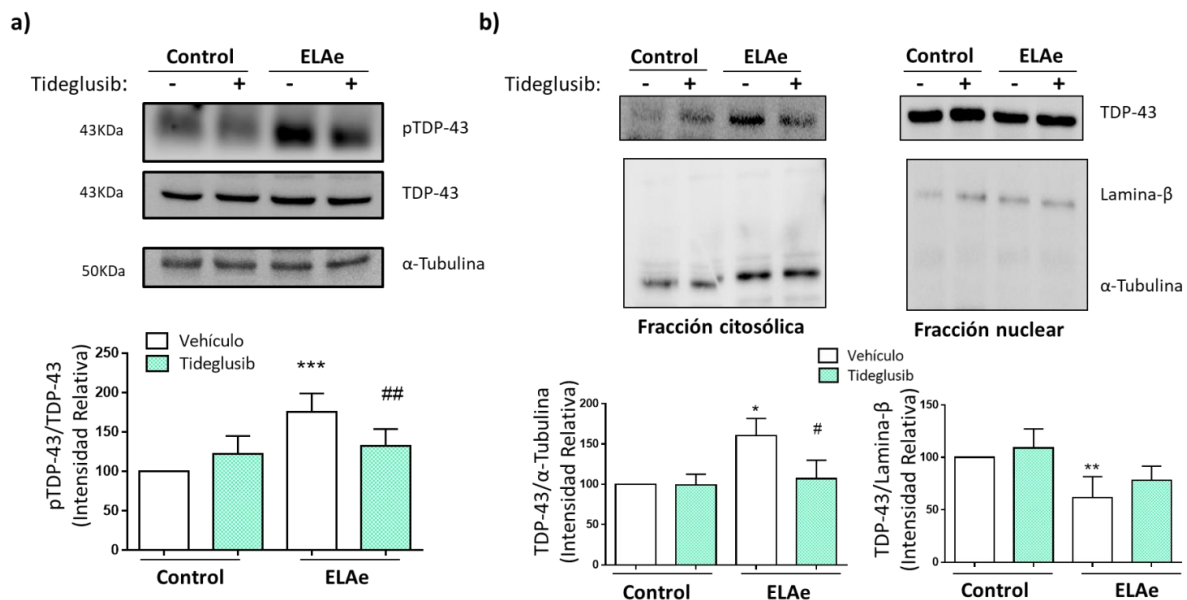


Figura 92. Immunoblots representativos y cuantificación de los niveles de pTDP-43 (a) y la localización subcelular de TDP-43 (b) en presencia o ausencia de Tideglusib (5 μ M) en los linfoblastos de 3 pacientes con ELAe y 3 controles. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 con diferencias significativas frente al grupo control y # p < 0.05, ## p < 0.01 con diferencias significativas frente al ELAe sin tratamiento).

En conclusión de estos estudios, el tratamiento con Tideglusib disminuye la fosforilación patológica de TDP-43 en los dos modelos estudiados, reestableciendo además el equilibrio fisiológico de esta proteína al reducir la concentración citoplasmática tóxica que está contribuyendo a la degeneración neuronal en estos pacientes.

No obstante, la implicación de GSK-3 β en diferentes vías de señalización esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular como es la vía oncogénica Wnt/ β -catenina, ha puesto en duda el uso de este tipo de inhibidores como tratamiento para cualquier enfermedad crónica. La fosforilación de β -catenina en la treonina 41, serina 37 y serina 33 mediada por GSK-3 β , es un hecho necesario para que esta proteína sea ubiquitinada y degradada en el proteosoma.²⁹³ Así, la inhibición de la actividad de GSK-3 β en esta vía celular, produciría la acumulación de β -catenina en el citoplasma, la cual se trasloca al núcleo en donde actúa como factor de transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la proliferación, diferenciación y mantenimiento de células madre.²⁹⁴ Este hecho contribuiría al desarrollo de patologías como el cáncer, en donde la proliferación celular anómala que lo caracteriza es letal para el organismo.

Hasta ahora, los inhibidores de GSK-3 β que han sido trasladados a clínica y han resultado fallidos son ATP-competitivos, es decir, se unen al sitio activo de la enzima compitiendo por el ATP, y en consecuencia produciendo la inhibición completa de la enzima.²⁹⁵ Sin embargo, recientemente se ha demostrado como la inhibición parcial de GSK-3 β es suficiente para normalizar la hiperactividad anómala que presenta esta enzima en los tejidos de pacientes de patologías como la ELA, DMC, EA, PSP entre otras.²⁹⁶ Ejemplo de ello es el Litio, un compuesto que modula indirectamente la actividad de GSK-3 β reduciendo parcialmente su actividad, y que fue aprobado para el tratamiento de trastornos neurológicos como el trastorno bipolar.²⁹⁷

Recientemente se ha comprobado como los inhibidores alostéricos de GSK-3, es decir, ATP-no competitivos, inhiben parcialmente y de forma reversible la actividad de GSK-3 β y no muestran la traslocación de β -catenina al núcleo.²⁹⁸ Por ello, se propuso la inhibición alostérica de GSK-3 β como un tratamiento crónico para enfermedades que presenten anomalías en la actividad de esta enzima, puesto que al inhibir parcialmente la enzima, no afectan a los procesos celulares en los que está implicada GSK-3 β como es la vía oncogénica Wnt/ β -catenina.

Con el fin de evaluar si la inhibición de GSK-3 β con Tideglusib, inhibidor ATP-no competitivo, está interfiriendo en este proceso celular, se realizó un estudio en la línea SH-SY5Y, en donde se evaluó la localización subcelular de β -catenina tras el tratamiento con Tideglusib (5 μ M) y con el inhibidor de GSK-3 β ATP-competitivo, SB-216783 (5 μ M). Después de un periodo de 24h en presencia o ausencia de los compuestos, se extrajo el contenido proteico mediante un protocolo de fraccionamiento celular analizando los niveles de β -catenina presentes en el núcleo y en el citosol, mediante WB. Como resultado se pudo apreciar un aumento significativo de β -catenina en el citosol y en consecuencia en el núcleo en las células tratadas con SB-216783, lo que indica que

la inhibición de GSK-3 β en esta vía está impidiendo la degradación de esta proteína favoreciendo su traslocación al núcleo (**Figura 93a**). Sin embargo, los niveles citosólicos y nucleares de β -catenina en presencia de Tideglusib son similares al grupo control, es decir, el tratamiento con este compuesto no está interfiriendo en esta vía de señalización, puesto que se está produciendo la degradación fisiológica de β -catenina mediada por la fosforilación de GSK-3 β . Para verificar estos resultados, se realizó paralelamente un ensayo en los linfoblastos de pacientes con ELAe, observándose el mismo resultado que el obtenido en la línea de neuroblastoma humano (**Figura 93b**).

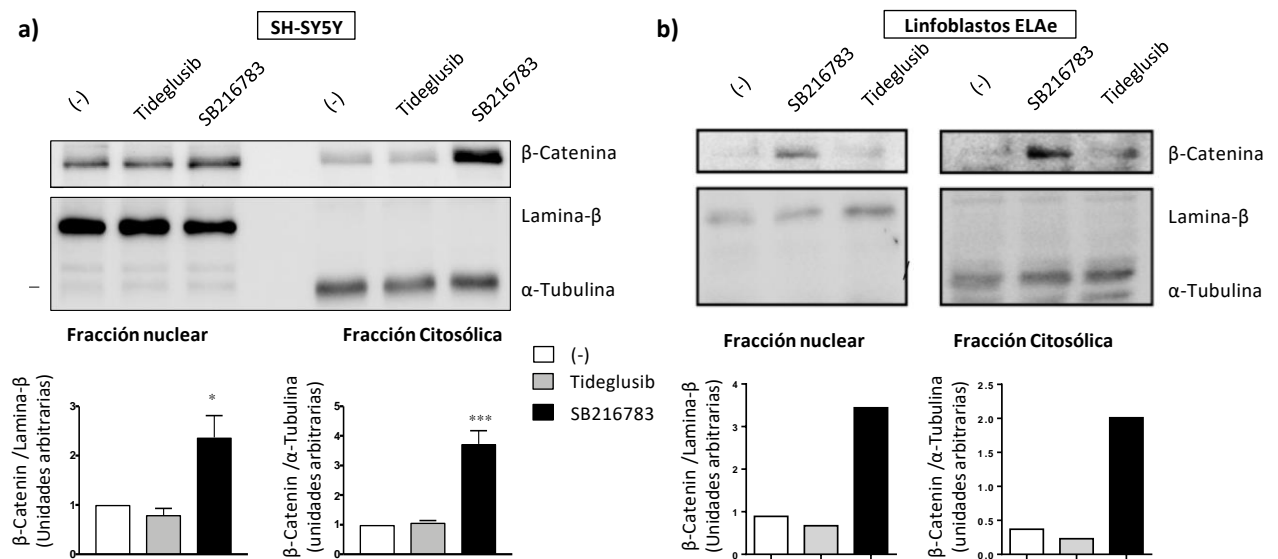


Figura 93. Localización subcelular de β -catenina en la línea SH-SY5Y (a) y en los linfoblastos de pacientes con ELAe (b) en presencia o ausencia de los inhibidores de GSK-3 β : SB216783 y Tideglusib a 5 μ M. Como control de carga se ha utilizado lamina- β para la fracción nuclear y α -Tubulina para la fracción citosólica. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos diferentes. (* p < 0.05, *** p < 0.001 con diferencias significativas frente a al grupo control (-)).

La inhibición alostérica y selectiva de GSK-3 β con Tideglusib, evita que se alteren procesos celulares necesarios para el buen funcionamiento celular como es la vía oncogénica Wnt/ β -catenina. Dado el potencial farmacológico de Tideglusib, se propone como candidato para la ELA, puesto que es una patología en la que el aumento de la expresión y actividad de GSK-3 β contribuyen a la muerte neuronal y en definitiva a la degeneración muscular.

4.4. Evaluación del potencial terapéutico de Tideglusib en el modelo murino de TDP-43^{A315T}

Con el objetivo de completar el desarrollo preclínico de Tideglusib para el posible tratamiento de la ELA, se validó la eficacia de este fármaco en el modelo de ratón transgénico Prp-hTDP-43^{A315T}. Conociendo las propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras de Tideglusib evaluadas en los diferentes modelos de neurodegeneración, se realizó un primer ensayo de eficacia en donde se evaluó únicamente la capacidad de este fármaco para modular la fosforilación patológica de TDP-43 *in vivo*. Para emular el escenario más parecido al de un ensayo clínico, el fármaco o vehículo se administraron por vía oral. La dosis administrada fue la utilizada anteriormente en los modelos preclínicos de Alzheimer,^{299,300} administrando una dosis oral diaria de 200mg/Kg/día de Tideglusib. El tratamiento de los animales Prp-hTDP-43^{A315T} se inició en la fase pre-sintomática de la enfermedad (P65) y tuvo una duración de 30 (P65) o 50 días (P105) (Figura 94).

Los grupos de estudio se diseñaron en función del tipo de ratón; silvestre (WT) o transgénico (TDP43), y del tipo y duración del tratamiento: vehículo (Veh) o Tideglusib durante 30 (T30) o 50 días (T50). De esta forma se establecieron 6 grupos: 3 formados por ratones silvestres a los que se les administró el fármaco o vehículo para evaluar el posible efecto tóxico; WT-Veh, WT-T30, WT-T50 y 3 con ratones transgénicos; TDP43-Veh, TDP43-T30, TDP43-T50.

