

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 348**

51 Int. Cl.:

A61K 33/04 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2007 E 07718638 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **24.12.2008 EP 2004204**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas con selenato**

30 Prioridad:

29.03.2006 US 787240 P

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

30.01.2013

73 Titular/es:

**VELACOR THERAPEUTICS PTY LTD (100.0%)
205-211 GRATTAN STREET
PARKVILLE, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**HOVENS, CHRISTOPHER y
CORCORAN, NIALL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 394 348 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas con selenato

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a selenato o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y a composiciones del mismo para su uso en la potenciación de la actividad de PP2A. La presente invención también se refiere a selenato o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inhibición o reducción de la fosforilación de proteína tau, para su uso en la inhibición de la actividad de GSK3 β y particularmente para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas. En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con otras terapias para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

15 **Antecedentes de la invención**

Enfermedad neurodegenerativa es una expresión general para una serie de trastornos que actúan comprometiendo la capacidad cerebral para controlarse o para controlar el cuerpo dañando neuronas que facilitan la función cerebral normal. Las enfermedades neurodegenerativas son principalmente enfermedades de personas mayores. Con el aumento de la esperanza de vida, la población mundial está viviendo más tiempo y el número de pacientes de enfermedades neurodegenerativas se ha incrementado.

En una serie de trastornos neurodegenerativos hay una deposición de proteína tau anormal en neuronas y neuroglíocitos del cerebro. Por ejemplo, se ha encontrado proteína tau anormal en ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad de Alzheimer (AD). Los ovillos neurofibrilares (NT) son una de las dos características neuropatológicas de la AD [Lee y col., 2001]. Los filamentos helicoidales apareados (PHF) son el componente estructural principal de las NT y están compuestos principalmente por proteína tau asociada a microtúbulos [Lee y col., 1991, Grundke-Iqbal y col. 1986a, Grundke-Iqbal y col., 1986b]. La PHF-tau (proteína tau aislada de los PHF) es muy insoluble, muestra movilidad retardada en gel SDS y es incapaz de unirse a microtúbulos debido a que está fosforilada anormalmente (fosforilada en más sitios que en la proteína tau normal) [Lee y col., 1991, Grundke-Iqbal y col. 1986a, Grundke-Iqbal y col., 1986b]. Después de la desfosforilación, la PHF-tau se vuelve soluble y es tan capaz como la proteína tau normal de unirse a, y promover un ensamble con, microtúbulos [Wang y col., 1995, Wang y col., 1996, Bramblett y col., 1993]. Se cree que la fosforilación de tau anormal causa disfunción de tau, inestabilidad en los microtúbulos, pérdida de transporte axonal, neurodegeneración y demencia asociada con AD [Alonso y col., 1996].

Un tipo de proteína tau anormal es la proteína tau hiperfosforilada. Se sabe que la proteína tau está fosforilada en una serie de sitios de fosforilación por glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) *in vivo*, incluido el residuo Ser³⁹⁶ específico de la enfermedad de Alzheimer [Li y Paudel, 2006]. A su vez, se sabe que GSK3 β está fosforilada por la proteína quinasa Akt y se sabe que la actividad de Akt está atenuada por la proteína fosfatasa PP2A.

La PP2A es una holoenzima heterotrimérica que existe en múltiples formas compuesta por una estructura de núcleo común unida a diferentes subunidades reguladoras [Mumby y Walter, 1993]. El núcleo de la enzima es un complejo entre las subunidades catalítica (C) y estructural (A). Una tercera clase de subunidad, denominada B, comprende varios polipéptidos que regulan la actividad y la especificidad de PP2A [Mumby y Walter, 1993, Kamibayashi y col. 1994]. Una porción significativa de la isoforma ABC de PP2A está asociada con microtúbulos neuronales [Sontag y col., 1995], implicando a PP2A en la regulación del estado de fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), tales como tau. Se ha demostrado que la PP2A que contiene las subunidades reguladoras B, pero no otras formas de PP2A, (es decir, B' y B'') se une a, y desfosforila potentemente, tau *in vitro*. Además, la inhibición de la isoforma ABC de PP2A induce la hiperfosforilación de tau, la disociación de tau de microtúbulos y la pérdida de estabilización de microtúbulos inducida por tau [Sontag y col., 1996]. Se ha demostrado recientemente que la PP2A explica aproximadamente el 71 % de la actividad de fosfatasa de tau del cerebro humano [Liu y col., 2005]. La actividad de fosfatasa total y las actividades de PP2A frente a tau están reducidas significativamente en cerebros de pacientes con AD mientras que las de otras fosfatasas tales como PP2B están realmente aumentadas en el cerebro con AD [Liu y col., 2005]. La actividad de PP2A se correlaciona negativamente al nivel de fosforilación de tau en la mayor parte de los sitios de fosforilación en cerebros humanos. Esto indica que la PP2A es la fosfatasa tau principal que regula su fosforilación en múltiples sitios en el cerebro humano. Esto implica que la hiperfosforilación anormal de tau se debe parcialmente a la regulación a la baja de la actividad de PP2A en cerebros con AD y que agentes que pueden actuar potenciando la actividad de PP2A y en particular la isoforma ABC de PP2A tendrían utilidad clínica en el tratamiento y/o la prevención del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Existe también la evidencia creciente de que la fosforilación anormal de la proteína tau puede estar asociada con trastornos neurodegenerativos en los que está presente la síntesis anormal de α -sinucleína. Las patologías de tau y de α -sinucleína tienen lugar ambas en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, complejo Guam-Parkinson-ALS-demencia y enfermedad de Parkinson provocada por mutaciones en α -sinucleína (Duda y col., 2002,

Forman y col., 2002, Ishizawa y col., 2003).

5 La proteína α -sinucleína parece tener un papel importante en la patofisiología de la enfermedad de Parkinson (PD). Los cuerpos de Lewy son una característica patológica de la PD que están compuestos principalmente por α -sinucleína (Spillantini y col., 1997; Spillantini y col., 1998b).

10 Se piensa que la α -sinucleína tiene un papel crítico en la patofisiología de la PD debido a que se acumula en cuerpos de Lewy y debido a que estudios genéticos han identificado mutaciones en α -sinucleína que están asociadas con la PD familiar (Kruger y col., 1998; Polymeropoulos y col., 1997; Singleton y col., 2003; Spillantini y col., 1998b; Zarranz y col., 2004).

15 Las mutaciones A53T y A30P en α -sinucleína parecen ser causantes de PD por el aumento de la tendencia de α -sinucleína a formas agregados. Las mutaciones aumentan la tendencia de α -sinucleína a formar agregados espontáneamente o en respuesta a factores exógenos, tales como metales y estrés oxidativo (Conway y col., 2000; Hashimoto y col., 1999; Kruger y col., 1998; Ostrerova-Golts y col., 2000; Paik y col., 1999, 2000; Polymeropoulos y col., 1997).

20 Las mutaciones A53T y A30P en α -sinucleína también causan la agregación de α -sinucleína dependiente de la edad y lesión neuronal en ratones transgénicos y *Drosophila* (Feany and Bender, 2000; Giasson y col., 2002; Kahle y col., 2001; Masliah y col.). Estos resultados enfatizan la relevancia de α -sinucleína en el estudio de la neurodegeneración.

25 La tau fosforilada anormal está presente en cuerpos de Lewy encontrados en pacientes con PD esporádica y está presente en zonas cercanas a neuronas que contienen patología de α -sinucleína (Ishizawa y col., 2003). La evidencia *in vitro* también enlaza α -sinucleína y tau ya que la α -sinucleína se une a tau *in vitro* y estimula la fosforilación de tau por la proteína quinasa A *in vitro* (Giasson y col., 2003; Jensen y col., 1999). Resultados recientes indican que la α -sinucleína potencia la fibrilación de tau *in vitro* y que las fibrillas tau anormales están presentes en el cerebro de ratones transgénicos sintomáticos que sobreexpresan el mutante A53T de α -sinucleína (Giasson y col., 2003).

30 Frasier M y col. 2005, han demostrado que la agregación de α -sinucleína A30P tiene lugar a lo largo de la patología tau y que la agregación de α -sinucleína tiene lugar en paralelo con la patología tau en ratones transgénicos que sobreexpresan α -sinucleína A30P, y han demostrado que ratones transgénicos sintomáticos a α -sinucleína A30P muestran fosforilación de tau anormal y que la fosforilación se correlaciona con la activación de una quinasa c-jun.

35 Además de la agregación de α -sinucleína (α -sin), el estrés oxidativo y la exposición a determinadas neurotoxinas tales como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) están asociadas con la patogénesis de PD. La MPTP induce una degeneración selectiva de la ruta dopaminérgica nigrostriatal en ratones y primates, tal como se ha observado en PD, asociada con el aumento de niveles de expresión y agregación de α -sin, pero sin inducir cuerpos de Lewy reales (Dauer y Przedborski, 2003), pero desencadenando la formación de inclusiones nigrales inmunorreactivas para ubiquitina y α -sinucleína en la administración continua de MPTP (Fornai y col., 2005). Otro componente de determinados cuerpos de Lewy es tau fosforilada anormalmente (Ishizawa y col., 2003). Se ha informado de la colocalización de tau y α -sin como agregados o inclusiones, o dentro de determinados cuerpos de Lewy o inclusiones similares a cuerpos de Lewy, en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) familiar, síndrome de Down y enfermedad de cuerpos de Lewy (Kotzbauer y col., 2001; Lippa y col., 1999; Arima y col., 1999; Iseki y col., 1999).

50 Las similitudes entre tau y α -sin incluyen la expresión en neuronas presinápticas, una semivida *in vivo* larga, su naturaleza "desplegada de forma nativa" que permite su termoestabilidad, y su propensión a fibrilarse a través de tramos de residuos hidrófobos que forman el núcleo de fibrillas ensambladas (Friedhoff y col., 2000; Serpell y col., 2000).

55 Otros datos *in vitro* con el mutante doble [396/404]S 3E (un constructo de seudofosforilación que imita los sitios de fosforilación de PHF-1 en los que dos residuos de serina en las posiciones 396 y 404 en la isoforma humana más larga de tau, ht40, están reemplazados por residuos de glutamato) de tau también indica que la fosforilación en Ser396/404 puede causar que el extremo C terminal de tau asuma una conformación más extendida, lo que altera su efecto inhibitorio sobre la oligomerización de tau y potencia la velocidad de formación de filamentos (Abraha y col., 2000).

60 Duka T y col., 2006, han demostrado ahora que el aumento inducido por MPTP de niveles de expresión de α -sin en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas promueve cambios en los patrones de fosforilación de tau en el sitio de unión a PHF-1 (Ser396/404), dando como resultado una deslocalización de ambas proteínas y con coimmunoprecipitación aumentada, junto con niveles aumentados de tau hiperfosforilada insoluble en sarcosilo, sugiriendo que una etapa inicial de parkinsonismo inducido por MPTP y neurotoxicidad es una hiperfosforilación de

tau dirigida por α -sin en Ser396/404.

Los hallazgos de que MPTP causa una disociación aumentada de α -sin de microtúbulos junto con disminuciones en niveles de tau fosforilada asociados con la fracción unida al citoesqueleto, también pueden ser relevantes para el/los mecanismo(s) que subyace(n) en el proceso neurodegenerativo. La hiperfosforilación de tau reduce ampliamente la afinidad de tau por microtúbulos, provocando su desestabilización (Drechsel y col., 1992; Biernat y col., 1993; Michaelis y col., 2002). Además, también se sabe que la tau fosforilada se une a, y reduce la cantidad de, otras proteínas de unión a microtúbulos, tales como MAP1 y MAP2, de los microtúbulos (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2005). Además, ya que se sabe que α -sin se une a microtúbulos (Wersinger y Sidhu, 2005) con un posible papel en el transporte axonal (Sidhu y col., 2004), es probable que la disociación de esta proteína de los microtúbulos agrave adicionalmente la inestabilidad de microtúbulos, interrumpiendo la red del citoesqueleto y la homeostasis celular. De este modo, la disociación de α -sin de microtúbulos y anomalías en las propiedades de tau unida a microtúbulos pueden comprender otro eslabón en la cadena de eventos que conduce a los procesos neurodegenerativos asociados con la formación de inclusiones.

Las anomalías inducidas por MPTP en niveles de α -sin modulan la formación de tau fosforilada, y la forma PHF-1 de tau, en particular, proporciona percepciones en el desarrollo de fases tempranas de formación de PHF y la pérdida asociada de función neuronal vital y sugiere que síndromes parkinsonianos inducidos por MPTP o neurotoxicidad pueden ser una tauopatía con alteraciones concomitantes en α -sin de un modo reminiscente de sinucleopatías.

Esto sugiere que anomalías de una proteína (tau) que se sabe que se movilizan durante la patogénesis de AD, también pueden movilizarse en parkinsonismo pero en una región del cerebro que no está asociada con AD, sugiriendo por lo tanto un solapamiento considerable en la génesis de determinadas enfermedades neurodegenerativas. Esto sugiere que las enfermedades neurodegenerativas que parecen no estar relacionadas pueden realmente tener eventos desencadenantes comunes y patologías subsiguientes, que inician la degeneración neuronal.

El documento WO 03/066071 divulga composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de un fármaco psicotrópico y biológicamente asimilable de selenio para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en pacientes que también están siendo tratados por trastornos psiquiátricos y neurológicos.

El documento EP 1774972 divulga que levadura selenizada puede usarse para alterar la expresión de algunos genes asociados con la enfermedad y/o la edad.

El documento US 2005/0142216 divulga un método para reducir los efectos de demencia por Alzheimer administrando amoxicilina y vitamina B₁₂ a un paciente en el que puede ser útil también la administración de S-adenosil-L-metionina y selenio.

Existe la necesidad de agentes que afecten la fosforilación de la proteína tau y sean clínicamente útiles en el tratamiento o la prevención de trastorno neurodegenerativos.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la actividad de la proteína fosfatasa PP2A puede potenciarse mediante la exposición a selenato o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La potenciación de la actividad de PP2A puede reducir o inhibir la fosforilación de proteína tau, especialmente la hiperfosforilación, con un enfoque doble: i) la desfosforilación e inactivación de Akt, reduciendo de este modo la fosforilación de GSK3 β y reduciendo consecuentemente la fosforilación de la proteína tau, y ii) la desfosforilación directa de la proteína tau. Una reducción de la fosforilación, especialmente la hiperfosforilación de la proteína tau reduce o evita la acumulación o la deposición de proteína tau anormal en neuronas y neuroglíocitos y, por lo tanto, es útil en el tratamiento o prevención de trastornos neurodegenerativos.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones la enfermedad neurodegenerativa es una tauopatía. En algunas realizaciones la enfermedad neurodegenerativa es una α -sinucleopatía. En realizaciones específicas, la enfermedad neurodegenerativa está seleccionada de demencia presenil, demencia senil, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

En otro aspecto de la invención se proporciona selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inhibición o reducción de la fosforilación de una proteína tau en una neurona, neuroglíocito o cuerpo de Lewy. En algunas realizaciones, la proteína tau es una proteína tau asociada a microtúbulos. En algunas realizaciones, la proteína tau está en un ovillo neurofibrilar. En algunas realizaciones, se inhibe o evita la hiperfosforilación de la proteína tau.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la potenciación de la actividad de PP2A. En algunas realizaciones, la PP2A es una isoforma que desfosforila Akt. En algunas realizaciones, la PP2A es una isoforma que desfosforila proteínas tau, especialmente proteínas tau asociadas a microtúbulos encontradas en neuronas y neuroglíocitos y cuerpos de Lewy.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la inhibición de la actividad de GSK3 β en una neurona o neuroglíocito.

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa.

15 En algunas realizaciones de los usos descritos ampliamente anteriormente, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se usa para su administración en combinación con otras terapias adecuadas para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas o terapias adecuadas para aliviar los síntomas de enfermedades neurodegenerativas.

Descripción de la invención

1. Definiciones

20 A menos de que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen los mismos significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse en la puesta en práctica o análisis de la presente invención algunos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos, se describen los métodos y materiales preferentes. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

30 Los artículos "un" y "una" tal como se usan en el presente documento se refieren a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a cantidad, nivel, valor, tamaño o cantidad que varía como mucho el 30 %, 20 % o 10 % de la cantidad, nivel, valor, dimensión, tamaño o cantidad de referencia.

35 A lo largo de la memoria y de las reivindicaciones que la siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprenden" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa establecida o un grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

40 El término "desfosforilación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la eliminación química de un grupo fosfato (PO_4^{2-}) de una entidad bioquímica tal como una proteína. En condiciones celulares, la desfosforilación se logra enzimáticamente mediante una enzima tal como una fosfatasa.

45 Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "neuroglíocito" y "neuroglíocitos" se refieren a células no neuronales que proporcionan un soporte estructural y metabólico para neuronas en el sistema nervioso central. Los neuroglíocitos también pueden denominarse neuroglías o glías.

50 El término "hiperfosforilación" se refiere a la circunstancia en la que todos los sitios de fosforilación disponibles en una entidad bioquímica tal como una proteína, están fosforilados. No puede tener lugar ninguna fosforilación adicional de la entidad bioquímica. La frase "que inhibe o reduce la hiperfosforilación" incluye evitar que todos los sitios en una entidad bioquímica estén fosforilados y disminuya el número de entidades bioquímicas que tienen todos sus sitios de fosforilación fosforilados.

55 Tal como se usa en el presente documento "en combinación con" se refiere al tratamiento de un sujeto con al menos dos agentes de modo que sus efectos sobre la enfermedad neurodegenerativa ocurran, al menos en parte, durante el mismo periodo de tiempo. La administración de al menos dos agentes puede tener lugar simultáneamente en una única composición, o cada agente puede administrarse simultánea o secuencialmente en composiciones separadas.

60 Las expresiones "cuerpo de Lewy" y "cuerpos de Lewy" se refieren a agregados anormales de proteínas que se desarrollan en células nerviosas. El agregado proteico principal en un cuerpo de Lewy está compuesto por α -sinucleína.

65 La expresión "enfermedad neurodegenerativa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad neurológica caracterizada por la pérdida o degeneración de neuronas. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen trastorno neurodegenerativo del movimiento y afecciones neurodegenerativas relacionadas con la pérdida de memoria y/o demencia. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen tauopatías y

α -sinucleopatías. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, pero no están limitadas a, demencia presenil, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, parkinsonismo ligado a cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis subnuclear progresiva, enfermedad de Pick, afasia progresiva primaria, demencia frontotemporal, demencia corticobasal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson con demencia, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, atrofia del sistema múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y síndrome de Hallervorden-Spatz.

La expresión "ovillos neurofibrilares", tal como se usa en el presente documento, se refiere a estructuras anormales localizadas en el cerebro y compuestas por haces densos de filamentos helicoidales apareados (neurofilamentos y microtúbulos). Los ovillos neurofibrilares incluyen proteínas tau, en particular proteínas tau asociadas con microtúbulos. El número de ovillos neurofibrilares presentes en el cerebro se cree que está relacionado con el grado de demencia en el sujeto. Los ovillos neurofibrilares son una característica distintiva de la enfermedad de Alzheimer.

Tal como se usa en el presente documento, el término "neurona" se refiere a células encontradas en el sistema nervioso central que están especializadas en recibir, procesar y transmitir información. Las neuronas también pueden denominarse células nerviosas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad nutricional" incluye una cantidad de selenio que proporciona una ingesta diaria promedio. En Estados Unidos, la ingesta diaria promedio es 80-120 $\mu\text{g}/\text{día}$.

Por "sal farmacéuticamente", tal como se usa en el presente documento con respecto al selenato, significa sales de iones metálicos que son toxicológicamente seguras para la administración a seres humanos y a animales. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico, o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como ácidos acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, mícico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

Las sales básicas incluyen, pero no están limitadas a, las formadas con cationes farmacéuticamente aceptables, tales como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, hierro, níquel, cinc, amonio y alquilamonio.

Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con tales agentes como haluros de alquilo inferiores, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfato de dimetilo y dietilo, y otros.

Las sales de iones metálicos adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, sales de sodio, potasio, litio, magnesio, calcio, hierro, níquel, cinc, amonio y alquilamonio. En algunas realizaciones la sal no es selenato de litio. Una sal preferente de selenato es la sal de sodio, Na_2SeO_4 .

El término "fosforilación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la adición química de un grupo fosfato (PO_4^{2-}) a una entidad bioquímica tal como una proteína. En condiciones celulares, la fosforilación se logra enzimáticamente mediante una enzima tal como una quinasa. La frase "que inhibe o reduce la fosforilación" incluye evitar la fosforilación de uno o varios sitios de fosforilación en una entidad bioquímica, incluyendo evitar la fosforilación de todos los sitios de fosforilación como en la hiperfosforilación. Esta frase también incluye disminuir la extensión de la fosforilación de una entidad bioquímica evitando que la fosforilación tenga lugar en uno o varios sitios de fosforilación o como resultado de que tenga lugar una desfosforilación en uno o varios sitios fosforilados de la entidad bioquímica.

Los términos "sujeto" o "individuo" o "paciente", que se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a cualquier sujeto, particularmente a un sujeto vertebrado y más particularmente a un sujeto mamífero, para el que se desea prevención o tratamiento. Los animales vertebrados adecuados que están incluidos en el ámbito de la invención incluyen, pero no están limitados a, primates, aves, ganado (por ejemplo, cerdos, ovejas, vacas, caballos, burros), animales de experimentación en laboratorio (por ejemplo, conejos, ratones, ratas, cobayas, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, gatos y perros) y animales silvestres en cautividad (por ejemplo, zorros, ciervos, dingos). Un sujeto preferente es un ser humano con necesidad de tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, especialmente enfermedad de Alzheimer o demencia. No obstante, se entenderá que los términos mencionados anteriormente no implican que haya presencia de síntomas.