El protocolo llevado a cabo fue aprobado por el órgano encargado del bienestar animal del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) (ref. PROEX 059/16) en cumplimiento de los artículos 33.1 y 38.1 del Real Decreto 53/2013, del 1 de Febrero (BOE 8 de Febrero) y de acuerdo a la normativa europea en relación al uso de animales para experimentación (2010/63/EU).

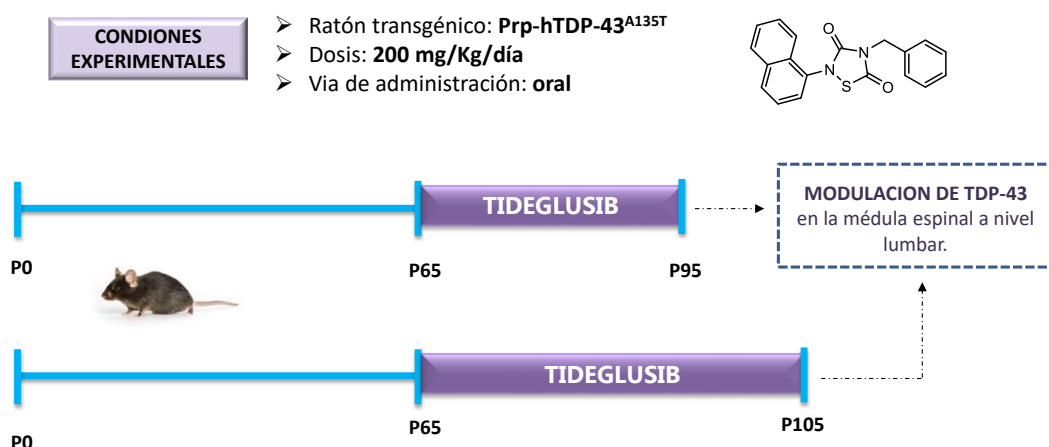


Figura 94. Diseño experimental del ensayo llevado a cabo en el ratón transgénico TDP-43^{A315T} con Tideglusib.

Una vez finalizado el ensayo (P65 o P105), se sacrificaron los ratones y se conservaron las muestras según el protocolo detallado en el apartado de materiales y métodos. Seguidamente se procedió a la extracción del contenido proteico de la sección lumbar de la médula espinal y se cuantificaron los niveles de TDP-43 fosforilada en las Ser409/410 (tanto la forma completa como la fragmentada), así como el contenido total de TDP-43 mediante WB. En el análisis de los resultados se observó un aumento en la expresión de TDP-43 en los ratones transgénicos en comparación a los silvestres independientemente de la duración del experimento (**Figura 95**). El efecto del tratamiento con Tideglusib durante 30 días (TDP43-T30) no mostró un efecto significativo en la reducción de la fosforilación de TDP-43 completa, ni de los fragmentos de menor peso molecular (**Figura 95a**). Sin embargo, aquellos ratones que recibieron el tratamiento prolongado durante 50 días (TDP43-T50), presentaron diferencias estadísticamente significativas en el grado de fosforilación de la proteína, frente al grupo de ratones transgénicos que recibieron como tratamiento el vehículo (TDP43-Veh) (**Figura 95b**).

En resumen, la inhibición de GSK-3 β con Tideglusib ha demostrado ser capaz de modular la toxicidad de TDP-43 *in vivo* al reducir la fosforilación y fragmentación de TDP-43 tras un tratamiento diario durante 50 días administrado vía oral.

Todos estos resultados confirman el potencial farmacológico de Tideglusib en la modulación de la patología de TDP-43 al reducir la hiperfosforilación propia de los linfoblastos de pacientes con ELAe y la inducida en el modelo de AE en la línea de neuroblastoma. Además, ha mostrado eficacia a la hora de reestablecer el equilibrio núcleo-citosol de TDP-43 en ambos modelos celulares, reduciendo la acumulación citoplasmática de la misma, principal característica patológica de la enfermedad, y por tanto reestableciendo la función de TDP-43 a nivel nuclear. Este hecho adquiere gran relevancia en la medida en la que TDP-43 es una proteína que regula más de 600 ARNm y en consecuencia todos los procesos celulares asociados a ello.⁵² Por último, la validación del efecto neuroprotector de Tideglusib en el modelo de ratón transgénico que recapitula la patología de TDP-43 (Prp-hTDP-43^{A315T}), ha resultado ser eficaz al disminuir la fosforilación y fragmentación de TDP-43 *in vivo* después de un tratamiento diario administrado durante 50 días por vía oral.

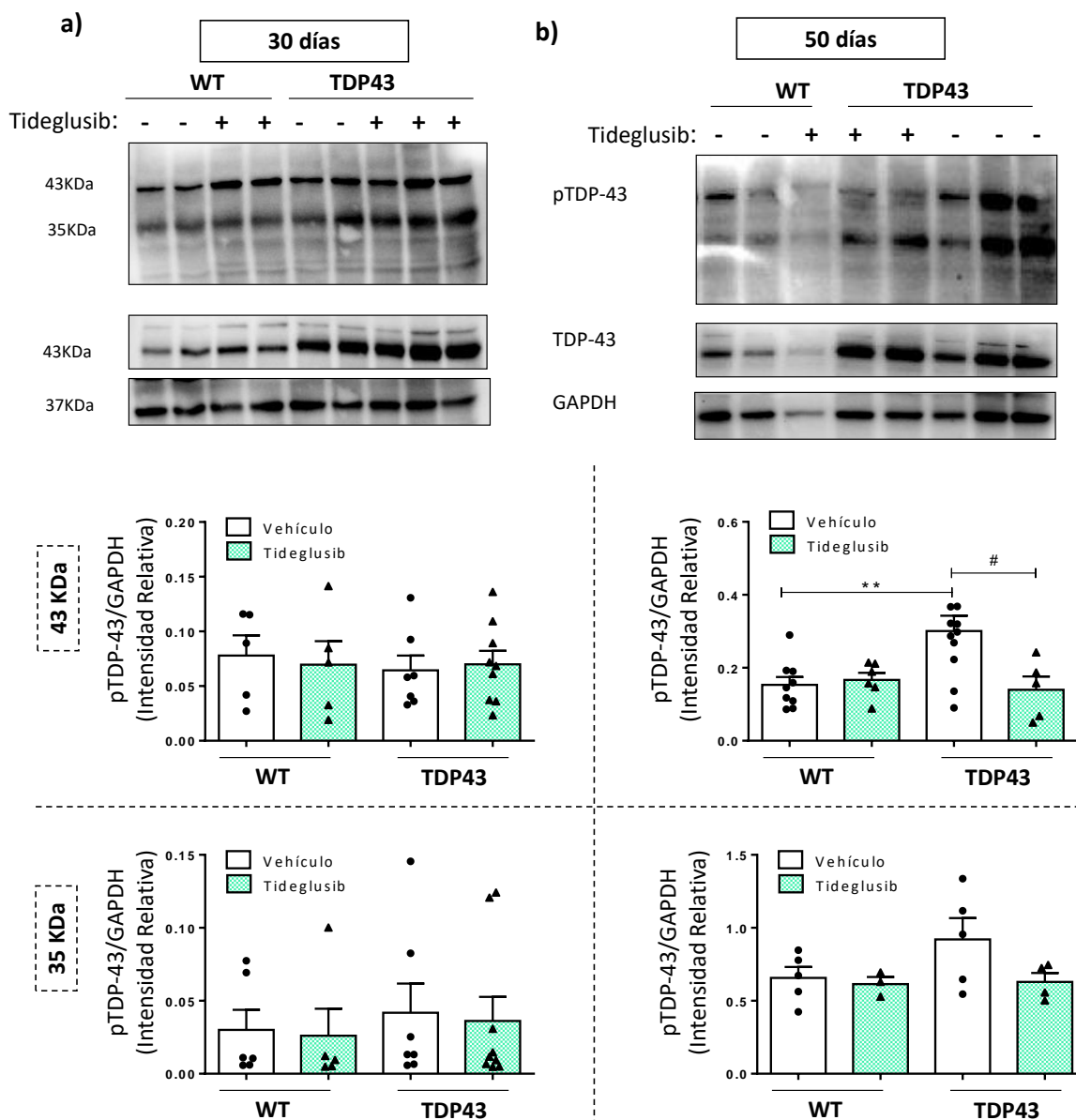


Figura 95. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de TDP-43 total y fosforilada en las Ser409/410 presente en la sección lumbar de la médula espinal de los ratones silvestres (WT) o transgénicos (TDP43) tratados con Tideglusib o vehículo durante 30 días (a) o 50 días (b). ($N \geq 6$ animales por grupo) (** $p < 0.01$ con diferencias significativas frente al grupo WT-Veh. # $p < 0.05$ con diferencias significativas frente al grupo TDP43-Veh).

En conclusión, el historial clínico de Tideglusib en donde se observa seguridad y eficacia en todas las patologías estudiadas, sumado a los favorables datos obtenidos en el estudio de la eficacia de Tideglusib en la proteinopatía de TDP-43, proponen a este fármaco como candidato válido para el tratamiento de la ELA.

Estos resultados fueron presentados en el congreso organizado por la red Europea para curar la ELA conocida como ENCALS, del Inglés «European Network to Cure ALS», en Tours (Francia) en Mayo del 2019. El póster, que obtuvo el premio del congreso, despertó gran interés en la Dra. Anne Marie Hubers del Hospital de Ginebra, que ha querido potenciar el desarrollo clínico de Tideglusib como tratamiento para la ELA. Para ello se ha diseñado un protocolo clínico fase II, que está a la espera de ser aprobado para su inicio en un futuro no lejano en Suiza.

En resumen, los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran que los inhibidores de quinasa propuestos para el potencial tratamiento de la ELA, cuya selección se realizó en base a la capacidad para penetrar al SNC y a la actividad inhibitoria frente a las quinasas que modulan la fosforilación patológica de TDP-43, han mostrado un potencial farmacológico prometedor en los estudios llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* recuperando la homeostasis de TDP-43.

La mayoría de estos candidatos han presentado una eficacia significativa en los modelos celulares establecidos reduciendo la hiperfosforilación y fragmentación, y en consecuencia reestableciendo la localización nuclear de esta proteína, marcador patológico presente en un 97% de los pacientes. El perfil farmacológico de los compuestos más efectivos se ha completado con el estudio de la modulación del efecto inflamatorio en cultivos primarios de microglía de rata.

El potencial terapéutico de los compuestos más prometedores ha sido validado en el modelo de ratón transgénico de TDP-43 en donde se confirmó la capacidad de los inhibidores de quinasas para atravesar la BHE y llegar al SNC, ejerciendo un efecto neuroprotector e inmunomodulador reflejado en la disminución de la fosforilación de TDP-43, la preservación del número de motoneuronas, la reducción de la gliosis reactiva, así como la atenuación de los síntomas motores.

Estos resultados son prometedores y avalan la inhibición de las quinasas que modulan la fosforilación patológica de TDP-43, descrita en la mayoría de pacientes, como una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de esta proteínopatía. De esta manera los inhibidores de estas quinasas pueden ser considerados fármacos innovadores en el futuro tratamiento de la ELA.

VII. CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se ha procedido al estudio preclínico de candidatos a fármacos para el potencial tratamiento de la ELA, caracterizados por presentar actividad inhibitoria frente a proteínas quinasas. De esta forma se ha evaluado el potencial farmacológico de estos agentes en los modelos celulares y animales establecidos para el estudio de la ELA y de aquellas patologías que cursan con la proteinopatía de TDP-43.