El término "sobrenutricional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es superior a la cantidad considerada como requerimiento nutricional. En Estados Unidos, la ingesta diaria promedio de selenio es 80-120 $\mu\text{g}/\text{día}$. Una cantidad sobrenutricional de selenio proporciona selenio a un sujeto sobre la provisión diaria recomendada. Por ejemplo, una cantidad sobrenutricional de selenio puede ser de 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20 mg/kg por día, de 0,015 mg/kg a 20 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 20,0 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 14 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 13 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 12 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 9 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 8 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 7 mg/kg , de 0,1 mg/kg a 6 mg/kg , de 0,15 mg/kg a 5 mg/kg , de 0,15 mg/kg a 4 mg/kg , de 0,15 mg/kg a 3 mg/kg , de

0,15 mg/kg a 2 mg/kg, de 0,15 mg/kg a 1 mg/kg por día, especialmente de 0,1 mg/kg a 14 mg/kg, de 0,07 mg/kg a 6,5 mg/kg o de 0,15 mg/kg a 5 mg/kg por día, más especialmente de 0,07 mg/kg a 2 mg/kg por día.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término " α -sinucleopatía" se refiere a un trastorno o enfermedad neurodegenerativa que implica la agregación de α -sinucleína o α -sinucleína anormal en células nerviosas en el cerebro. Las α -sinucleopatías incluyen, pero no están limitadas a, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson con demencia, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Pick, síndrome de Down, atrofia del sistema múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y síndrome de Hallervorden-Spatz.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz", en el contexto de tratamiento o prevención de una enfermedad neurodegenerativa o inhibición o reducción de la fosforilación de proteína tau o inhibición de la actividad de GSK3 β , quiere decir la administración o adición de una cantidad de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bien en una única dosis o como parte de una serie de dosis, que es eficaz potenciando la actividad de PP2A y especialmente que es eficaz para la prevención de la aparición de un síntoma,
15 mantener bajo control dichos síntomas y/o tratar síntomas existentes, asociados con la enfermedad neurodegenerativa. La cantidad eficaz variará dependiendo de la salud y la condición física del individuo que se desea tratar, el grupo taxonómico del individuo que se desea tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad entre dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos rutinarios. En realizaciones específicas, una
20 cantidad eficaz es una cantidad nutricional o sobrenutricional.

El término "tauopatía", tal como se usa en el presente documento se refiere a un trastorno o enfermedad neurodegenerativa que implica la deposición de isoformas de proteína tau anormal en neuronas y neuroglíocitos en el cerebro. Las tauopatías incluyen enfermedades y trastornos en los que las proteínas tau están fosforiladas
25 anormalmente, incluida la proteína tau que esté hiperfosforilada. Las tauopatías incluyen, pero no están limitadas a, demencia presenil, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, parkinsonismo ligado a cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis subnuclear progresiva, enfermedad de Pick, afasia progresiva primaria, demencia frontotemporal y demencia corticobasal.

30 *2. Métodos de tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas*

La presente invención está basada en parte en la determinación de que el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es eficaz en la potenciación de la actividad de PP2A que a su vez puede dar como resultado una reducción de la fosforilación de la proteína tau por GSK3 β y/o un aumento de la tasa de desfosforilación de la
35 proteína tau. Los métodos descritos en el presente documento comprenden, en general, exponer el PP2A presente en neuronas o neuroglíocitos a una cantidad de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que potencia la actividad de PP2A. De forma adecuada, la cantidad de selenato que potencia la actividad de PP2A es una cantidad nutricional o sobrenutricional de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la cantidad de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la
40 invención, especialmente selenato o una sal del mismo, es de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, generalmente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 14 mg/kg, de 0,07 mg/kg a 6,5 mg/kg o de 0,15 mg/kg a 5 mg/kg por día, por ejemplo, de 0,07 mg/kg a 2 mg/kg por día.

El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención puede usarse eficazmente para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen trastornos del movimiento neurodegenerativos y enfermedades neurodegenerativas asociadas con pérdida de memoria e incluyen tauopatías y α -sinucleopatías. Ejemplos ilustrativos de enfermedades neurodegenerativas incluyen demencia presenil, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, parkinsonismo ligado a cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis subnuclear progresiva (PSP), enfermedad de Pick, afasia progresiva primaria, demencia frontotemporal, demencia corticobasal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson con demencia, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, atrofia del sistema múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y síndrome de Hallervorden-Spatz. En realizaciones preferentes, la invención es adecuada para tratar o prevenir tauopatías, especialmente enfermedad de Alzheimer y demencia. En otras realizaciones, la invención es adecuada para tratar o prevenir una α -sinucleopatía, especialmente enfermedad de Parkinson. De forma adecuada, la cantidad eficaz de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es una cantidad nutricional o sobrenutricional de selenato. En algunas realizaciones, la cantidad de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, generalmente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 14 mg/kg, de 0,07 mg/kg a 6,5 mg/kg o de 0,15 mg/kg a 5 mg/kg por día, por ejemplo, de 0,07 mg/kg a 2 mg/kg por día. En algunas realizaciones, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es selenato de sodio
60 (Na₂SeO₄).

En algunas realizaciones, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a un sujeto en combinación con otra terapia para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa. Ejemplos ilustrativos de terapias para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa que pueden usarse en
65 combinación con selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo incluyen, pero no están limitados a,

inhibidores de colinesterasa tales como tacrina (Cognex®), donepezilo, galantamina y rivastigmina; antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) tales como memantina; terapias de estrógeno tales como premarina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) tales como aspirina e ibuprofeno, levodopa (L-Dopa), inhibidores de dopa descarboxilasa tales como carbidopa y benserazida, o combinaciones de L-Dopa y un inhibidor de dopa
 5 descarboxilasa, tal como Sinemet® y Stalevo®, agonistas de dopamina tales como bromocriptina (Parlodel®), pergolida (Permax®), pramipexol (Mirapex®), ropinirol (Requip®), cabergolina, apomorfina (APOKYN™) y lisurida, inhibidores de mono-amina oxidasa B tales como selegilina (Eldepryl® y Carbex®) y rasagilina (Azilect®),
 10 anticolinérgicos tales como mesilato de benztropina (Cogentin®) y clorhidrato de trihexifenidilo (Artane®) e inhibidores de COMT tales como entacapona (Commtan®) y tolcapona (Tasmar®), u otros medicamentos tales como tartrato de rivastigmina (Exelon®) y amantadina (Symmetrel®); o mezclas de dos o más de levodopa, inhibidores de dopa descarboxilasa, agonistas de dopamina, inhibidores de mono-amina oxidasa B, anticolinérgicos o inhibidores de COMT.

Las terapias de combinación podrían incluir cantidades eficaces de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un agente usado para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa en una cantidad usada normalmente en ausencia de selenato. Por ejemplo, puede administrarse clorhidrato de tacrina como parte de una combinación con selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a pacientes con una enfermedad neurodegenerativa tal como AD en una cantidad de 40 mg/día a 160 mg/día o puede administrarse donepezilo en una cantidad de 5-10 mg/día. Puede administrarse premarina a una dosis para lograr 1,25 mg/día de estrógenos de equino conjugados (CEE) en pacientes con demencia. Alternativamente, la cantidad de agente para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos puede reducirse mediante la administración conjunta con selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la combinación puede mostrar un efecto sinérgico.

Los métodos para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas en un sujeto pueden comprender generalmente administrar a un sujeto una cantidad eficaz de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Para poner en práctica estos métodos, la persona que gestiona al sujeto puede determinar la forma de dosificación eficaz de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para una afección y circunstancias del sujeto particulares. Una cantidad eficaz de selenato es una que sea eficaz para el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, incluida la prevención de la aparición de síntomas, el mantenimiento de un síntoma bajo control y el tratamiento de un síntoma. La cantidad eficaz puede ser una cantidad nutricional o puede ser una cantidad sobrenutricional. En realizaciones específicas, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es selenato de sodio.

Los modos de administración, cantidades de selenato administradas y formulaciones de selenato, para su uso en la presente invención, se discuten más adelante. La enfermedad neurodegenerativa que se desea tratar puede determinarse midiendo uno o varios parámetros diagnósticos indicativos del transcurso de la enfermedad, comparados con un control adecuado. En el caso de un sujeto humano, un "control adecuado" puede ser el individuo antes del tratamiento, o puede ser un ser humano (por ejemplo, un control de edad coincidente o similar) tratado con un placebo. Según la presente invención, el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas incluye y abarca, sin limitación: (i) prevenir una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que al todavía no se ha diagnosticado que tiene la enfermedad y, en consecuencia, el tratamiento consiste en un tratamiento profiláctico para la enfermedad neurodegenerativa, (ii) inhibir una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, deteniendo el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa; o (iii) aliviar síntomas resultantes de la enfermedad neurodegenerativa.

Los productos y las composiciones de la presente invención son para usar en el tratamiento de un individuo al que se le ha diagnosticado una enfermedad neurodegenerativa, que es sospechoso de tener una enfermedad neurodegenerativa, o que se sabe que es susceptible y que se considera probable que desarrolle una enfermedad neurodegenerativa.

En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa es una tauopatía, especialmente enfermedad de Alzheimer o demencia y el tratamiento comprende además, opcionalmente, la administración de otro agente adecuado para su uso en el tratamiento de una tauopatía tal como se ha descrito anteriormente.

En otras realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa es una α -sinucleopatía, especialmente enfermedad de Parkinson y el tratamiento comprende además, opcionalmente, la administración de otro agente adecuado para su uso en el tratamiento de una α -sinucleopatía tal como se ha descrito anteriormente.

En realizaciones preferentes, el selenato es selenato de sodio.

Sujetos ejemplares para el tratamiento con los productos y composiciones de la invención son vertebrados, especialmente mamíferos. En algunas realizaciones, el sujeto se selecciona del grupo que consiste en seres humanos, ovejas, ganado vacuno, caballos, bovinos, cerdos, perros y gatos. Un sujeto preferente es un ser humano.

El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede formularse siguiendo cualquier serie de

técnicas conocidas en la técnica de la administración de fármacos. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse, por supuesto, mediante una serie de medios, teniendo en mente que no todas las formulaciones son adecuadas para todas las vías de administración. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse en forma sólida o líquida. La administración puede ser oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual) o mediante inhalación. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse junto con coadyuvantes, vehículos y/o diluyentes convencionales farmacéuticamente aceptables.

Las formas sólidas de administración comprenden comprimidos, cápsulas, polvos, píldoras, pastillas, supositorios y formas granulares para administración. También pueden incluir vehículos o aditivos, tales como sabores, colorantes, diluyentes, ablandadores, aglutinantes, conservantes, retardantes y/o materiales encapsulantes. Las formas líquidas para administración incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. También pueden proporcionarse junto con los aditivos mencionados anteriormente.