Las principales conclusiones del trabajo se recogen a continuación:

1. Se ha evaluado la probabilidad de atravesar la barrera hematoencefálica de los posibles candidatos a fármaco diseñados y sintetizados en el grupo de investigación, en base a la actividad inhibitoria frente a las proteínas quinasas establecidas como dianas terapéuticas: GSK-3 β , CK-1 δ , CDC7 y TTBK1. Solo aquellos compuestos que presentan una alta probabilidad de atravesar la BHE y llegar al órgano diana, el SNC, han sido seleccionados para estudios posteriores como candidatos a fármaco.
2. Se ha puesto a punto el modelo de neuroprotección frente a la hiperfosforilación de TDP-43 inducida por el AE en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, en donde posteriormente, se ha validado la eficacia neuroprotectora de los compuestos de estudio.
3. Se han establecido y caracterizado líneas linfoblásticas procedentes de pacientes con ELAe, ELAf-SOD1 e individuos sanos, instaurando un modelo válido para el estudio de la ELA puesto que recapitulan las características patológicas de la proteinopatía de TDP-43 y otras disfunciones celulares asociadas a la enfermedad.
4. Se ha comprobado el potencial terapéutico de los candidatos a fármaco en las líneas linfoblásticas establecidas de los pacientes con ELAe, al reducir la fosforilación patológica de TDP-43 y recuperar la homeostasis de esta proteína nuclear considera principal biomarcador de la enfermedad.
5. Se ha demostrado el efecto inmunomodulador de los inhibidores de CDC7 y TTBK1 seleccionados, en un modelo de neuroinflamación desarrollado en cultivos primarios de microglía de rata.
6. Se ha administrado por primera vez un tratamiento farmacológico basado en la inhibición de quinasas en el modelo de ratón transgénico TDP-43^{A315T}, confirmando que los inhibidores de

las cuatro quinasas establecidas como dianas terapéuticas, son capaces de atravesar la BHE y llegar al órgano diana en donde modulan la fosforilación patológica de TDP-43.

7. Se ha comprobado el efecto neuroprotector *in vivo* del inhibidor de CK-1, IGS2.7, al atenuar la pérdida de peso típica de este modelo, evitar la muerte de las neuronas motoras espinales y al revertir la reactividad glial.
8. Se ha demostrado que la inhibición de CDC7 con el compuesto C24 en el ratón transgénico retrasa la aparición de la sintomatología motora y atenúa la distonía propia de la enfermedad.
9. El tratamiento con el inhibidor de TTBK1 T25, ha demostrado ser neuroprotector y antiinflamatorio en el modelo murino de estudio, preservando el número de motoneuronas y reduciendo la reactividad glial.
10. Se ha demostrado la eficacia farmacológica de Tideglusib, inhibidor de GSK-3 β ATP-no competitivo, en los modelos celulares y animales establecidos en el grupo de investigación para el estudio de la enfermedad, proponiendo el reposicionamiento de este fármaco como una buena estrategia terapéutica para la ELA.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Dementia: number of people affected to triple in next 30 years. World Health Organization. 2017. <https://www.who.int/es/news/item/07-12-2017-dementia-number-of-people-affected-to-triple-in-next-30-years>
- ² Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377(2):162-172.
- ³ Leigh PN, Ray-Chaudhuri K. Motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(8):886-896.
- ⁴ Charcot JM, Joffroy A. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Pathol*. 1869;744-54.
- ⁵ Marin B, Boumediene F, Logroscino G, Couratier P, Babron MC, Leutenegger AL, Copetti M, Preux PM, Beghi E. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2017;46(1):57-74.
- ⁶ Millul A, Beghi E, Logroscino G, Micheli A, Vitelli E, Zardi A. Survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis in a population-based registry. *Neuroepidemiology*. 2005;25(3):114-119.
- ⁷ Kurtzke JF. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol*. 1982;36:281-302.
- ⁸ Mitchell JD. Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000;1(4):235-250.
- ⁹ Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2001;344(22):1688-1700.
- ¹⁰ Körner S, Kollwe K, Ilsemann J, Müller-Heine A, Dengler R, Krampfl K, Petri S. Prevalence and prognostic impact of comorbidities in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2013;20(4):647-654.
- ¹¹ Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(11-12):956-972.
- ¹² van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2017;390(10107):2084-2098.
- ¹³ Mitsumoto H, Santella RM, Liu X, Bogdanov M, Zipprich J, Wu HC, Mahata J, Kilty M, Bednarz K, Bell D, Gordon PH, Hornig M, Mehrazin M, Naini A, Flint Beal M, Factor-Litvak P. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler*. 2008;9(3):177-183.
- ¹⁴ Carrì MT, D'Ambrosi N, Cozzolino M. Pathways to mitochondrial dysfunction in ALS pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;483(4):1187-1193.
- ¹⁵ Siklós L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joó F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1996;39(2):203-216.
- ¹⁶ Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1998;156(1):65-72.
- ¹⁷ Dhaliwal GK, Grewal RP. Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains. *Neuroreport*. 2000;11(11):2507-2509.
- ¹⁸ Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(11-12):1068-1082.
- ¹⁹ McCauley ME, Baloh RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol*. 2019;137(5):715-730.
- ²⁰ Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now?. *Front Neurosci*. 2019;13:1310.
- ²¹ Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(6):777-794.

-
- ²² Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130-133.
- ²³ Taylor JP, Brown RH Jr, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 2016;539(7628):197-206.
- ²⁴ Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RHL. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362(6415):59-62.
- ²⁵ Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2018;17(1):94-102.
- ²⁶ Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(7):540-549.
- ²⁷ Yamashita S, Ando Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegener*. 2015;4:13.
- ²⁸ Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. 1993;261(5124):1047-1051.
- ²⁹ Cleveland DW, Laing N, Hulse PV, Brown RH Jr. Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature*. 1995;378(6555):342-343.
- ³⁰ Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. 1996;13(1):43-47.
- ³¹ Hayashi Y, Homma K, Ichijo H. SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Adv Biol Regul*. 2016;60:95-104.
- ³² Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009;323(5918):1205-1208.
- ³³ Ratti A, Buratti E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem*. 2016;138(1):95-111.
- ³⁴ Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, Urwin H, Manser C, Miller CC, Hortobágyi T, Dragunow M, Rogelj B, Shaw CE. ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet*. 2013;22(13):2676-2688.
- ³⁵ Conte A, Lattante S, Zollino M, Marangi G, Luigetti M, Del Grande A, Servidei S, Trombetta F, Sabatelli M. P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(1):73-75.
- ³⁶ Balendra R, Isaacs AM. C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(9):544-558.
- ³⁷ Volk AE, Weishaupt JH, Andersen PM, Ludolph AC, Kubisch C. Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Med Genet*. 2018;30(2):252-258.
- ³⁸ Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, Ackerley S, Durnall JC, Williams KL, Buratti E, Baralle F, de Belleruche J, Mitchell JD, Leigh PN, Al-Chalabi A, Miller CC, Nicholson G, Shaw CE. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008;319(5870):1668-1672.

-
- ³⁹ Rutherford NJ, Zhang YJ, Baker M, Gass JM, Finch NA, Xu YF, Stewart H, Kelley BJ, Kuntz K, Crook RJ, Sreedharan J, Vance C, Sorenson E, Lippa C, Bigio EH, Geschwind DH, Knopman DS, Mitsumoto H, Petersen RC, Cashman NR, Hutton M, Shaw CE, Boylan KB, Boeve B, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Caselli RJ, Dickson DW, Mackenzie IR, Petrucelli L, Rademakers R. Novel mutations in TARDBP (TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* 2008;4(9):e1000193.
- ⁴⁰ Kwong LK, Neumann M, Sampathu DM, Lee VM, Trojanowski JQ. TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. *Acta Neuropathol.* 2007;114(1):63-70.
- ⁴¹ Walker AK, Daniels CM, Goldman JE, Trojanowski JQ, Lee VM, Messing A. Astrocytic TDP-43 pathology in Alexander disease. *J Neurosci.* 2014;34(19):6448-6458.
- ⁴² Vilariño-Güell C, Wider C, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Kachergus JM, Keeling BH, Dachsel JC, Hulihan MM, Dickson DW, Wszolek ZK, Uitti RJ, Graff-Radford NR, Boeve BF, Josephs KA, Miller B, Boylan KB, Gwinn K, Adler CH, Aasly JO, Hentati F, Destée A, Krygowska-Wajs A, Chartier-Harlin MC, Ross OA, Rademakers R, Farrer MJ. Characterization of DCTN1 genetic variability in neurodegeneration. *Neurology.* 2009;72(23):2024-2028.
- ⁴³ Cykowski MD, Takei H, Van Eldik LJ, Schmitt FA, Jicha GA, Powell SZ, Nelson PT. Hippocampal Sclerosis but Not Normal Aging or Alzheimer Disease Is Associated With TDP-43 Pathology in the Basal Forebrain of Aged Persons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75(5):397-407.
- ⁴⁴ McKee AC, Gavett BE, Stern RA, Nowinski CJ, Cantu RC, Kowall NW, Perl DP, Hedley-Whyte ET, Price B, Sullivan C, Morin P, Lee HS, Kubitius CA, Daneshvar DH, Wulff M, Budson AE. TDP-43 proteinopathy and motor neuron disease in chronic traumatic encephalopathy. *Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(9):918-929.
- ⁴⁵ Josephs KA, Dickson DW, Tosakulwong N, Weigand SD, Murray ME, Petrucelli L, Liesinger AM, Senjem ML, Sychalla AJ, Knopman DS, Parisi JE, Petersen RC, Jack CR Jr, Whitwell JL. Rates of hippocampal atrophy and presence of post-mortem TDP-43 in patients with Alzheimer's disease: a longitudinal retrospective study. *Lancet Neurol.* 2017;16(11):917-924.
- ⁴⁶ Nelson PT, Dickson DW, Trojanowski JQ, Jack CR, Boyle PA, Arfanakis K, Rademakers R, Alafuzoff I, Attems J, Brayne C, Coyle-Gilchrist ITS, Chui HC, Fardo DW, Flanagan ME, Halliday G, Hokkanen SRK, Hunter S, Jicha GA, Katsumata Y, Kawas CH, Keene CD, Kovacs GG, Kukull WA, Levey AI, Makkinejad N, Montine TJ, Murayama S, Murray ME, Nag S, Rissman RA, Seeley WW, Sperling RA, White Iii CL, Yu L, Schneider JA. Limbic-predominant age-related TDP-43 encephalopathy (LATE): consensus working group report. *Brain.* 2019;142(6):1503-1527.
- ⁴⁷ Scotter EL, Chen HJ, Shaw CE. TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics.* 2015;12(2):352-363.
- ⁴⁸ Ou SH, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol.* 1995;69(6):3584-3596.
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ Wang HY, Wang IF, Bose J, Shen CK. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics.* 2004;83(1):130-139.
- ⁵¹ Strong MJ, Volkening K, Hammond R, Yang W, Strong W, Leystra-Lantz C, Shoesmith C. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol Cell Neurosci.* 2007;35(2):320-327.
- ⁵² Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Huelga SC, Moran J, Liang TY, Ling SC, Sun E, Wancewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue JP, Shiue L, Bennett CF, Yeo GW, Cleveland DW. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci.* 2011;14(4):459-468.

-
- ⁵³ Kim SH, Shanware NP, Bowler MJ, Tibbetts RS. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. *J Biol Chem.* 2010;285(44):34097-34105.
- ⁵⁴ Ayala YM, De Conti L, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, Tollervey J, Ule J, Baralle M, Buratti E, Baralle FE. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* 2011;30(2):277-288.
- ⁵⁵ Kawahara Y, Mieda-Sato A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3347-3352.
- ⁵⁶ Anderson P, Kedersha N. RNA granules. *J Cell Biol.* 2006;172(6):803-808.
- ⁵⁷ Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W. The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum Mol Genet.* 2012;21(16):3703-3718.
- ⁵⁸ Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell.* 2009;36(6):932-941.
- ⁵⁹ Ayala YM, Zago P, D'Ambrogio A, Xu YF, Petrucelli L, Buratti E, Baralle FE. Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci.* 2008;121(22):3778-3785.
- ⁶⁰ Winton MJ, Van Deerlin VM, Kwong LK, Yuan W, Wood EM, Yu CE, Schellenberg GD, Rademakers R, Caselli R, Karydas A, Trojanowski JQ, Miller BL, Lee VM. A90V TDP-43 variant results in the aberrant localization of TDP-43 in vitro. *FEBS Lett.* 2008;582(15):2252-2256.
- ⁶¹ Barmada SJ, Skibinski G, Korb E, Rao EJ, Wu JY, Finkbeiner S. Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 2010;30(2):639-649.
- ⁶² Moisse K, Volkening K, Leystra-Lantz C, Welch I, Hill T, Strong MJ. Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res.* 2009;1249:202-211.
- ⁶³ Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Bamba H, Matsuura H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient redistribution of TDP-43 in brainstem motor neurons. *Neuroscience.* 2009;164(4):1565-1578.
- ⁶⁴ Zhang YJ, Xu YF, Dickey CA, Buratti E, Baralle F, Bailey R, Pickering-Brown S, Dickson D, Petrucelli L. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci.* 2007;27(39):10530-10534.
- ⁶⁵ Berning BA, Walker AK. The Pathobiology of TDP-43 C-Terminal Fragments in ALS and FTL. *Front Neurosci.* 2019;13:335.
- ⁶⁶ Berning BA, Walker AK. The Pathobiology of TDP-43 C-Terminal Fragments in ALS and FTL. *Front Neurosci.* 2019;13:335.
- ⁶⁷ Langellotti S, Romano V, Romano G, Klima R, Feiguin F, Cragnez L, Romano M, Baralle FE. A novel Drosophila model of TDP-43 proteinopathies: N-terminal sequences combined with the Q/N domain induce protein functional loss and locomotion defects. *Dis Model Mech.* 2016;9(6):659-669.
- ⁶⁸ Leitman J, Ulrich Hartl F, Lederkremer GZ. Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun.* 2013;4:2753.
- ⁶⁹ Buratti E, Baralle FE. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration. *Adv Genet.* 2009;66:1-34.
- ⁷⁰ Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet.* 2009;18(18):3353-3364.
- ⁷¹ Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Johnson BA, Herz J, Yu G. TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key?. *Brain Res.* 2012;1462:16-25.

-
- ⁷² Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, Buratti E, Baralle F, Morita M, Nakano I, Oda T, Tsuchiya K, Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(1):60-70.
- ⁷³ Valle C, Carrì MT. Cysteine Modifications in the Pathogenesis of ALS. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:5.
- ⁷⁴ Cohen TJ, Hwang AW, Restrepo CR, Yuan CX, Trojanowski JQ, Lee VM. An acetylation switch controls TDP-43 function and aggregation propensity. *Nat Commun*. 2015;6:5845.
- ⁷⁵ Maurel C, Chami AA, Thépault RA, Marouillat S, Blasco H, Corcia P, Andres CR, Vourc'h P. A role for SUMOylation in the Formation and Cellular Localization of TDP-43 Aggregates in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2020;57(3):1361-1373.
- ⁷⁶ Duan Y, Du A, Gu J, Duan G, Wang C, Gui X, Ma Z, Qian B, Deng X, Zhang K, Sun L, Tian K, Zhang Y, Jiang H, Liu C, Fang Y. PARylation regulates stress granule dynamics, phase separation, and neurotoxicity of disease-related RNA-binding proteins. *Cell Res*. 2019;29(3):233-247.
- ⁷⁷ Lee EB, Lee VM, Trojanowski JQ. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2011;13(1):38-50.
- ⁷⁸ 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):137-149.
- ⁷⁹ 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;382(2):405-409.
- ⁸⁰ Liachko NF, McMillan PJ, Guthrie CR, Bird TD, Leverenz JB, Kraemer BC. CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Ann Neurol*. 2013;74(1):39-52.
- ⁸¹ Taylor LM, McMillan PJ, Liachko NF, Strovast TJ, Ghetti B, Bird TD, Keene CD, Kraemer BC. Pathological phosphorylation of tau and TDP-43 by TTBK1 and TTBK2 drives neurodegeneration. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):7.
- ⁸² 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.
- ⁸³ Li W, Reeb AN, Lin B, Subramanian P, Fey EE, Knoverek CR, French RL, Bigio EH, Ayala YM. Heat Shock-induced Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) by MAPK/ERK Kinase Regulates TDP-43 Function. *J Biol Chem*. 2017;292(12):5089-5100.
- ⁸⁴ Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D are recapitulated in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*. 2009;583(2):394-400.
- ⁸⁵ Zhang YJ, Gendron TF, Xu YF, Ko LW, Yen SH, Petrucelli L. Phosphorylation regulates proteasomal-mediated degradation and solubility of TAR DNA binding protein-43 C-terminal fragments. *Mol Neurodegener*. 2010;5:33.
- ⁸⁶ Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, Casey MC, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L. Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci*. 2010;30(32):10851-10859.
- ⁸⁷ Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, Unger T, Malunda J, Xu Y, Winton MJ, Trojanowski JQ, Lee VM. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(2):726-738.
- ⁸⁸ Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279-296.

-
- ⁸⁹ Bose JK, Huang CC, Shen CK. Regulation of autophagy by neuropathological protein TDP-43. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44441-44448.
- ⁹⁰ Xia Q, Wang H, Hao Z, Fu C, Hu Q, Gao F, Ren H, Chen D, Han J, Ying Z, Wang G. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J*. 2016;35(2):121-142.
- ⁹¹ Veyrat-Durebex C, Corcia P, Dangoumau A, Laumonnier F, Piver E, Gordon PH, Andres CR, Vourc'h P, Blasco H. Advances in cellular models to explore the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2014;49(2):966-983.
- ⁹² Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, Dahrouge S, Antel JP. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn*. 1992;194(3):209-221.
- ⁹³ Budini M, Romano V, Avendaño-Vázquez SE, Bembich S, Buratti E, Baralle FE. Role of selected mutations in the Q/N rich region of TDP-43 in EGFP-12xQ/N-induced aggregate formation. *Brain Res*. 2012;1462:139-150.
- ⁹⁴ Wang Y, Liu FT, Wang YX, Guan RY, Chen C, Li DK, Bu LL, Song J, Yang YJ, Dong Y, Chen Y, Wang J. Autophagic Modulation by Trehalose Reduces Accumulation of TDP-43 in a Cell Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis via TFEB Activation. *Neurotox Res*. 2018;34(1):109-120.
- ⁹⁵ Cascella R, Fani G, Capitini C, Rusmini P, Poletti A, Cecchi C, Chiti F. Quantitative assessment of the degradation of aggregated TDP-43 mediated by the ubiquitin proteasome system and macroautophagy. *FASEB J*. 2017;31(12):5609-5624.
- ⁹⁶ Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa J, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis*. 2012;45(3):862-870.
- ⁹⁷ 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;11(1):36.
- ⁹⁸ Muñoz-Sáez E, de Munck García E, Arahuetes Portero RM, Vicente F, Ortiz-López FJ, Cantizani J, Gómez Miguel B. Neuroprotective role of sphingosine-1-phosphate in L-BMAA treated neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *Neurosci Lett*. 2015;593:83-89.
- ⁹⁹ Huang YH, Shih CM, Huang CJ, Lin CM, Chou CM, Tsai ML, Liu TP, Chiu JF, Chen CT. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem*. 2006;98(3):577-589.
- ¹⁰⁰ Foran E, Bogush A, Goffredo M, Roncaglia P, Gustincich S, Pasinelli P, Trotti D. Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia*. 2011;59(11):1719-1731.
- ¹⁰¹ Chi L, Ke Y, Luo C, Gozal D, Liu R. Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 2007;144(3):991-1003.
- ¹⁰² Goh CW, Lee IC, Sundaram JR, George SE, Yusoff P, Brush MH, Sze NSK, Shenolikar S. Chronic oxidative stress promotes GADD34-mediated phosphorylation of the TAR DNA-binding protein TDP-43, a modification linked to neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2018;293(1):163-176.
- ¹⁰³ Henn A, Lund S, Hedtjörn M, Schratzenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*. 2009;26(2):83-94.
- ¹⁰⁴ Posa D, Martínez-González L, Bartolomé F, Nagaraj S, Porrás 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.
- ¹⁰⁵ Riancho J, Castanedo-Vázquez D, Gil-Bea F, Tapia O, Arozamena J, Durán-Vián C, Sedano MJ, Berciano MT, Lopez de Munain A, Lafarga M. ALS-derived fibroblasts exhibit reduced proliferation rate, cytoplasmic TDP-43 aggregation and a higher susceptibility to DNA damage. *J Neurol*. 2020;267(5):1291-1299.

-
- ¹⁰⁶ Krasnianski A, Deschauer M, Neudecker S, Gellerich FN, Müller T, Schoser BG, Krasnianski M, Zierz S. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain*. 2005;128(8):1870-1876.
- ¹⁰⁷ Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J, Wang W, Zhang Y, Jiang X, Zhang DY. Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2012;46(6):861-870.
- ¹⁰⁸ Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
- ¹⁰⁹ Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321(5893):1218-1221.
- ¹¹⁰ Richard JP, Maragakis NJ. Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling. *Brain Res*. 2015;1607:15-25.
- ¹¹¹ Chen H, Qian K, Du Z, Cao J, Petersen A, Liu H, Blackbourn LW 4th, Huang CL, Errigo A, Yin Y, Lu J, Ayala M, Zhang SC. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell*. 2014;14(6):796-809.
- ¹¹² Tu PH, Raju P, Robinson KA, Gurney ME, Trojanowski JQ, Lee VM. Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):3155-3160.
- ¹¹³ Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*. 2012;4(145):145-104.
- ¹¹⁴ Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, Garnes J, Dang V, Lievers J, Shoukat-Mumtaz U, Martinez R, Gai H, Blake R, Vaisberg E, Grskovic M, Johnson C, Irion S, Bright J, Cooper B, Nguyen L, Griswold-Prenner I, Javaherian A. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2013;56:355-364.
- ¹¹⁵ Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994;264(5166):1772-1775.
- ¹¹⁶ Therrien M, Parker JA. Worming forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Front Genet*. 2014;5:85.
- ¹¹⁷ Zhang K, Coyne AN, Lloyd TE. Drosophila models of amyotrophic lateral sclerosis with defects in RNA metabolism. *Brain Res*. 2018;1693(Pt A):109-120.
- ¹¹⁸ Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourgouin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Vande Velde C, Rouleau GA, Drapeau P. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet*. 2010;19(4):671-683.
- ¹¹⁹ Philips T, Rothstein JD. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;69:5.67.1-5.67.21.
- ¹²⁰ Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain*. 2012;135(3):833-846.
- ¹²¹ Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech*. 2017;10(5):537-549.