Las soluciones y suspensiones de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, asumiendo una viscosidad adecuada para facilitar su uso, pueden usarse en inyección. Las suspensiones demasiado viscosas para inyección pueden ser para su implantación usando dispositivos diseñados para dichos fines, si es necesario. Las formas de liberación sostenida se administran generalmente parenteralmente o con medios entéricos. La administración parenteral es otra vía de administración del selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se usa para poner en práctica la invención. "Parenteral" incluye formulaciones adecuadas para inyección y para administración nasal, vaginal, rectal y bucal.

El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede usarse para una formulación oral de dosis prolongada. Las formulaciones de dosis oral se administran preferentemente de una vez al día a tres veces al día en forma de una cápsula o comprimido de liberación mantenida, o alternativamente como una solución de base acuosa. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse intravenosamente bien diariamente, en continuo, una vez a la semana o tres veces a la semana.

El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse diariamente, preferentemente una vez al día en forma de una cápsula o comprimido de liberación mantenida, o una vez al día como solución acuosa.

Las combinaciones de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un agente que sea adecuado para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa pueden administrarse en forma sólida o líquida en una formulación o composición única o en formulaciones o composiciones separadas. En algunas realizaciones, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa se administran oralmente como un único comprimido o cápsula o comprimidos o cápsulas separadas. En otras realizaciones, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa se administran intravenosamente en una única composición o en composiciones separadas.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, que comprenden una cantidad nutricional o sobrenutricional de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones contienen de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1,0 g, por ejemplo de 5 mg a 450 mg, de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el selenato o su sal farmacéuticamente aceptable está en una cantidad de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 700 mg o de 5 mg a 450 mg. En ejemplos ilustrativos, el selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está en una cantidad de aproximadamente 1,6 mg a 450 mg, 5 mg a 450 mg, 7,5 mg a 250 mg, especialmente 50 mg a 200 mg, por ejemplo de 50 mg a 100 mg o de 100 mg a 150 mg para una dosis diaria única o dividida. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas son para su uso en el tratamiento o la prevención de una tauopatía, especialmente enfermedad de Alzheimer o demencia. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas son para su uso en el tratamiento o la prevención de una α -sinucleopatía, especialmente enfermedad de Parkinson.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden comprender otro agente para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad degenerativa. Por ejemplo, la composición puede contener selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de colinesterasa tal como tacrina, donepezilo, galantamina rivastigmina, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) tal como memantina, un agente estrogénico tal como premarina o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) tal como aspirina o ibuprofeno, levodopa, un inhibidor de dopa descarboxilasa, combinaciones de levodopa y un inhibidor de dopa descarboxilasa y/o un inhibidor de COMT, un agonista de dopamina, un inhibidor de monoamina oxidasa B, un anticolinérgico, un inhibidor de COMT u otra medicación tal como tartrato de rivastigmina o amantadina.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir cualesquiera componentes adicionales que

sean no inmunogénicos y biocompatibles con selenato, así como capaces de bioabsorción, biodegradación, eliminación como una molécula intacta. La formulación puede suministrarse en una forma lista para su uso o puede suministrarse en forma de polvos estériles o líquido que requieren la adición de vehículo antes de su administración. Si se desea esterilidad, la formulación puede fabricarse en condiciones estériles, los componentes individuales de la mezcla pueden ser estériles o la formulación puede filtrarse de forma estéril antes de su uso. Dicha solución puede contener también vehículos apropiados farmacéuticamente aceptables tales como, pero sin estar limitados a, tampones, sales, excipientes, conservantes, etc.

En algunas realizaciones, las formulaciones orales de liberación mantenida de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo son para su administración en el uso de la invención. Estas formulaciones comprenden generalmente selenato o un sal farmacéuticamente aceptable del mismo que tiene solubilidad reducida con el fin de retrasar la absorción en el torrente sanguíneo. Además, estas formulaciones pueden incluir otros componentes, agentes, vehículos, etc, que también sirven para retrasar la absorción del selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. También puede usarse microencapsulación, sistemas de atrapamiento polimérico y bombas osmóticas, que pueden ser o no bioerodibles, para retardar o controlar la difusión del selenato o un sal farmacéuticamente aceptable del mismo desde una cápsula o matriz.

El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede usarse solo o como parte de otro agente. En consecuencia, la presente invención también contempla un agente que comprende selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse y ponerse en práctica de forma más clara, se describirán ahora realizaciones particularmente preferentes con respecto a los siguientes ejemplos no limitados.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A: es una representación comparativa de los niveles de Akt fosforilado siguiendo un tratamiento con células intactas y en un ambiente exento de células para células PC3.

Figura 1B: es una representación gráfica que compara el efecto de selenato de sodio y estaurosporina, un potente inhibidor, pero no específico, de la proteína quinasa, sobre la actividad enzimática de Akt1 recombinante humano usando el kit de actividad de Akt Calbiochem K-LISA™.

Figura 2A: es una representación comparativa de la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ en presencia de selenato de sodio o ácido okadaico, una toxina de poliéter de algas de marea roja que inhibe fosfoproteína fosfatasa PP1 y PP2A.

Figura 2B: es una representación comparativa de la fosforilación de Akt en Ser⁴⁷³ en presencia de selenato de sodio o una serie de inhibidores de fosfoproteína fosfatasa, tautamicina, ácido okadaico, endotal A, caliculina A y ciclosporina A.

Figura 2C: proporciona representaciones de inmunoprecipitación de Akt a partir de células PC3 que muestra la cantidad de Akt complejo con PP2A en ausencia (control) y en presencia de selenato (ATE) o suero de carnero fetal (FCS).

Figura 2D: es una representación gráfica de la actividad de fosfatasa de PP2A en células PC3 en presencia o ausencia de selenato de sodio.

Figura 3: es una representación esquemática de la regulación postraduccional de la actividad de fosfatasa de PP2A y especificidad de sustrato (LCMT - leucina carboximetiltransferasa, PME-1 - fosfatasa metilesterasa 1, PTPA - activador de fosfolirosil fosfatasa).

Figura 4A(i): es una representación gráfica de la actividad de fosfatasa de PP2A relativa en ausencia (control) de, o en presencia de, selenato de sodio o ácido okadaico (OKA).

Figure 4A(ii): es una representación gráfica que muestra los efectos del selenato de sodio sobre la concentración de fosfato inorgánico liberado de un fosfopéptido de serina mediante la acción de fosfatasa de PP2A.

Figura 4B: es una representación gráfica que muestra los efectos de selenato de sodio sobre la actividad de fosfatasa de PP1.

Figura 5A: es una representación esquemática de la inactivación de PP2A en un ambiente oxidante.

Figura 5B: es una representación que muestra los efectos de selenato de sodio y peróxido de hidrógeno sobre el nivel de fosforilación de Akt.

Figura 5C: es una representación gráfica de los grupos sulfhidrilo libres presentes en la fosfatasa PP2A en presencia de N-etilmeleimida (NEM), peróxido de hidrógeno, selenato de sodio y selenato de sodio junto con peróxido de hidrógeno.

5 Figura 5D: es una representación gráfica del histograma de distribución de fluorescencia para células tratadas con selenato de sodio o N-acetil cisteína (NAC) con o sin peróxido de hidrógeno.

Figura 5E: representa gráficamente el porcentaje medio de células fluorescentes después de tratamiento con peróxido de hidrógeno, selenato de sodio, peróxido de hidrógeno y selenato de sodio, NAC, y peróxido de hidrógeno y NAC.
10

Figura 6A: representa gráficamente la actividad de fosfatasa de PP2A inmunoprecipitada con selenato de sodio (ATE 500 μ M) e endotal A (ETA 100 μ M) o sin un aditivo (control).

15 Figura 6B: es una representación comparativa de niveles de p70S6K fosforilada siguiendo un tratamiento con LY294003 (LY 50 μ M) o selenato de sodio (ATE 500 μ M), con o sin pretratamiento con ácido okadaico (OKA 500 nM).

Figura 6C: es una representación comparativa del análisis de diferentes subunidades de la familia B (B y B') de PP2A con anticuerpos que reconocen Akt. Akt coprecipita solo con la subunidad de la familia B de PP2A.
20

Figura 7: es una representación que muestra los efectos de selenato de sodio sobre la activación de GSK3 β .

Figura 8: es una representación comparativa que muestra que la selenometionina no afectó al nivel de fosforilación de Akt mientras que el selenato inhibió la fosforilación de Akt.
25

Figura 9: es una representación gráfica que muestra los efectos de distintos compuestos de selenio sobre la activación de Akt. Tratamientos: control (con); selenato de sodio (ATE); ácido selenoso (Sel acid); selenito de sodio (ITE); dióxido de selenio (SeO₂); sulfito de selenio (SeS₂); metil seleniocisteína (MSC); y seleniocisteína (SeC). La intensidad de la señal de Akt activa relativa correlacionada con los niveles de proteína Akt totales se representa en el eje y. El gráfico indica que solo el selenato de sodio (ATE) inhibe la activación de Akt, reduciendo niveles de Akt fosforilado por debajo de niveles del control (con). Por el contrario, el ácido selenoso (Sel acid), selenito de sodio (ITE), dióxido de selenio (SeO₂), sulfuro de selenio (SeS₂), metil seleniocisteína (MSC), seleniocisteína (SeC) inducen todos la activación de Akt por encima de niveles del control (con).
30
35

Figura 10A y 10B: representan gráficamente el efecto de selenato de sodio (ATE), selenito de sodio (ITE) y selenometionina (SeMet) sobre la actividad de fosfatasa de PP2A en el ensayo de hidrólisis de pNPP usando pNPP (figura 10A) o un fosfopéptido de serina (figura 10B) como sustrato.

40 Figura 11: es una representación comparativa de inmunotransferencia de la línea celular BE2M17 de neuroblastoma humano con anticuerpos PHF-tau antihumanos en presencia (+) o ausencia (-) de selenato de sodio en diversas condiciones de recubrimiento.

Figura 12: es una representación comparativa de inmunotransferencia de la línea celular SY5Y de neuroblastoma humano con anticuerpos PHF-tau antihumanos, AT270 (figura 12A) y HT-7 (figura 12B) en presencia (+) o ausencia (-) de selenato de sodio en diversas condiciones de recubrimiento.
45

Figura 13: es una representación comparativa de inmunotransferencia de lisados de cerebro totales de ratones macho Balb/c Nu Nu de 14 semanas de edad con anticuerpos PHF-tau anti-humanos, AT100 (Figura 13A), AT180 (Figura 13B), AT270 (Figura 13C) y HT-7 (Figura 13D), en presencia (+) o ausencia (-) de selenato de sodio.
50

Figura 14: representa gráficamente los efectos del tratamiento con selenato de sodio sobre el comportamiento analizado en Campo Abierto (tigmotaxis) en el turno 1 (Figura 14A) y en el turno 2 (Figura 14B).