-
- ¹²² Tabata RC, Wilson JM, Ly P, Zwieggers P, Kwok D, Van Kampen JM, Cashman N, Shaw CA. Chronic exposure to dietary sterol glucosides is neurotoxic to motor neurons and induces an ALS-PDC phenotype. *Neuromolecular Med.* 2008;10(1):24-39.
- ¹²³ Van Kampen JM, Baranowski DC, Robertson HA, Shaw CA, Kay DG. The Progressive BSSG Rat Model of Parkinson's: Recapitulating Multiple Key Features of the Human Disease. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139694.
- ¹²⁴ de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Ojeda I, Martínez A, Gil C, Arahuetes RM. β -N-methylamino-l-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): the first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36(2):243-255.
- ¹²⁵ de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Martínez A, Arahuetes RM. Morphometric and neurochemical alterations found in l-BMAA treated rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;39(3):1232-1245.
- ¹²⁶ Morrice JR, Gregory-Evans CY, Shaw CA. Modeling Environmentally-Induced Motor Neuron Degeneration in Zebrafish. *Sci Rep.* 2018;8(1):4890.
- ¹²⁷ Borchelt DR, Davis J, Fischer M, Lee MK, Slunt HH, Ratovitsky T, Regard J, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Price DL. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal.* 1996;13(6):159-163.
- ¹²⁸ Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E. Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J.* 1990;9(3):833-840.
- ¹²⁹ Tsai KJ, Yang CH, Fang YH, Cho KH, Chien WL, Wang WT, Wu TW, Lin CP, Fu WM, Shen CK. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *J Exp Med.* 2010;207(8):1661-1673.
- ¹³⁰ Stephenson J, Amor S. Modelling amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Drug Discov Today Dis Model.* 2017;25-26:35-45.
- ¹³¹ Ito H, Wate R, Zhang J, Ohnishi S, Kaneko S, Ito H, Nakano S, Kusaka H. Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Exp Neurol.* 2008;213(2):448-455.
- ¹³² Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, Wong PC, Brown RH Jr, Price DL, Sisodia SS, Cleveland DW. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(17):8292-8296.
- ¹³³ Wils H, Kleinberger G, Janssens J, Pereson S, Joris G, Cuijt I, Smits V, Ceuterick-de Groote C, Van Broeckhoven C, Kumar-Singh S. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3858-3863.
- ¹³⁴ Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18809-18814.
- ¹³⁵ Yang C, Wang H, Qiao T, Yang B, Aliaga L, Qiu L, Tan W, Salameh J, McKenna-Yasek DM, Smith T, Peng L, Moore MJ, Brown RH Jr, Cai H, Xu Z. Partial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(12):E1121-E1129.
- ¹³⁶ Schmid B, Hruscha A, Hogg S, Banzhaf-Strathmann J, Strecker K, van der Zee J, Teucke M, Eimer S, Hegermann J, Kittelmann M, Kremmer E, Cruts M, Solchenberger B, Hasenkamp L, van Bebber F, Van Broeckhoven C, Edbauer D, Lichtenthaler SF, Haass C. Loss of ALS-associated TDP-43 in zebrafish causes muscle degeneration, vascular dysfunction, and reduced motor neuron axon outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(13):4986-4991.
- ¹³⁷ Kraemer BC, Schuck T, Wheeler JM, Robinson LC, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD. Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathol.* 2010;119(4):409-419.

-
- ¹³⁸ Chiang PM, Ling J, Jeong YH, Price DL, Aja SM, Wong PC. Deletion of TDP-43 down-regulates Tbc1d1, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16320-16324.
- ¹³⁹ Vanden Broeck L, Callaerts P, Dermaut B. TDP-43-mediated neurodegeneration: towards a loss-of-function hypothesis?. *Trends Mol Med*. 2014;20(2):66-71.
- ¹⁴⁰ Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:24.
- ¹⁴¹ Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B, Tudor EL, Smith BN, Klasen C, Miller CC, Cooper JD, Greensmith L, Shaw CE. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol*. 2013;125(2):273-288.
- ¹⁴² Chen Y, Yang M, Deng J, Chen X, Ye Y, Zhu L, Liu J, Ye H, Shen Y, Li Y, Rao EJ, Fushimi K, Zhou X, Bigio EH, Mesulam M, Xu Q, Wu JY. Expression of human FUS protein in Drosophila leads to progressive neurodegeneration. *Protein Cell*. 2011;2(6):477-486.
- ¹⁴³ Sharma A, Lyashchenko AK, Lu L, Nasrabad SE, Elmaleh M, Mendelsohn M, Nemes A, Tapia JC, Mentis GZ, Shneider NA. ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nat Commun*. 2016;7:10465.
- ¹⁴⁴ Chew J, Gendron TF, Prudencio M, Sasaguri H, Zhang YJ, Castaneda-Casey M, Lee CW, Jansen-West K, Kurti A, Murray ME, Bieniek KF, Bauer PO, Whitelaw EC, Rousseau L, Stankowski JN, Stetler C, Daugherty LM, Perkerson EA, Desaro P, Johnston A, Overstreet K, Edbauer D, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Fryer JD, Petrucelli L. Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science*. 2015;348(6239):1151-1154.
- ¹⁴⁵ Bellingham MC. A review of the neural mechanisms of action and clinical efficiency of riluzole in treating amyotrophic lateral sclerosis: what have we learned in the last decade?. *CNS Neurosci Ther*. 2011;17(1):4-31.
- ¹⁴⁶ Wobst HJ, Mack KL, Brown DG, Brandon NJ, Shorter J. The clinical trial landscape in amyotrophic lateral sclerosis-Past, present, and future. *Med Res Rev*. 2020;40(4):1352-1384.
- ¹⁴⁷ FDA approves drug to treat ALS. FDA website news release. 2017. <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm557102.htm>
- ¹⁴⁸ Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;268(3):1597-1604.
- ¹⁴⁹ Okada M, Yamashita S, Ueyama H, Ishizaki M, Maeda Y, Ando Y. Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *eNeurologicalSci*. 2018;11:11-14.
- ¹⁵⁰ Clinical Trial NCT02460679. Safety and biomarker study of EPI-589 in subjects with ALS (EPI-589). ClinicalTrial.gov. 2016. Last update October 14, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02460679>
- ¹⁵¹ Clinical Trial NCT03792490. Inhibition of Rho kinase (ROCK) with fasudil as disease-modifying treatment for ALS (ROCK-ALS). ClinicalTrial.gov. 2019. Last update November 5, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03792490>
- ¹⁵² Clinical Trial NCT02238626. Ibutilast (MN-166) in Subjects With Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (IBU-ALS-1201). ClinicalTrial.gov. 2014. Last update November 13, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02238626>
- ¹⁵³ Clinical Trial NCT03948178. Effects of Oral Levosimendan on Respiratory Function in Patients With ALS: Open-Label Extension (REFALS-ES). ClinicalTrial.gov. 2016. Last update September 21, 2020. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03948178>

-
- ¹⁵⁴ Clinical Trial NCT03070119. Long-Term Evaluation of BIIB067. ClinicalTrial.gov. 2017. Last update November 23, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03070119>
- ¹⁵⁵ Clinical Trial NCT03626012. A study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of BIIB078 in adults with C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. ClinicalTrial.gov. 2018. Last update December 2, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03626012>
- ¹⁵⁶ Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(5):349-359.
- ¹⁵⁷ Clinical Trial NCT03359538. Rapamycin Treatment for ALS (RAP-ALS). ClinicalTrial.gov. 2017. Last update February 5, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03359538>
- ¹⁵⁸ Clinical Trial NCT02166944. Tamoxifen Treatment in Patients With Motor Neuron Disease. ClinicalTrial.gov. 2014. Last update September 19, 2019. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02166944>
- ¹⁵⁹ Baloh RH, Glass JD, Svendsen CN. Stem cell transplantation for amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2018;31(5):655-661.
- ¹⁶⁰ Goutman SA, Savelieff MG, Sakowski SA, Feldman EL. Stem cell treatments for amyotrophic lateral sclerosis: a critical overview of early phase trials. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(6):525-543.
- ¹⁶¹ Chiò A, Mazzini L, Mora G. Disease-modifying therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology.* 2020;167:107986.
- ¹⁶² Clinical Trial NCT01051882. Autologous Cultured Mesenchymal Bone Marrow Stromal Cells Secreting Neurotrophic Factors (MSC-NTF), in ALS Patients. ClinicalTrial.gov. 2010. Last update January 8, 2019. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01051882>
- ¹⁶³ Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, Vaknin-Dembinsky A, Ben-Hur T, Offen D, Abramsky O, Melamed E, Karussis D. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2016;73(3):337-344.
- ¹⁶⁴ FDA approves new treatment for refractory multiple myeloma. FDA website news release. 2019. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-refractory-multiple-myeloma>
- ¹⁶⁵ Archbold HC, Jackson KL, Arora A, Weskamp K, Tank EMH, Li X, Miguez R, Dayton RD, Tamir S, Klein RL, Barmada SJ. TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Sci Rep.* 2018;8:4606.
- ¹⁶⁶ Pinarbasi ES, Cağatay T, Fung HYJ, Li YC, Chook YM, Thomas PJ. Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Sci Rep.* 2018;8(1):7083.
- ¹⁶⁷ Ederle H, Funk C, Abou-Ajram C, Hutten S, Funk EBE, Kehlenbach RH, Bailer SM, Dormann D. Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1. *Sci Rep.* 2018;8(1):7084.
- ¹⁶⁸ Silvestrini MJ, Johnson JR, Kumar AV, Thakurta TG, Blais K, Neill ZA, Marion SW, St Amand V, Reenan RA, Lapierre LR. Nuclear Export Inhibition Enhances HLH-30/TFEB Activity, Autophagy, and Lifespan. *Cell Rep.* 2018;23(7):1915-1921.
- ¹⁶⁹ Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, Daley EL, Miller SJ, Cunningham KM, Vidsensky S, Gupta S, Thomas MA, Hong I, Chiu SL, Haganir RL, Ostrow LW, Matunis MJ, Wang J, Sattler R, Lloyd TE, Rothstein JD. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 2015;525(7567):56-61.
- ¹⁷⁰ Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, Zaarur N, McKee A, Bowser R, Sherman M, Petrucelli L, Wolozin B. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One.* 2010;5(10):e13250.

-
- ¹⁷¹ Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res.* 2020;152:104609.
- ¹⁷² 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;10(3):1183-1196.
- ¹⁷³ 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;382(2):405-409.
- ¹⁷⁴ Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal.* 2005;17(6):675-689.
- ¹⁷⁵ Cozza G, Pinna LA. Casein kinases as potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(3):319-340.
- ¹⁷⁶ Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M. Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 δ Triggers Mislocalization and Accumulation of TDP-43. *J Biol Chem.* 2016;291(11):5473-5483.
- ¹⁷⁷ Hicks DA, Cross LL, Williamson R, Rattray M. Endoplasmic Reticulum Stress Signalling Induces Casein Kinase 1-Dependent Formation of Cytosolic TDP-43 Inclusions in Motor Neuron-Like Cells. *Neurochem Res.* 2020;45(6):1354-1364.
- ¹⁷⁸ Krach F, Batra R, Wheeler EC, Vu AQ, Wang R, Hutt K, Rabin SJ, Baughn MW, Libby RT, Diaz-Garcia S, Stauffer J, Pirie E, Saberi S, Rodriguez M, Madrigal AA, Kohl Z, Winner B, Yeo GW, Ravits J. Transcriptome-pathology correlation identifies interplay between TDP-43 and the expression of its kinase CK1E in sporadic ALS. *Acta Neuropathol.* 2018;136(3):405-423.
- ¹⁷⁹ Salado IG, Redondo M, Bello ML, Perez C, Liachko NF, Kraemer BC, Miguel L, Lecourtois M, Gil C, Martinez A, Perez DI. Protein kinase CK-1 inhibitors as new potential drugs for amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Chem.* 2014;57(6):2755-2772.
- ¹⁸⁰ Phukan S, Babu VS, Kannoji A, Hariharan R, Balaji VN. GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br J Pharmacol.* 2010;160(1):1-19.
- ¹⁸¹ Koh SH, Baek W, Kim SH. Brief review of the role of glycogen synthase kinase-3 β in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int.* 2011;205761.
- ¹⁸² Hu JH, Zhang H, Wagey R, Krieger C, Pelech SL. Protein kinase and protein phosphatase expression in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Neurochem.* 2003;85(2):432-442.
- ¹⁸³ Yang W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Upregulation of GSK3beta expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Res.* 2008;1196:131-139.
- ¹⁸⁴ Palomo V, Perez DI, Gil C, Martinez A. The potential role of glycogen synthase kinase 3 inhibitors as amyotrophic lateral sclerosis pharmacological therapy. *Curr Med Chem.* 2011;18(20):3028-3034.
- ¹⁸⁵ Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(6):2052-2057.
- ¹⁸⁶ Sugai F, Yamamoto Y, Miyaguchi K, Zhou Z, Sumi H, Hamasaki T, Goto M, Sakoda S. Benefit of valproic acid in suppressing disease progression of ALS model mice. *Eur J Neurosci.* 2004;20(11):3179-3183.
- ¹⁸⁷ Koh SH, Kim Y, Kim HY, Hwang S, Lee CH, Kim SH. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 suppresses the onset of symptoms and disease progression of G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2007;205(2):336-346.
- ¹⁸⁸ de Munck E, Palomo V, Muñoz-Sáez E, Perez DI, Gómez-Miguel B, Solas MT, Gil C, Martínez A, Arahuetes RM. Small GSK-3 Inhibitor Shows Efficacy in a Motor Neuron Disease Murine Model Modulating Autophagy. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162723.