55 Figura 15: representa gráficamente los efectos del tratamiento con selenato de sodio sobre el aprendizaje y la memoria analizados en el ensayo de Morris Water Maze evaluado por latencia de escape (tiempo en segundos, Figura 15A) y ruta de nado (longitud en metros, Figura 15B).

Figura 16: representa gráficamente el efecto de selenato de sodio sobre la carga de Tau en el hipocampo (Figura 16A) y en la amígdala (Figura 16B) determinado por inmunohistoquímica de HT7 en ratones transgénicos TMHT hTAU441.
60

Figura 17: representa gráficamente el efecto de selenato de sodio sobre la carga de Tau en el hipocampo (Figura 17A) y en la amígdala (Figura 17B) determinado por inmunohistoquímica de AT180 en ratones transgénicos TMHT hTAU441.
65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 El selenato de sodio desfosforila Akt mediante un mecanismo indirecto

El selenato de sodio induce consecuentemente la desfosforilación de Akt en células de carcinoma de próstata intactas. Dicha desfosforilación puede ser el resultado de un efecto inhibitorio directo sobre la proteína Akt misma, o alternativamente, puede lograrse de forma similar indirectamente potenciando un regulador negativo o inhibiendo un regulador positivo de la fosforilación de Akt. Para distinguir entre un mecanismo directo y uno indirecto, se determinó el efecto de selenato de sodio sobre la fosforilación y la actividad de Akt en un ambiente exento de células. Se plaquearon células de carcinoma de próstata PC3 en placas de 100 mm y cuando se alcanzó el 70-80 % de confluencia se privaron de suero durante la noche. Para determinar el efecto de la fosforilación de Akt en células intactas, se trataron células PC3 con selenato de sodio 500 μ M en medio reciente exento de suero durante 1 hora. Las células se lisaron y el nivel de fosforilación de Akt en Ser473 se determinó mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo específico de activación, y se hizo la comparación con niveles de proteína Akt expresada. Para determinar el efecto de Akt purificada, se lisaron en RIPA (inhibidores de fosfatasa), un tampón de lisis celular astringente que minimiza el mantenimiento de complejos proteína-proteína, células PC3 plaqueadas de forma similar pero no tratadas. Se purificó Akt de cantidades iguales (40-500 μ g) de lisado celular completo (WCL) mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal pan-Akt, y después se incubaron con selenato de sodio 500 μ M durante 1 h en un bloque térmico a 37 °C. Después, la proteína inmunoprecipitada se resolvió y el nivel de actividad de Akt se determinó mediante análisis de inmunotransferencia tal como se ha descrito anteriormente. La figura 1A compara los niveles de Akt fosforilada siguiendo un tratamiento en células intactas y en un ambiente exento de células para células PC3. El tratamiento de células PC3 intactas con selenato de sodio 500 μ M durante 1 h dio como resultado una reducción profunda de la fosforilación de Akt.

Para confirmar estos hallazgos, se midió el efecto de selenato de sodio sobre la actividad enzimática de Akt1 humano recombinante usando el kit de actividad de Akt Calbiochem K-LISA™, y se comparó con el efecto de estaurosporina, un potente, pero no específico, inhibidor de proteína quinasa. Este ensayo basado en ELISA usa un sustrato peptídico biotinilado (GRPRTSSFAEG) que está fosforilado en la segunda serina por Akt. Se incubaron 250 ng de Akt1 recombinante humano con o sin selenato de sodio 500 μ M o estaurosporina 1 μ M con sustrato de Akt biotinilado en pocillos recubiertos con estreptavidina durante 30 min a 30 °C. El sustrato fosforilado unido se detectó después con un anticuerpo de detección de fosfoserina, seguido por el conjugado del anticuerpo de HRP, y desarrollo del color con sustrato TMB. La absorbancia se midió a 450 nm con referencia a 590 nm. Los resultados de tres experimentos independientes se resumieron como absorbancia media calculada ($A_{450}-A_{590}$ -blanco) \pm SEM, tal como se muestra en la figura 1B. En consecuencia con las observaciones descritas anteriormente, el selenato de sodio no tenía un efecto medible directo sobre la actividad de Akt recombinante humano. Por el contrario, el inhibidor no específico estaurosporina inhibió de forma potente la actividad de quinasa de Akt.

40 En resumen, estos datos indican que el selenato de sodio no tiene un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de Akt, lo que indica que la desfosforilación observada debe ser mediante un mecanismo indirecto.

Ejemplo 2

45 El selenato de sodio desfosforila Akt estimulando la actividad de fosfatasa de PP2A

Una reducción en la actividad de net Akt podría lograrse indirectamente bien evitando la fosforilación inicial de Akt o bien, alternativamente, aumentando la desfosforilación de Akt [Kohn *et. al.* 1996]. No obstante, dada una respuesta bifásica de fosforilación de Akt (un aumento transitorio inicial seguido de una profunda y mantenida disminución) inducida por selenato de sodio, parece improbable que el selenato de sodio actúe reduciendo simplemente la capacidad de una quinasa corriente arriba de Akt fosforilado. Se determinó, por lo tanto, el efecto de la inhibición de proteína fosfatasa sobre la capacidad de selenato de sodio para inducir la desfosforilación de Akt. Inicialmente se usó ácido okadaico, una toxina de poliéter de algas de marea roja (y agente causante de envenenamiento por marisco diarreico) que inhibe las fosfoproteínas fosfatasas PP1 y PP2A, dos fosfatasas implicadas en la regulación de la desfosforilación de Akt [Fernandez y col., 2002]. Se plaquearon 5×10^5 células de carcinoma de próstata PC3 por pocillo en una placa de 6 pocillos, permitiendo que se unieran durante 8 h, y después se privaron de suero durante la noche. Las células se trataron con o sin ácido okadaico 5 nM o 1000 nM durante 30 min en medios exentos de suero recientes, y después se añadió selenato de sodio a una concentración final 500 μ M durante 1 h. Las células lisadas se resolvieron por SDS-PAGE, después se analizaron para determinar la fosforilación de Akt en el residuo Ser473 mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce específicamente Akt cuando está fosforilado en este sitio, y la comparación se realizó con los niveles totales de proteína Akt expresada (Figura 2A). El tratamiento de las células PC3 deficientes en PTEN con selenato de sodio, tal como se esperaba, redujo marcadamente los niveles crónicamente altos de fosforilación de Akt observados en esta línea celular, y esta reducción no está afectada por la incubación previa con ácido okadaico 5 nM. Por el contrario, el pretratamiento con 1000 nM de ácido okadaico no solo potencia la fosforilación de Akt en controles sin selenato, sino que anula

completamente el efecto inhibitor del selenato de sodio.

Para refinar adicionalmente la fosfatasa implicada, se analizó un panel amplio de inhibidores de fosfoproteína fosfatasa (PPP), que difieren en sus especificidades para la inhibición de PPP, para determinar su capacidad de anulación del efecto inhibitor del selenato de sodio sobre la fosforilación de Akt. Este panel incluye tautamicina 500 nM (PP1), ácido okadaico 500 nM (dosis baja de PP2A>PP1), endotal A (PP2A) 100 μ M, caliculina A 2 nM (dosis baja de PP1>PP2A), caliculina A 10 nM (dosis alta inhibe PP1 y PP2A) y ciclosporina A 400 ng/ml (PP2B). Se plaquearon células de carcinoma de próstata PC3 esencialmente tal como se ha descrito anteriormente, y se trataron de forma similar con selenato de sodio 500 μ M durante 1 h con o sin pretratamiento con un inhibidor de PPP durante 30 min previamente. Nuevamente, se resolvieron células lisadas por SDS-PAGE, después se analizaron membranas para determinar la fosforilación de Akt en el residuo Ser⁴⁷³ mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce específicamente Akt cuando se encuentra fosforilado en este sitio, y se realizó la comparación con los niveles totales de proteína Akt expresada. Tal como se indica en la figura 2B, en células que no recibieron pretratamiento con un inhibidor PPP, o en células que se trataron con inhibidores de PPP que eran específicos de PP1 o PP2B, la exposición a selenato de sodio dio como resultado una disminución marcada en la fosforilación de Akt. Por el contrario, las células que se trataron bien con dosis bajas de ácido okadaico o bien endotal A, inhibidores específicos o relativamente específicos de PP2A, bloquearon completamente la desfosforilación de Akt inducida por selenato de sodio.

El selenato de sodio podría aumentar la desfosforilación de Akt mediada por PP2A bien aumentando la tasa de formación del complejo entre PP2A y Akt, bien aumentando la actividad de fosfatasa intrínseca de PP2A ya unido a PP2A, o bien ambas. Para ayudar a distinguir entre estos mecanismos se determinó primeramente si el tratamiento con selenato de sodio aumenta el nivel de formación de complejo entre PP2A y Akt. Se plaquearon 1×10^6 células de carcinoma de próstata PC3 en placas de 6 cm, se dejó que se unieran durante 8 h y después se privaron de suero durante la noche. Después, las células se trataron bien con selenato de sodio 500 μ M en medio exento de suero reciente, o FCS al 10 %, durante 1,5 h, y después se lisaron en tampón ELB. El Akt se inmunoprecipitó a partir de 400 μ g de cada lisado celular completo usando un anticuerpo monoclonal anti-Akt, y se capturaron con perlas de proteína A-sefarosa. Los lisados de control negativo (blanco) habían omitido el anticuerpo inmunoprecipitante. Siguiendo el lavado para reducir la unión no específica, las perlas se hirvieron durante 5 min en 3X tampón de carga de proteína SDS, se centrifugaron a velocidad alta y el sobrenadante se resolvió por SDS-PAGE. El nivel de unión de PP2A se determinó mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce específicamente la subunidad catalítica de la fosfatasa, y se realizó la comparación con la cantidad de Akt precipitada y la concentración de anticuerpo precipitante (IgG). Tal como se indica en la figura 2C, la inmunoprecipitación de Akt a partir de células PC3 no tratadas aumenta la cantidad de la subunidad catalítica de PP2A detectable anteriormente que se une de forma no específica a las perlas (blanco), indicando que incluso en el estado basal con niveles altos de fosforilación de Akt, al menos algunos Akt están acomplejados con PP2A. El tratamiento con selenato de sodio aumenta la asociación de la subunidad catalítica de PP2A con Akt, mientras que la estimulación con suero disminuye la formación de complejo por debajo de niveles basales. Para cuantificar este aumento en la formación de complejo, se digitalizaron inmunotransferencias representativas a partir de tres experimentos independientes, se sometieron a análisis densitométrico y se normalizaron con el control para cada experimento. Después se determinó la relación media de subunidad catalítica de PP2A con respecto a la proteína Akt inmunoprecipitada total \pm SEM. Tal como se indica en la figura 2C, se observó un aumento aproximado del 50 % en la unión de la subunidad catalítica de PP2A a la proteína Akt siguiendo al tratamiento con selenato de sodio.