-
- ¹⁸⁹ Yang YM, Gupta SK, Kim KJ, Powers BE, Cerqueira A, Wainger BJ, Ngo HD, Rosowski KA, Schein PA, Aceifei CA, Arvanites AC, Davidow LS, Woolf CJ, Rubin LL. A small molecule screen in stem-cell-derived motor neurons identifies a kinase inhibitor as a candidate therapeutic for ALS. *Cell Stem Cell*. 2013;12(6):713-726.
- ¹⁹⁰ Jiang W, Hunter T. Identification and characterization of a human protein kinase related to budding yeast Cdc7p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14320-14325.
- ¹⁹¹ CDC7 Tissue expression. The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000097046-CDC7/tissue>
- ¹⁹² Sato N, Sato M, Nakayama M, Saitoh R, Arai K, Masai H. Cell cycle regulation of chromatin binding and nuclear localization of human Cdc7-ASK kinase complex. *Genes Cells*. 2003;8(5):451-463.
- ¹⁹³ Bonte D, Lindvall C, Liu H, Dykema K, Furge K, Weinreich M. Cdc7-Dbf4 kinase overexpression in multiple cancers and tumor cell lines is correlated with p53 inactivation. *Neoplasia*. 2008;10(9):920-931.
- ¹⁹⁴ Montagnoli A, Tenca P, Sola F, Carpani D, Brotherton D, Albanese C, Santocanale C. Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64(19):7110-7116.
- ¹⁹⁵ Takahashi M, Tomizawa K, Sato K, Ohtake A, Omori A. A novel tau-tubulin kinase from bovine brain. *FEBS Lett*. 1995;372(1):59-64.
- ¹⁹⁶ Nozal V, Martinez A. Tau Tubulin Kinase 1 (TTBK1), a new player in the fight against neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*. 2019;161:39-47.
- ¹⁹⁷ 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.
- ¹⁹⁸ 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;41(7):1007-1010.
- ¹⁹⁹ 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):223-232.
- ²⁰⁰ Agosta F, Al-Chalabi A, Filippi M, Hardiman O, Kaji R, Meininger V, Nakano I, Shaw P, Shefner J, van den Berg LH, Ludolph A; WFN Research Group on ALS/MND. The El Escorial criteria: strengths and weaknesses. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2015;16(1-2):1-7.
- ²⁰¹ Koistinen P. Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand J Clin Lab Invest*. 1987;47(7):709-714.
- ²⁰² Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol*. 1998;79:179-183.
- ²⁰³ Fisher M, Nelson A. The Chemical Genetic Approach: The Interrogation of Biological Mechanism with Small Molecule Probes. In: Bunnage M, ed. *New frontiers in Chemical Biology: Enabling drug discovery*. RSC Drug Discovery. Royal Society of Chemistry; 2011:1-32.
- ²⁰⁴ Sebastián-Pérez V, Roca C, Awale M, Reymond JL, Martinez A, Gil C, Campillo NE. Medicinal and Biological Chemistry (MBC) Library: An Efficient Source of New Hits. *J Chem Inf Model*. 2017;57(9):2143-2151.
- ²⁰⁵ González-Muñoz M, I Rodríguez-Mahillo A, Gil C, Morán Y, Moneo I, Martínez A, S Mora, J. Glycogen Synthase Kinase-3 β Expression and Phosphorylation in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMMR*. 2013;4:263-271.
- ²⁰⁶ Clinical Trial NCT03692312. Efficacy and Safety of Tideglusib in Congenital Myotonic Dystrophy. ClinicalTrial.gov. 2018. Last update October 27, 2020. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2show/NCT03692312>

-
- ²⁰⁷ Höglinger GU, Huppertz HJ, Wagenpfeil S, Andrés MV, Belloch V, León T, Del Ser T; TAUROS MRI Investigators. Tideglusib reduces progression of brain atrophy in progressive supranuclear palsy in a randomized trial. *Mov Disord*. 2014;29(4):479-487.
- ²⁰⁸ Lovestone S, Boada M, Dubois B, Hüll M, Rinne JO, Huppertz HJ, Calero M, Andrés MV, Gómez-Carrillo B, León T, del Ser T; ARGO investigators. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2015;45(1):75-88.
- ²⁰⁹ Tsaioun K, Bottlaender M, Mabondzo A; Alzheimer's Drug Discovery Foundation. ADDME--Avoiding Drug Development Mistakes Early: central nervous system drug discovery perspective. *BMC Neurol*. 2009;9(1):S1.
- ²¹⁰ Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328-363.
- ²¹¹ Di L, Kerns EH, Bezar IF, Petusky SL, Huang Y. Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J Pharm Sci*. 2009;98(6):1980-1991.
- ²¹² Czupalla CJ, Liebner S, Devraj K. In vitro models of the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*. 2014;1135:415-437.
- ²¹³ Keelan J, Allen NJ, Antcliffe D, Pal S, Duchon MR. Quantitative imaging of glutathione in hippocampal neurons and glia in culture using monochlorobimane. *J Neurosci Res*. 2001;66(5):873-884.
- ²¹⁴ 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;207(1-2):51-58.
- ²¹⁵ Zhang J, Hu J, Ding JH, Yao HH, Hu G. 6-Hydroxydopamine-induced glutathione alteration occurs via glutathione enzyme system in primary cultured astrocytes. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(7):799-805.
- ²¹⁶ Martínez A, Perez DI, Gil C, Martin-Requero A, Rojas-Prats E, Martinez-Gonzalez L, Perez C. CDC-7-inhibitor compounds and use thereof for the treatment of neurological conditions. 2018, WO 2018172587.
- ²¹⁷ Martínez A, Gil C, Martin-Requero A, Rojas-Prats E, Martinez-Gonzalez L. CDC7-inhibiting purine derivatives and their use for the treatment of neurological conditions. 2020, WO 2020058558.
- ²¹⁸ Rojas-Prats E, Martinez-Gonzalez L, Gonzalo-Consuegra C, Liachko NF, Perez C, Ramírez D, Kraemer BC, Martin-Requero A, Perez DI, Gil C, de Lago E, Martinez A. Targeting nuclear protein TDP-43 by cell division cycle kinase 7 inhibitors: A new therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Med Chem*. 2020;210:112968-112987.
- ²¹⁹ Nardo G, Pozzi S, Mantovani S, Garbelli S, Marinou K, Basso M, Mora G, Bendotti C, Bonetto V. Nitroproteomics of peripheral blood mononuclear cells from patients and a rat model of ALS. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(7):1559-1567.
- ²²⁰ Cova E, Cereda C, Galli A, Curti D, Finotti C, Di Poto C, Corato M, Mazzini G, Ceroni M. Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients. *Neurosci Lett*. 2006;399(3):186-190.
- ²²¹ Liu J, Prell T, Stubendorff B, Keiner S, Ringer T, Gunkel A, Tadic V, Goldhammer N, Malci A, Witte OW, Grosskreutz J. Down-regulation of purinergic P2X7 receptor expression and intracellular calcium dysregulation in peripheral blood mononuclear cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2016;630:77-83.
- ²²² Pouloupoulou C, Davaki P, Koliaraki V, Kolovou D, Markakis I, Vassilopoulos D. Reduced expression of metabotropic glutamate receptor 2mRNA in T cells of ALS patients. *Ann Neurol*. 2005;58(6):946-949.
- ²²³ Allen SP, Duffy LM, Shaw PJ, Grierson AJ. Altered age-related changes in bioenergetic properties and mitochondrial morphology in fibroblasts from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging*. 2015;36(10):2893-2903.

-
- ²²⁴ Keskin I, Forsgren E, Lange DJ, Weber M, Birve A, Synofzik M, Gilthorpe JD, Andersen PM, Marklund SL. Effects of Cellular Pathway Disturbances on Misfolded Superoxide Dismutase-1 in Fibroblasts Derived from ALS Patients. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150133.
- ²²⁵ De Marco G, Lupino E, Calvo A, Moglia C, Buccinnà B, Grifoni S, Ramondetti C, Lomartire A, Rinaudo MT, Piccinini M, Giordana MT, Chiò A. Cytoplasmic accumulation of TDP-43 in circulating lymphomonocytes of ALS patients with and without TARDBP mutations. *Acta Neuropathol*. 2011;121(5):611-622.
- ²²⁶ Gibson GE, Huang HM. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci*. 2002;7:d1007-d1015.
- ²²⁷ Achiron A, Gurevich M. Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: the model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2006;5(8):517-522.
- ²²⁸ Brovecki F, Lovrecic L, Zhou J, Jeong H, Then F, Rosas HD, Hersch SM, Hogarth P, Bouzou B, Jensen RV, Krainc D. Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11023-11028.
- ²²⁹ Esteras N, Alquézar C, de la Encarnación A, Villarejo A, Bermejo-Pareja F, Martín-Requero A. Calmodulin levels in blood cells as a potential biomarker of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2013;5(6):55.
- ²³⁰ de las Cuevas N, Muñoz Ú, Bartolomé F, Esteras N, Alquezar C, Martín-Requero Á. Cell cycle and Alzheimer's disease: studies in non-neuronal cells. *J Appl Biomed*. 2010;8(3):121-130.
- ²³¹ Alquezar C, Esteras N, Bartolomé F, Merino JJ, Alzualde A, López de Munain A, Martín-Requero Á. Alteration in cell cycle-related proteins in lymphoblasts from carriers of the c.709-1G>A PGRN mutation associated with FTL-Dementia. *Neurobiol Aging*. 2012;33(2):429.e7-20.
- ²³² Alquézar C, Esteras N, de la Encarnación A, Alzualde A, Moreno F, López de Munain A, Martín-Requero A. PGRN haploinsufficiency increased Wnt5a signaling in peripheral cells from frontotemporal lobar degeneration-progranulin mutation carriers. *Neurobiol Aging*. 2014;35(4):886-898.
- ²³³ Del Cerro P, Alquézar C, Bartolomé F, González-Naranjo P, Pérez C, Carro E, Páez JA, Campillo NE, Martín-Requero Á. Activation of the Cannabinoid Type 2 Receptor by a Novel Indazole Derivative Normalizes the Survival Pattern of Lymphoblasts from Patients with Late-Onset Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*. 2018;32(6):579-591.
- ²³⁴ Martínez-González L, Rodríguez-Cueto C, Cabezudo D, Bartolomé F, Andrés-Benito P, Ferrer I, Gil C, Martín-Requero Á, Fernández-Ruiz J, Martínez A, de Lago E. Motor neuron preservation and decrease of in vivo TDP-43 phosphorylation by protein CK-1δ kinase inhibitor treatment. *Sci Rep*. 2020;10(1):4449.
- ²³⁵ Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007;61(5):427-434.
- ²³⁶ Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2010;9(10):995-1007.
- ²³⁷ Julien JP. Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*. 2001;104(4):581-591.
- ²³⁸ Krieger C, Hu JH, Pelech S. Aberrant protein kinases and phosphoproteins in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(10):535-541.
- ²³⁹ Hu JH, Chernoff K, Pelech S, Krieger C. Protein kinase and protein phosphatase expression in the central nervous system of G93A mSOD over-expressing mice. *J Neurochem*. 2003;85(2):422-431.
- ²⁴⁰ Vaca G, Martinez-Gonzalez L, Fernandez A, Rojas-Prats E, Porrás G, Cuevas EP, Gil C, Martinez A, Martín-Requero Á. Therapeutic potential of novel Cell Division Cycle Kinase 7 inhibitors on TDP-43-related pathogenesis such as Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurochem*. 2020;00:1-12.