Para determinar si los efectos de selenato de sodio sobre la desfosforilación de Akt podrían explicarse totalmente mediante un aumento simple en la asociación entre las dos proteínas, se midió el efecto de selenato de sodio sobre la actividad de fosfatasa asociada a Akt. Se plaquearon 2×10^6 células PC3 en placas de 10 cm, se dejó que se unieron durante 8 horas y después se privaron de suero durante la noche. Las células se trataron después con o sin selenato de sodio 500 μ M durante 1 h en medio reciente exento de suero, después se lisaron en un tampón de fosfato de baja concentración. Después se inmunoprecipitaron 500-600 μ g de proteína total con anticuerpo monoclonal anti-Akt (1:100) y 30 μ l de suspensión de proteína A, y después de lavar, se analizaron para determinar la contaminación de fosfato libre mediante incubación de 25 μ l de tampón de lavado final con verde de malaquita. Los inmunoprecipitados se analizaron para determinar la actividad de fosfatasa mediante incubación con péptido de fosfo-treonina sintético 500 μ M durante 10 min a 30 °C con agitación. Se detectó fosfato libre mediante la adición de solución de verde de malaquita y la absorbancia se leyó a 590 nm para cada muestra por duplicado. La media de la actividad de fosfatasa a partir de tres experimentos independientes \pm SEM se muestra en la figura 2D. El tratamiento de células PC3 con selenato de sodio más que dobló la actividad de fosfatasa asociada con proteína Akt inmunoprecipitada, significativamente superior al aumento simple en la unión a PP2A observada previamente.

En resumen, estos datos demuestran que el selenato de sodio induce la desfosforilación de Akt indirectamente a través de una fosfo-proteína fosfatasa, específicamente PP2A. Aunque el selenato de sodio aumenta la cantidad de PP2A que se une a Akt, el aumento relativo en la actividad de fosfatasa asociada es casi dos veces esa, lo que indica que el selenato de sodio puede afectar principalmente a la actividad enzimática.

65 Ejemplo 3

El selenato de sodio refuerza directamente la actividad de fosfatasa de dímero de núcleo de PP2A

La estructura de núcleo de PP2A consiste en una subunidad catalítica de 36kDa (PP2Ac) y una subunidad reguladora de 65kDa (PR65 o subunidad A). La unión con una tercera subunidad reguladora B regula la especificidad de sustrato [Wera y Hemmings, 1995]. La actividad de fosfatasa de PP2A puede regularse mediante modificación postraduccional, representada esquemáticamente en la figura 3. Se ha demostrado que PP2Ac se fosforila *in vitro* mediante tirosina quinasas de receptor y no de receptor tales como EGFR, el receptor de insulina, p60v-src y p561ck [Chen y col., 1992]. Esta fosforilación tiene lugar específicamente en Tyr307, y está asociada con una pérdida superior al 90 % en la actividad de fosfatasa [Chen y col., 1992]. Esta fosforilación está identificada también *in vivo*, y está aumentada en fibroblastos estimulados con suero o EGF, o se transforma con p60v-src, mientras que disminuye mediante la privación de suero [Chen y col., 1994]. La fosforilación del Thr304 adyacente también se ha asociado con una pérdida significativa de actividad de fosfatasa [Guo y Damuni, 1993]. En contraste con Tyr307, parece que Thr304 está fosforilada por una proteína quinasa activada por autofosforilación, amplificando de este modo la señal inhibitoria inicial. En ambos casos, PP2A actúa como su propia fosfatasa, como la inhibición farmacológica con ácido okadaico o microcistina-LR aumenta la fosforilación [Chen y col., 1994, Guo y Damuni, 1993]. De este modo, siguiendo la eliminación del estímulo inhibitorio, la PP2A hidroliza ambos grupos fosfato para regenerar rápidamente la fosfatasa activa. La PP2Ac está también sujeta a regulación mediante metilación reversible de un residuo de lisina carboxi terminal, L309. La reacción de metilación se cataliza mediante una leucina carboxil metiltransferasa [Xie y Clarke, 1994], y parece necesaria para la asociación correcta de subunidades para formar un trímero activo [Wu y col., 2000, Tulstylch y col., 2000, Bryant y col., 1999]. La PP2Ac se desmetila mediante fosfatasa metilesterasa 1 (PME-1) [Lee y col., 1996]. De forma interesante, se ha informado también que PME-1 se une a, y estabiliza potencialmente, dímeros y trímeros de PP2a en una conformación inactiva, una situación revertida por el activador de fosfotirosil fosfatasa (PTPA), una proteína identificada originalmente que estimula la actividad de tirosil fosfatasa de PP2A [Cayla y col., 1994, Langin y col., 2004, Van Hoof y col., 2005].

Para determinar si el refuerzo de la actividad de fosfatasa de PP2A observada con selenato de sodio era independiente de un efecto de componentes corriente arriba implicados en la regulación postraduccional, se determinó la actividad enzimática de heterodímero PP2A A-C humano purificado a partir de glóbulos rojos incubados en presencia o ausencia de selenato de sodio. En ensayos iniciales, se usó un sustrato químico de acción enzimática de fosfatasa, para-nitrofenilfosfato (pNPP), que siguiendo la hidrólisis del resto fosfato genera para-nitrofenol, un cromógeno intensamente amarillo que es soluble en condiciones alcalinas. Se incubaron 0,05 U de dímero PP2A humano purificado en presencia de selenato de sodio 5 mM o ácido okadaico 500 nM durante un total de 30 min a 37 °C, y se midió la cantidad de para-nitrofenol generado, como lectura de la actividad de fosfatasa, comparado con muestras control no tratadas. La absorbancia de cada muestra se midió por duplicado a 405 nm con 590 nm como referencia. La actividad de PP2A se calculó usando la ecuación siguiente:

$$\text{actividad} = (\text{volumen de muestra en litros}) \times A_{405}/1,78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\text{coeficiente de extinción}) \times 0,25 \text{ cm} \times 15 \text{ minutos} \times 0,05 \text{ U de enzima}$$

Los datos se presentan como media de la actividad de fosfatasa relativa \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Tal como se indica en la figura 4A(i), incluso con dicha concentración baja de enzima purificada, la actividad de fosfatasa fue fácilmente aparente, y esta se abolió completamente mediante incubación con ácido okadaico. Por el contrario, la incubación de PP2A con selenato de sodio triplicó aproximadamente la actividad de fosfatasa observada.

Se determinó seguidamente si este refuerzo en la actividad de fosfatasa era específica de sustrato midiendo el efecto de selenato de sodio sobre la liberación mediante el dímero PP2A A-C de fosfato inorgánico a partir de un péptido de 6 aminoácidos, fosforilado en un residuo de treonina interno. Se incubaron 0,01-0,05 U de PP2A con 500 μ M de fosfopéptido durante 15 min a 37 °C, con o sin selenato de sodio 50 μ M. La cantidad de fosfato inorgánico liberado por la actividad enzimática se determinó mediante la adición de verde de malaquita y se leyó la absorbancia a 590 nm. El verde de malaquita forma un complejo verde estable en presencia de molibdato y ortofosfato, permitiendo la medición de la concentración de fosfato inorgánico presente. Los datos se presentan como media de la absorbancia de al menos tres experimentos independientes \pm SEM. Tal como se indica en la figura 4A(ii), el selenato de sodio de nuevo fue más del doble de la concentración de fosfato inorgánico liberado del fosfopéptido de serina mediante la acción de fosfatasa de PP2A.

La subunidad catalítica de PP1 comparte aproximadamente el 50 % de homología de secuencia con la subunidad catalítica de PP2A, la más alta de cualquiera de las fosfatasas relacionadas [Barton *et al.*, 1994]. Para determinar si el refuerzo en la actividad de fosfatasa estimulada por selenato de sodio era específico de PP2A, se determinó su efecto sobre la actividad de PP1. Se incubaron 0,05 U de PP1 de conejo purificada a partir de músculo esquelético con péptido sintético de fosfo-treonina 500 μ M durante 15 min a 37 °C, con o sin selenato de sodio 50 μ M, y la concentración de fosfato libre se determinó usando verde de malaquita tal como se ha descrito anteriormente. Los datos se presentan como media de la absorbancia a 590 nm de al menos tres experimentos independientes \pm SEM. Tal como se indica en la figura 4B, el selenato de sodio no afectó a la actividad de fosfatasa de PP1.

Ejemplo 4El selenato de sodio no afecta a la regulación rédox de PP2A

5 Una cantidad de trabajos creciente sugiere que la oxidación reversible es un mecanismo común mediante el que están regulada negativamente proteína fosfatasas [Wang y col., 1996, Barrett y col., 1999, Sohn y Rudolph 2003]. Un residuo de cisteína conservado en el dominio catalítico es crítico a su actividad enzimática, pero en un microambiente oxidante este puede modificarse mediante la formación de bien disulfuro molecular o bien enlaces sulfenil-amida (figura 5A), con la pérdida de actividad de fosfatasa [Salmeen y col., 2003, Kwon y col., 2004]. Dado que el compuesto de selenio puede afectar el estado rédox celular, se investigó la posibilidad de que el selenato de sodio estimulara la PP2A aliviando los efectos inhibidores de oxidación.

15 Inicialmente se determinó si la desfosforilación de Akt inducida por selenato de sodio era sensible al estado rédox celular. Se plaquearon 5×10^5 células de carcinoma de próstata PC3 por pocillo en una placa de 6 pocillos, permitiendo que se unieran durante 8 h, y después se privaron de suero durante la noche. Las células se trataron con o sin selenato de sodio $500 \mu\text{M}$ en medio reciente, y después se expusieron a peróxido de hidrógeno $0,25 \text{ mM}$ o 1 mM durante 10 min. Se resolvieron cantidades iguales de lisados celulares completos y después se sometieron a análisis de inmunotransferencia para determinar el nivel de Akt fosforilada en Ser⁴⁷³. La comparación se realizó después con el nivel total de proteína Akt expresada. Tal como se indica en la figura 5B, el tratamiento de células con selenato de sodio redujo marcadamente el nivel de fosforilación de Akt, y este no se ve afectado por la adición intensa de una concentración $0,25 \text{ mM}$ de peróxido de hidrógeno. Por el contrario, la exposición intensa a una dosis alta de peróxido de hidrógeno 1 mM abolió completamente el efecto desfosforilante de selenato de sodio, indicando que este bloque es sensible a rédox.

25 La oxidación reversible inactivadora de proteína fosfatasas implica la modificación de un residuo de cisteína crítico dentro del dominio catalítico, conduciendo, por último, a la formación de bien disulfuro intramolecular o bien enlaces sulfenil-amida. Para determinar si el selenato de sodio tenía algún efecto modificante sobre residuos de cisteína de PP2A, se cuantificó el número de grupos sulfhidrilo libre en dímero PP2A A-C humano purificado siguiendo varios tratamientos usando el ensayo de Ellman [Ellman, 1958]. El reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico), DTNB) forma rápidamente un enlace disulfuro con grupos sulfhidrilo libre con la liberación de iones tiolato cromogénicos. Se incubaron $0,01 \text{ U}$ de PP2A con N-etilmaleimida (NEM) 10 mM o peróxido de hidrógeno 10 mM o selenato de sodio 10 mM , o selenato de sodio 10 mM y peróxido de hidrógeno 10 mM durante 15 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Después se determinó la cantidad de grupos sulfhidrilo libres presentes dentro de la fosfatasa mediante la adición de reactivo de Ellman y se realizó subsiguientemente la medición de la absorbancia a 412 nm (figura 5C). La incubación con NEM, un agente alquilante de sulfhidrilo, y peróxido de hidrógeno redujo significativamente el número de grupos sulfhidrilo libre presentes. Por el contrario, la incubación con selenato de sodio no tiene efecto, y en particular, no protege PP2A de la modificación mediada con peróxido de hidrógeno de grupos sulfhidrilo. De hecho, la modificación de grupos sulfhidrilo por peróxido de hidrógeno fue significativamente más eficaz en presencia de selenato de sodio.

45 Después, se determinó si el selenato de sodio afectó al potencial rédox de células intactas usando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA). El DCFDA es no fluorescente y permeable a células libremente, pero en presencia de especies de oxígeno reactivo (ROS) se convierte rápidamente en la célula en 2',7'-diclorofluoresceína impermeable pero altamente fluorescente (DCF) [Bass y col., 1983]. Se plaquaron 1×10^6 células de carcinoma de próstata PC3 en placas de 60 mm, se dejó que se unieran durante 8 h y después se privaron de suero durante la noche. Las células se incubaron con DCFDA $5 \mu\text{M}$ durante 15 min antes del tratamiento.

50 Las células se trataron con bien con una concentración $500 \mu\text{M}$ de selenato de sodio o bien 1 mM de N-acetilcisteína (NAC) durante 1 h, y después se expusieron a una concentración $500 \mu\text{M}$ de peróxido de hidrógeno durante 10 min. La proporción de células fluorescentes se determinó después por citometría de flujo. La figura 5D muestra un histograma de distribución de fluorescencia representativa para cada grupo de tratamiento, y el porcentaje medio de células fluorescentes de tres experimentos independientes + SEM se resume en la figura 5E. La exposición de células PC3 a peróxido de hidrógeno conduce de forma predecible a un aumento marcado en la generación de radicales libres de oxígeno intracelular, indicado por un desplazamiento a la derecha en el histograma de distribución. El pretratamiento de las células con selenato de sodio no tuvo efecto sobre la proporción basal de células fluorescentes y no protegió las células de la generación de ROS después de la exposición a peróxido de hidrógeno. Por el contrario, el pretratamiento con el NAC donante de hidrógeno conduce a una reducción pequeña en la proporción basal de células fluorescentes, y en particular, la producción de ROS se atenúa significativamente por el peróxido de hidrógeno.

60 En resumen, estos datos indican que aunque la desfosforilación de Akt inducida por selenato de sodio es sensible al estado rédox celular, el selenato de sodio no refuerza la actividad de fosfatasa de PP2A aligerando de forma intrínseca pero reversible la oxidación inhibidora.

65 Ejemplo 5

La actividad de fosfatasa de PP2A estimulada por selenato de sodio demuestra especificidad de sustrato

5 La PP2A es una proteína expresada altamente y de forma ubicua que está estimulada para constituir entre el 0,1 y el 1 % de proteína celular total [Gallego M y Virshup 2005; Cohen, 1997] y se ha implicado en la regulación de un número incluso creciente de sustratos proteicos [Zhu y col., 2004; Woetmann y col., 2003; Silverstein y col., 2002]. El mecanismo que controla la especificidad de sustrato de PP2A no se entiende completamente, pero la unión diferencial de subunidades B reguladoras específicas parece ser importante [Van Kanegan y col., 2005]. Se determinó si la actividad de fosfatasa de PP2A aumentada estimulada por selenato de sodio era indiscriminado, o específico para un heterotrímero particular.

15 Se ha demostrado anteriormente que el selenato de sodio aumenta la actividad de fosfatasa asociada con Akt inmunoprecipitada de células de carcinoma de próstata PC3, y que el selenato de sodio estimula directamente la actividad de fosfatasa de dímero PP2A A-C purificado. Para determinar si este refuerzo de la actividad de fosfatasa está generalizado, se inmunoprecipitó PP2A a partir de células PC3 tratadas bien con selenato de sodio 500 μ M o endotal A 100 μ M durante 1 hora usando un anticuerpo monoclonal a la subunidad catalítica PP2A. Se retiró el fosfato libre haciendo pasar lisados celulares a través de columnas de desalación, y se midió la actividad de fosfatasa usando un péptido de fosfo-serina y verde de malaquita. La actividad de fosfatasa relativa de PP2A inmunoprecipitado en condiciones diferentes se muestra en la figura 6A como la absorbancia media de tres experimentos independientes + SEM. El tratamiento de células PC3 con selenato de sodio no tuvo ningún efecto sobre la actividad de fosfatasa del grupo general de PP2A intracelular. Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de fosfatasa específica de PP2A endotal A redujo significativamente la actividad de fosfatasa.

25 Se examinó el efecto del selenato de sodio sobre otro sustrato conocido de PP2A, p70S6K [Peterson y col., 1999]. Se plaquearon 5×10^5 células de carcinoma de próstata PC3 por pocillo en una placa de 6 pocillos, permitiendo que se unieran durante 8 h, y después se privaron de suero durante la noche. Después, se trataron las células con bien LY294003 50 μ M o bien selenato de sodio 500 μ M durante 1 hora, con o sin pretratamiento con ácido okadaico 500 nM durante 30 minutos previamente. Se resolvieron cantidades iguales de lisados celulares completos (75 μ g) por SDS-PAGE, y se determinó el nivel de fosforilación de p70S6K mediante análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína p70S6K cuando está fosforilada en Thr389. La comparación se realizó con el control de carga de proteína β tubulin. Tal como se indica en la figura 6B, incluso en condiciones basales, la fosforilación de p70S6K es fácilmente aparente, y esto está abolido por el tratamiento con el inhibidor de PI3K LY294002. Consecuente con su papel conocido como regulador negativo de la fosforilación de p70S6K, la inhibición de PP2A con ácido okadaico refuerza el nivel de fosforilación observado. No obstante, en contraste con la fosforilación de Akt inducida por selenato de sodio, la fosforilación de p70S6K no se ve afectada en condiciones similares.

40 El determinante primario de especificidad de sustrato parece residir en la subunidad B reguladora, que junto con las subunidades A y catalítica, comprende el complejo trimérico observado *in vivo*.

45 Se realizó un ensayo para determinar que familia de subunidades B formaron un complejo con Akt en células de carcinoma de próstata. Se plaquearon 2×10^6 células de carcinoma de próstata PC3 en placas de 100 mm, se dejó que se unieran durante 8 h y se privaron de suero durante la noche. Después se lisaron las células con ELB, un tampón detergente suave, y Akt total inmunoprecipitado de 500 μ g de lisado con un anticuerpo monoclonal pan-Akt (1:100) y 30 μ l de proteína A-sefarosa. Los controles negativo (blanco) habían omitido el anticuerpo inmunoprecipitante. Siguiendo lavados repetidos, las perlas se hirvieron en 3X tampón de carga de proteína SDS durante 5 minutos, se centrifugaron a velocidad alta y el sobrenadante resultante se resolvió por electroforesis en gel. Se dispusieron 100 μ g de lisado celular completo en el mismo gel para la comparación, y las membranas resultantes se analizaron con anticuerpos que reconocen específicamente miembros de las familias de subunidades B o B'. La retirada exitosa de Akt se confirmó analizando las mismas manchas con un anticuerpo que reconoce pan-Akt. Tal como se muestra en la figura 6C solo una subunidad reguladora de la familia B coprecipitada con Akt en este sistema, sugiriendo que un trímero de PP2Ac, A y miembro de la familia de subunidades B de R2 media la desfosforilación de Akt en estas células.

55 Ejemplo 6

60 Los efectos metabólicos de la insulina sobre la síntesis de glucógeno están mediadas por la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), un sustrato corriente abajo directo de Akt. GSK-3 es una serina/treonina quinasa expresada de forma ubicua que fosforila e inactiva glucógeno sintasa. En respuesta a la activación del receptor de insulina, Akt fosforila e inactiva el represor GSK-3, estimulando de este modo la síntesis de glucógeno [Cross y col., 1995]. Además, GSK-3 se ha implicado en el control de la traducción de proteínas, progresión del ciclo celular y señalización de Wnt [Diehl y col., 1998, Welsh y col., 1996, He y col., 1995]. Para determinar el efecto del tratamiento de selenato de sodio sobre la activación de GSK-3 β , se plaquearon células de carcinoma de próstata PC3, se privaron de suero durante la noche y después se trataron con selenato de sodio 500 μ M en medio reciente durante diversos periodos tal como se indica (figura 7). Se sometieron lisados celulares completos resueltos a

análisis de inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce específicamente GSK-3 β solo cuando está fosforilado en Ser9, un sitio crítico para su actividad de quinasa, y la comparación se realizó con la proteína del citoesqueleto β -tubulina como control de carga. Las células PC3 tienen altos niveles basales de activación de GSK-3 β , indicados por el grado alto de fosforilación observado en el carril control (0 h). El tratamiento con selenato de sodio condujo a una reducción marcada de la fosforilación, que fue máxima a 1 h y 3 h, y volvió a niveles basales en el punto temporal de 6 h. La cuantificación del grado de inhibición que induce el selenato de sodio, se prepararon inmunotransferencias digitalizadas en comparación con los efectos de selenato de sodio 500 μ M durante 3 h a LY294002 50 μ M durante 1 h y se determinó el grado de fosforilación de GSK-3 β como proporción de proteína expresada mediante densitometría. En promedio, el selenato de sodio redujo GSK-3 β en más del 20 %, mientras que LY294002 dio como resultado una reducción de casi el 60 % de niveles de fosforilación.

Ejemplo 7

El selenato de sodio, pero no la seleniometionina, inhibe potentemente la activación de proteína quinasa B

Para determinar si el selenato de sodio puede interferir con la actividad de la ruta de PI3K, se trataron células PC3 exentas de suero con selenato de sodio 500 μ M varias veces. El estado de fosforilación de Akt en lisados celulares completos se determinó usando anticuerpos específicos de activación. Debido a la pérdida de PTEN, incluso en ausencia de suero adicional, existe una activación robusta de Akt en los sitios Ser473 y Thre308. La adición de selenato de sodio indujo un refuerzo transitorio en la fosforilación de Akt en ambos sitios en un periodo de 10 minutos de exposición. Este refuerzo fue seguido después por una desactivación marcada y prolongada, mientras que los niveles de Akt celular totales (pan Akt) permanece esencialmente sin cambios.