-
- ²⁴¹ Bernaus A, Blanco S, Sevilla A. Glia Crosstalk in Neuroinflammatory Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:209.
- ²⁴² Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:198.
- ²⁴³ Zürcher NR, Loggia ML, Lawson R, Chonde DB, Izquierdo-Garcia D, Yasek JE, Akeju O, Catana C, Rosen BR, Cudkowicz ME, Hooker JM, Atassi N. Increased in vivo glial activation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: assessed with [(11)C]-PBR28. *Neuroimage Clin.* 2015;7:409-414.
- ²⁴⁴ Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB. Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis.* 2004;15(3):601-609.
- ²⁴⁵ Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am J Pathol.* 1992;140(3):691-707.
- ²⁴⁶ Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol.* 2004;55(2):221-235.
- ²⁴⁷ Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2012;237(1):147-152.
- ²⁴⁸ Filipi T, Hermanova Z, Tureckova J, Vanatko O, Anderova AM. Glial Cells-The Strategic Targets in Amyotrophic Lateral Sclerosis Treatment. *J Clin Med.* 2020;9(1):261.
- ²⁴⁹ Mora JS, Genge A, Chio A, Estol CJ, Chaverri D, Hernández M, Marín S, Mascias J, Rodriguez GE, Povedano M, Paipa A, Dominguez R, Gamez J, Salvado M, Lunetta C, Ballario C, Riva N, Mandrioli J, Moussy A, Kinet JP, Auclair C, Dubreuil P, Arnold V, Mansfield CD, Hermine O; AB10015 STUDY GROUP. Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2020;21(1-2):5-14.
- ²⁵⁰ Clinical Trial NCT03127267. Efficacy and Safety of Masitinib Versus Placebo in the Treatment of ALS Patients. ClinicalTrials.gov. 2017. Last update November 12, 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03127267>
- ²⁵¹ Morales-Garcia JA, Salado IG, Sanz-San Cristobal M, Gil C, Pérez-Castillo A, Martínez A, Pérez DI. Biological and Pharmacological Characterization of Benzothiazole-Based CK-1δ Inhibitors in Models of Parkinson's Disease. *ACS Omega.* 2017;2(8):5215-5220.
- ²⁵² Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Sanchez-Galiano S, Morales-Garcia JA, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A. NP031112, a thiadiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci.* 2007;27(21):5766-5776.
- ²⁵³ Laaper M, Haque T, Slack RS, Jahani-Asl A. Modeling Neuronal Death and Degeneration in Mouse Primary Cerebellar Granule Neurons. *J Vis Exp.* 2017;(129):55871.
- ²⁵⁴ Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med.* 1999;5(3):347-350.
- ²⁵⁵ Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1996;39(2):147-157.
- ²⁵⁶ Groeneveld GJ, Veldink JH, van der Tweel I, Kalmijn S, Beijer C, de Visser M, Wokke JH, Franssen H, van den Berg LH. A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2003;53(4):437-445.
- ²⁵⁷ Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A. A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2001;2(1):9-18.

-
- ²⁵⁸ Miller RG, Moore DH 2nd, Gelinas DF, Dronsky V, Mendoza M, Barohn RJ, Bryan W, Ravits J, Yuen E, Neville H, Ringel S, Bromberg M, Petajan J, Amato AA, Jackson C, Johnson W, Mandler R, Bosch P, Smith B, Graves M, Ross M, Sorenson EJ, Kelkar P, Parry G, Olney R; Western ALS Study Group. Phase III randomized trial of gabapentin in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2001;56(7):843-848.
- ²⁵⁹ Xu YF, Zhang YJ, Lin WL, Cao X, Stetler C, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L. Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Mol Neurodegener*. 2011;6:73.
- ²⁶⁰ Espejo-Porras F, García-Toscano L, Rodríguez-Cueto C, Santos-García I, de Lago E, Fernandez-Ruiz J. Targeting glial cannabinoid CB₂ receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Br J Pharmacol*. 2019;176(10):1585-1600.
- ²⁶¹ Medina DX, Orr ME, Oddo S. Accumulation of C-terminal fragments of transactive response DNA-binding protein 43 leads to synaptic loss and cognitive deficits in human TDP-43 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2014;35(1):79-87.
- ²⁶² Caccamo A, Majumder S, Oddo S. Cognitive decline typical of frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice expressing the 25-kDa C-terminal fragment of TDP-43. *Am J Pathol*. 2012;180(1):293-302.
- ²⁶³ Hatzipetros T, Bogdanik LP, Tassinari VR, Kidd JD, Moreno AJ, Davis C, Osborne M, Austin A, Vieira FG, Lutz C, Perrin S. C57BL/6J congenic Prp-TDP43A315T mice develop progressive neurodegeneration in the myenteric plexus of the colon without exhibiting key features of ALS. *Brain Res*. 2014;1584:59-72.
- ²⁶⁴ Esmaeili MA, Panahi M, Yadav S, Hennings L, Kiaei M. Premature death of TDP-43 (A315T) transgenic mice due to gastrointestinal complications prior to development of full neurological symptoms of amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(1):56-64.
- ²⁶⁵ Herdewyn S, Cirillo C, Van Den Bosch L, Robberecht W, Vanden Berghe P, Van Damme P. Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice. *Mol Neurodegener*. 2014;9:24.
- ²⁶⁶ Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y, Thode S, Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF. Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J Neurosci*. 2003;23(2):539-549.
- ²⁶⁷ Bissaro M, Federico S, Salmaso V, Sturlese M, Spalluto G, Moro S. Targeting Protein Kinase CK1δ with Riluzole: Could It Be One of the Possible Missing Bricks to Interpret Its Effect in the Treatment of ALS from a Molecular Point of View?. *Chem Med Chem*. 2018;13(24):2601-2605.
- ²⁶⁸ Zhu JW, Li YF, Wang ZT, Jia WQ, Xu RX. Toll-Like Receptor 4 Deficiency Impairs Motor Coordination. *Front Neurosci*. 2016;10:33.
- ²⁶⁹ Cavalla D, Oerton E, Bender A. Drug Repurposing Review. In: Martinez A, Gil C, ed. *Comprehensive Medicinal Chemistry III, Vol 1: General perspective - The future of drug discovery*. 3rd Ed. Elsevier; 2017:11-47.
- ²⁷⁰ Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(1):41-58.
- ²⁷¹ del Ser T, Steinwachs KC, Gertz HJ, Andrés MV, Gómez-Carrillo B, Medina M, Vericat JA, Redondo P, Fleet D, León T. Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *J Alzheimers Dis*. 2013;33(1):205-215.
- ²⁷² Tolosa E, Litvan I, Höglinger GU, Burn D, Lees A, Andrés MV, Gómez-Carrillo B, León T, Del Ser T; TAUROS Investigators. A phase 2 trial of the GSK-3 inhibitor tideglusib in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord*. 2014;29(4):470-478.
- ²⁷³ Anagnostou E, Bennett TA, Thorpe K, Nicolson R. 5.16 A Phase 2 Randomized, Placebo-Controlled Trial of Tideglusib, an Orally Administered GSK-3 Beta Inhibitor, in the Treatment of Adolescents With ASD. *J Am Acad Child Adolesc*. 2018;57(10):S232.

-
- ²⁷⁴ Horrigan J, Gomes TB, Snape M, Nikolenko N, McMorn A, Evans S, Yaroshinsky A, Della Pasqua O, Oosterholt S, Lochmüller H. A Phase 2 Study of AMO-02 (Tideglusib) in Congenital and Childhood-Onset Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). *Pediatr Neurol*. 2020;112:84-93.
- ²⁷⁵ Martinez A, Castro A, Dorransoro I, Alonso M. Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation. *Med Res Rev*. 2002;22(4):373-384.
- ²⁷⁶ Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015;148:114-131.
- ²⁷⁷ Crouch P, Cole A, Cousin M, Martinez A, Kanninen K. Glycogen synthase kinase-3. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;279234.
- ²⁷⁸ Albeely AM, Ryan SD, Perreault ML. Pathogenic Feed-Forward Mechanisms in Alzheimer's and Parkinson's Disease Converge on GSK-3. *Brain Plast*. 2018;4(2):151-167.
- ²⁷⁹ Koh SH, Lee YB, Kim KS, Kim HJ, Kim M, Lee YJ, Kim J, Lee KW, Kim SH. Role of GSK-3beta activity in motor neuronal cell death induced by G93A or A4V mutant hSOD1 gene. *Eur J Neurosci*. 2005;22(2):301-309.
- ²⁸⁰ Stoica R, De Vos KJ, Paillasson S, Mueller S, Sancho RM, Lau KF, Vizcay-Barrena G, Lin WL, Xu YF, Lewis J, Dickson DW, Petrucelli L, Mitchell JC, Shaw CE, Miller CC. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun*. 2014;5:3996.
- ²⁸¹ Ambegaokar SS, Jackson GR. Functional genomic screen and network analysis reveal novel modifiers of tauopathy dissociated from tau phosphorylation. *Hum Mol Genet*. 2011;20(24):4947-4977.
- ²⁸² Sreedharan J, Neukomm LJ, Brown RH Jr, Freeman MR. Age-Dependent TDP-43-Mediated Motor Neuron Degeneration Requires GSK3, hat-trick, and xmas-2. *Curr Biol*. 2015;25(16):2130-2136.
- ²⁸³ Boll MC, Bayliss L, Vargas-Cañás S, Burgos J, Montes S, Peñalosa-Solano G, Rios C, Alcaraz-Zubeldia M. Clinical and biological changes under treatment with lithium carbonate and valproic acid in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2014;340(1-2):103-108.
- ²⁸⁴ Martinez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, Moreno FJ. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem*. 2002;45(6):1292-1299.
- ²⁸⁵ Martinez A, Alonso M, Castro A, Dorransoro I. GSK-3 inhibitors in Alzheimer's disease: TDZDs, from Discovery to clinical trials. In: Martinez A, ed. Medicinal Chemistry of Alzheimer's disease. Transworld Research Network; 2008:225-253.
- ²⁸⁶ Morales-Garcia JA, Luna-Medina R, Alonso-Gil S, Sanz-Sancristobal M, Palomo V, Gil C, Santos A, Martinez A, Perez-Castillo A. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(11):963-971.
- ²⁸⁷ Williams DR, Lees AJ. Progressive supranuclear palsy: clinicopathological concepts and diagnostic challenges. *Lancet Neurol*. 2009;8(3):270-279.
- ²⁸⁸ Franklin AV, King MK, Palomo V, Martinez A, McMahon LL, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors reverse deficits in long-term potentiation and cognition in fragile X mice. *Biol Psychiatry*. 2014;75(3):198-206.
- ²⁸⁹ Caracci MO, Ávila ME, De Ferrari GV. Synaptic Wnt/GSK3β Signaling Hub in Autism. *Neural Plast*. 2016;9603751.
- ²⁹⁰ Jones K, Wei C, Iakova P, Bugiardini E, Schneider-Gold C, Meola G, Woodgett J, Killian J, Timchenko NA, Timchenko LT. GSK3β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4461-4472.
- ²⁹¹ Wei C, Jones K, Timchenko NA, Timchenko L. GSK3β is a new therapeutic target for myotonic dystrophy type 1. *Rare Dis*. 2013;1:e26555.