El efecto de selenato de sodio sobre la activación de Akt en células PC3 se comparó con la de seleniometionina, tratando con una concentración de 500 μ M de cada compuesto durante varios puntos temporales y evaluando la fosforilación de Akt en Ser473. Tal como se indica en la figura 8, la seleniometionina no afectó el nivel de fosforilación de Akt en todos los periodos temporales medidos, mientras que el selenato de sodio inhibió profundamente la fosforilación de Akt.

Ejemplo 8

La capacidad para inducir la desfosforilación de Akt es única en selenato de sodio

Dado que el selenato de sodio induce consecuentemente la desfosforilación profunda de la quinasa Akt clave, mientras que la seleniometionina no tuvo ningún efecto, se determinó si esta capacidad era única en el selenato de sodio o era compartida por otras formas químicas de selenio. Se analizaron otras especies de selenio inorgánicas (selenito de sodio, dióxido de selenio, sulfuro de selenio y ácido selenioso) y orgánicas (metilseleniocisteína, seleniocistina) para determinar su capacidad de afectar la activación de Akt. Todas las formas se disolvieron en agua con la excepción de sulfuro de selenio que se solubilizó en DMSO, y se añadieron células PC3 privadas de suero a una concentración de 500 μ M durante 1 hora. Después, los lisados celulares completos se resolvieron, y el estado de activación de Akt se determinó mediante inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce específicamente Akt cuando está fosforilado en el sitio Ser473, así como el nivel total de expresión de Akt (pan Akt). Para cuantificar el grado de activación de Akt, se digitalizaron inmunotransferencias y la proporción de Akt fosforilada con respecto al Akt total se determinó por densitometría. La proporción media de niveles proteicos de Akt fosforilado con respecto al Akt total \pm SEM de tres experimentos independientes se resumen en la figura 9. El tratamiento de células PC3 con selenato de sodio 500 μ M durante 1 hora dio como resultado una reducción superior al 80 % de fosforilación de Akt en Ser473 en comparación con células no tratadas ($p < 0,05$, ensayo t de Student). Por el contrario, el tratamiento de células PC3 con otras formas inorgánicas y orgánicas de selenio administrado en condiciones idénticas no tuvo ningún efecto significativo sobre el grado de activación de Akt. En resumen, estos datos indican que la capacidad para inducir la desfosforilación de Akt es única en el selenato de sodio.

Ejemplo 9

La capacidad para potenciar la actividad de PP2A es única en el selenato de sodio

En el ejemplo 7 se presentan datos que demuestran que de todas las formas químicas de selenio analizadas, solo el selenato de sodio indujo significativamente la desfosforilación de Akt. Para determinar si un efecto diferencial sobre la actividad de PP2A podría explicar esta especificidad, el efecto de selenato de sodio (5mM o 50 μ M), selenito de sodio (5mM o 50 μ M) y seleniometionina (5mM o 50 μ M) sobre la actividad de fosfatasa de PP2A se comparó en un ensayo de hidrólisis de pNPP usando pNPP y un fosfopéptido de serina como sustrato respectivamente (figuras 10A y 10B). En contraste con el refuerzo claro en la actividad de fosfatasa observado con selenato de sodio, ni selenito de sodio ni seleniometionina afectaron significativamente la actividad de fosfatasa de PP2A.

Materiales y métodos para los ejemplos 1 a 9

REACTIVOS

Líneas celulares

5 Los detalles de la línea celular de mamífero usada en los procedimientos experimentales se dan en la tabla 1.

Tabla 1

Línea celular	Origen	Fuente	Referencia
Pc3	Derivada de metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de grado IV de un varón de raza blanca de 62 años de edad	ATCC	(Kaighn ME y col., 1979)

10 Todos los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora Forma Scientific Incubator con el 5 % o el 10 % de dióxido de carbono a 37 °C en RPMI 1641 con L-glutamina (Gibco Invitrogen N° 11875-119). Se añadieron a los medios como patrón penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y anfotericina B (25 ng/ml) (Gibco Invitrogen N° 15240-062). Como rutina, las células se mantuvieron en presencia de suero de bovino fetal al 5 % o 10 % (Gibco Invitrogen N° 10099-141) a menos que se indique lo contrario. Se pasaron células subconfluentes con tripina-EDTA al 0,5% (Gibco Invitrogen N° 15400-054).

15 ANTICUERPOS DISPONIBLES COMERCIALMENTE

20 Una serie de anticuerpos primarios comercialmente disponibles y secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) o etiquetados fluorescentemente o biotinilados se usaron en el trabajo experimental descrito; los detalles de los mismos se resumen a continuación:

Anticuerpo policlonal de conejo anti-Akt, N° de cat. 9272, Cell Signalling Technology (CST);

25 Monoclonal de ratón anti-Akt (5G3), N° de cat. 2966, CST;

Policlonal de conejo anti-fosfo Akt (ser473), N° de cat. 9271, CST;

Policlonal de conejo anti-fosfo GSKa (ser473), N° de cat. 9336, CST;

30 Distintos anticuerpos anti-PP2A, N° de cat. 05-421, 06-2221, 07-334 y 05-592, Upstate.

QUINASAS E INHIBIDORES DE QUINASA, INHIBIDORES DE FOSFATASA Y FOSFATASAS PURIFICADAS

Tabla 2: Inhibidores de quinasa y fosfatasa

	Nombre	Enzima inhibida	Fuente	N° de cat.	Diluyente	Conc. de producto	Conc. en funcionamiento
Inhibidor de quinasa	LY294002	PI2K	Promega	V1201	DMSO	50 mM	10-50 µM
Inhibidor de fosfatasa	tautomicina	PP1	Biomol	109946 -35-2	etanol	500 µM	500 µM
Inhibidor de fosfatasa	endotal	PP2A	Calbiochem	324760	H ₂ O	100 mM	100 µM
Inhibidor de fosfatasa	caliculina A	PP2A = PP1	Calbiochem	208821	DMSO	80 µM	10 nM
Inhibidor de fosfatasa	Ácido okadaico	PP2A = PP1	Calbiochem	495604	etanol	50 mM	500 nM
Inhibidor de fosfatasa	ciclosporina A	PP2B	Calbiochem	239835	DMSO	400 µg/ml	400 ng/ml

35 Tabla 3: Fosfatasas purificadas y quinasas recombinantes

	Nombre	Especie	Fuente	N ° de cat.	Conc. en funcionamiento
Fosfatasa purificada	PP2A	Humana	Upstate	14-111 (partida n° 28002)	0,01-0,05 U
Fosfatasa purificada	PP1	De conejo	Upstate	14-110 (partida n° 26200)	0,05 U
Quinasa recombinante	Akt1	Humana	Upstate	14-276 (partida n° 25089BU)	

ES 2 394 348 T3

TAMPONES, SOLUCIONES Y MEDIOS

Todas las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente (TA) a menos que se indique lo contrario.

EDTA 0,5 M	186,1 g de Na ₂ EDTA.2H ₂ O disuelto en 1 litro de H ₂ O destilada, pH ajustado a 8,0 con NaOH
Tampón de lisis de huevo (ELB)	NaCl 225 mM, Hepes 50 mM, pH 7,0, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, Triton-X100 al 10 %
NaCl 5 M	292,2 g NaCl disueltos en un litro de H ₂ O destilada, autoclavado
PBS	8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g de KH ₂ PO ₄ , relleno hasta 1 litro, pH a 7,4
Tampón de lisis RIPA	Glicerina al 10 %, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, Triton-X100 al 1 %, NP40 al 1 %, NaCl 137 mM, SDS al 0,1%. Recién preparado sobre hielo.
SDS al 20 %	200 g de SDS disueltos en 1 litro de H ₂ O destilada
Gel de procesamiento SDS-PAGE	Tris 0,375 M, pH 8,8, SDS al 0,1 %, APS, TEMED y acrilamida al 6-14,5 %
4x tampón de muestra SDS-PAGE	Glicerina al 15 %, 2-mercaptoetanol 0,6 M, SDS al 2 %, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 y bromofenol azul al 0,1 % p/v
Gel de apilado SDS-PAGE	Tris 0,125 M, pH 6,8, SDS al 0,1 %, acrilamida al 4,8 % (Biorad), persulfato de amonio (APS) y TEMED
Tampón de procesamiento SDS-PAGE	9 g de base Tris (25 mM) pH 8,3, 43,2 g de glicina (0,19 M) y 3 g de SDS (al 0,1 %) completado hasta 500 ml con H ₂ O destilada
TBS lox	80 g de NaCl, 2 g de KCl, 30 g de Tris pH 7,4 completado hasta 1 litro con H ₂ O destilada
TBS-T al 0,1 %	500 ml de TBS 10x, 5 ml de Tween-20 completado hasta 1 litro con H ₂ O destilada
Tris-HCl	121,1 g de Tris disueltos en 1 litro de H ₂ O destilada, pH ajustado a 6,0-8,8 con HCl concentrado, autoclavado
Tampón de transferencia Western	14,4 g de glicina, 3,03 g de Tris, 800 ml de H ₂ O destilada y 200 ml de metanol
Tampón de transferencia Western	3,03 g de base Tris, 14,4 g de glicina en 800 ml de H ₂ O destilada con 200 ml de metanol
Tampón de muestra Western 4X	1 ml de Tris 0,5 M, pH 6,8, 800 µl de glicerina, 800 µl de SDS al 20 %, 400 µl de β-mercaptoetanol, 400 µl de bromofenol azul al 1 %

5

COMPUESTOS DE SELENIO

El selenato de sodio se adquirió de Sigma. Todas las soluciones estaban recién preparadas en H₂O destilada y se usaron en sus concentraciones establecidas.

10

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

15

Siguiendo tratamientos específicos, se lavaron células en cultivo una vez en PBS y después se lisaron durante 15 min a 4 °C en bien tampón de lisis de huevo (ELB) o tampón de lisis de RIPA que contenía un cóctel inhibidor de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa Calbiochem serie 1 N° 539131) e inhibidores de fosfatasa (ortovanadato de sodio 10 mM y fluoruro de sodio 10 mM) usando un rascacélulas. Las muestras se aclararon por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se usó para análisis. La concentración de proteínas de la muestra se determinó mediante el ensayo en solución de ácido bicinonínico (BCA). Se diluyó 1 µl de lisado 1:25 con H₂O destilada en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µl de una solución 80:1 de ácido bicinonínico y sulfato de cobre al 4 % (p/v) a cada muestra y se incubó a 37 °C durante 30 min. La absorbancia se midió a 590 nm (Perkin Elmer MBA2000) frente a una serie de patrones proteicos.

25

Las muestras de proteínas se analizaron mediante electroforesis en gel usando geles de SDS