-
- ²⁹² Wang M, Weng WC, Stock L, Lindquist D, Martinez A, Gourdon G, Timchenko N, Snape M, Timchenko L. Correction of Glycogen Synthase Kinase 3 β in Myotonic Dystrophy 1 Reduces the Mutant RNA and Improves Postnatal Survival of DMSXL Mice. *Mol Cell Biol*. 2019;39(21):e00155-19.
- ²⁹³ Kimelman D, Xu W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*. 2006;25(57):7482-7491.
- ²⁹⁴ MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26.
- ²⁹⁵ Bhat RV, Andersson U, Andersson S, Knerr L, Bauer U, Sundgren-Andersson AK. The Conundrum of GSK3 Inhibitors: Is it the Dawn of a New Beginning?. *J Alzheimers Dis*. 2018;64(s1):S547-S554.
- ²⁹⁶ Martinez A, Perez DI, Gil C. Lessons learnt from glycogen synthase kinase 3 inhibitors development for Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(15):1808-1819.
- ²⁹⁷ Shorter E. The history of lithium therapy. *Bipolar Disord*. 2009;11(2):4-9.
- ²⁹⁸ Palomo V, Perez DI, Roca C, Anderson C, Rodríguez-Muela N, Perez C, Morales-Garcia JA, Reyes JA, Campillo NE, Perez-Castillo AM, Rubin LL, Timchenko L, Gil C, Martinez A. Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 β : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases. *J Med Chem*. 2017;60(12):4983-5001.
- ²⁹⁹ Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A, Gómez-Isla T. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis*. 2009;35(3):359-367.
- ³⁰⁰ Bolós M, Fernandez S, Torres-Aleman I. Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17693-17700.

IX. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo realizado durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha permitido la elaboración de las siguientes publicaciones y patentes.

❖ **Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:**

Posa D*, Martínez-González L*, Bartolomé F*, Nagaraj S, Porrás 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.

Martínez-González L*, Rodríguez-Cueto C, Cabezudo D, Bartolomé F, Andrés-Benito P, Ferrer I, Gil C, Martín-Requero Á, Fernández-Ruiz J, Martínez A, de Lago E. Motor neuron preservation and decrease of in vivo TDP-43 phosphorylation by protein CK-1 δ kinase inhibitor treatment. *Sci Rep.* **2020**;10(1):4449.

Vaca G*, Martínez-González L*, Fernandez A, Rojas-Prats E, Porrás G, Cuevas EP, Gil C, Martinez A, Martín-Requero Á. Therapeutic potential of novel Cell Division Cycle Kinase 7 inhibitors on TDP-43-related pathogenesis such as Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neurochem.* **2020**;10.

Rojas-Prats E*, Martínez-González L*, Gonzalo-Consuegra C, Liachko NF, Perez C, Ramírez D, Kraemer BC, Martín-Requero Á, Perez DI, Gil C, de Lago E, Martinez A. Targeting nuclear protein TDP-43 by cell division cycle kinase 7 inhibitors: A new therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Med Chem.* **2020**;210:112968-112987.

Martínez-González L*, Porrás, G, Martín-Requero A, de Lago E, Martínez, A. Therapeutic potential of Tideglusib in TDP-43-related pathogenesis in Amyotrophic Lateral Sclerosis. En preparación.

*Primer autor

❖ **Patentes desarrolladas durante la Tesis Doctoral:**

Martínez A, Perez DI, Gil C, Martín-Requero A, Rojas-Prats E, Martínez-González L, Perez C. CDC-7-inhibitor compounds and use thereof for the treatment of neurological conditions. **2018**, WO 2018172587.

Martínez A, Gil C, Martín-Requero A, Rojas-Prats E, Martínez-González L. CDC7-inhibiting purine derivatives and their use for the treatment of neurological conditions. **2020**, WO 2020058558.

❖ **Otras publicaciones realizadas durante el periodo de investigación:**

➤ Expresión, cristalización y co-inmunoprecipitación de proteínas:

Mansilla A, Chaves-Sanjuan A, Campillo NE, Semelidou O, Martínez-González L, Infantes L, González-Rubio JM, Gil C, Conde S, Skoulakis EM, Ferrús A, Martínez A, Sánchez-Barrena MJ. Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2017**;114(6):E999-E1008.

Roca C*, Martínez-González L*, Daniel-Mozo M, Sastre J, Infantes L, Mansilla A, Chaves-Sanjuan A, González-Rubio JM, Gil C, Cañada FJ, Martinez A, Sanchez-Barrena MJ, Campillo NE. Deciphering the Inhibition of the Neuronal Calcium Sensor 1 and the Guanine Exchange Factor Ric8a with a Small Phenothiazine Molecule for the Rational Generation of Therapeutic Synapse Function Regulators. *J Med Chem*. **2018**;61(14):5910-5921.

Canal-Martín A, Sastre J, Sánchez-Barrena MJ, Canales A, Baldominos S, Pascual N, Martínez-González L, Molero D, Fernández-Valle ME, Sáez E, Blanco-Gabella P, Gómez-Rubio E, Martín-Santamaría S, Sáiz A, Mansilla A, Cañada FJ, Jiménez-Barbero J, Martínez A, Pérez-Fernández R. *Nat Commun*. **2019**;10(1):2798.

➤ Metodología PAMPA-BHE:

Silva T, Mohamed T, Shakeri A, Rao PP, Martínez-González L, Pérez DI, Martínez A, Valente MJ, Garrido J, Uriarte E, Serrão P, Soares-da-Silva P, Remião F, Borges F. Development of Blood-Brain Barrier Permeable Nitrocatechol-Based Catechol O-Methyltransferase Inhibitors with Reduced Potential for Hepatotoxicity. *J Med Chem*. **2016**;59(16):7584-7597.

Chierrito TPC, Pedersoli-Mantoani S, Roca C, Sebastian-Pérez V, Martínez-González L, Pérez DI, Perez C, Canales A, Cañada FJ, Campillo NE, Carvalho I, Martinez A. Chameleon-like behavior of indolylpiperidines in complex with cholinesterases targets: Potent butyrylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem*. **2018**;145:431-444.

Gandini A, Bartolini M, Tedesco D, Martínez-González L, Roca C, Campillo NE, Zaldivar-Diez J, Perez C, Zuccheri G, Miti A, Feoli A, Castellano S, Petralla S, Monti B, Rossi M, Moda F, Legname G, Martinez A, Bolognesi ML. Tau-Centric Multitarget Approach for Alzheimer's Disease: Development of First-in-Class Dual Glycogen Synthase Kinase 3 β and Tau-Aggregation Inhibitors. *J Med Chem*. **2018**;61(17):7640-7656.

Uliassi E, Peña-Altamira LE, Morales AV, Massenzio F, Petralla S, Rossi M, Roberti M, Martínez-González L, Martínez A, Monti B, Bolognesi ML. A Focused Library of Psychotropic Analogues with Neuroprotective and Neuroregenerative Potential. *ACS Chem Neurosci*. **2019**;10(1):279-294.

Sciú ML, Sebastián-Pérez V, Martínez-González L, Benitez R, Perez DI, Pérez C, Campillo NE, Martínez A, Moyano EL. Computer-aided molecular design of pyrazolotriazines targeting glycogen synthase kinase 3. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **2019**;34(1):87-96.

Kohelová E, Peřinová R, Maafi N, Korábečný J, Hulcová D, Maříková J, Kučera T, Martínez González L, Hrabínova M, Vorčáková K, Nováková L, De Simone A, Havelek R, Cahlíková L. Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules*. **2019**;24(7):1307.

Di Martino RMC, Pruccoli L, Bisi A, Gobbi S, Rampa A, Martínez A, Pérez C, Martínez-González L, Paglione M, Di Schiavi E, Seghetti F, Tarozzi A, Belluti F. Novel Curcumin-Diethyl Fumarate Hybrid as a Dualistic GSK-3 β Inhibitor/Nrf2 Inducer for the Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci*. **2020**;11(17):2728-2740.

Rojas-Prats E, Tosat-Bitrián C, Martínez-González L, Nozal V, Pérez DI, Martínez A. Increasing brain permeability of PHA-767491, a cell division cycle 7 kinase inhibitor, with biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharmaceutics*. **2021**;13(2):180-195.

X. ANEXO

ANEXO I. Consentimiento informado del paciente.

Proyecto "ELA-MADRID-CM" – B2017/BMD-3813
Diseño y desarrollo de Fármacos Innovadores para el Tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica – "ELA"

1973

Consentimiento Informado para la/el PACIENTE

Proyecto: Diseño y desarrollo de fármacos innovadores para el tratamiento la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Yo,
Declaro que

(nombre y apellidos de la/del PACIENTE)

- He leído la Hoja de información que se me ha entregado
- He recibido suficiente información
- He podido formular las preguntas que he considerado oportunas

He hablado con: (nombre del investigador asociado al proyecto)

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria y expreso libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

Nombre (Paciente) Firma Fecha

Nombre (Investigador) Firma Fecha

Autorizo el uso de posibles excedentes en otros proyectos relacionados

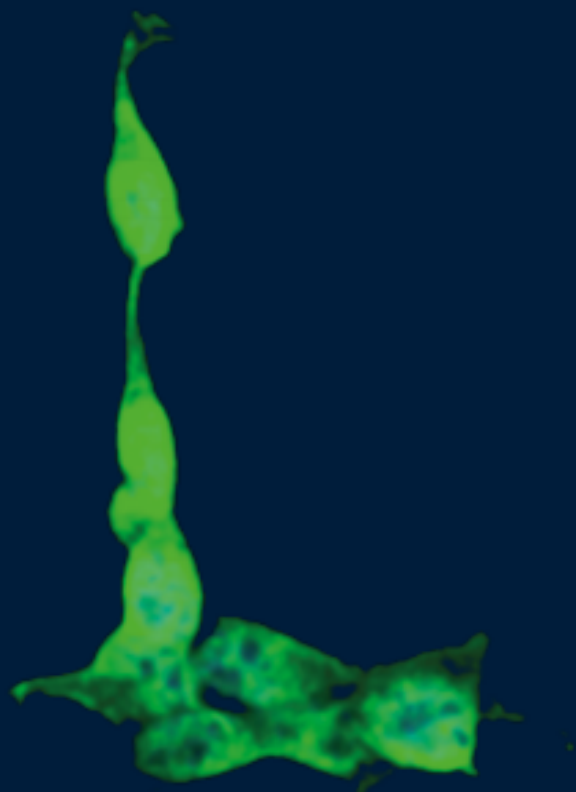
Si

No

Autorizo poder ser contactado en el caso de necesitar más información o ser informado de nuevas líneas de investigación

Si

No



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS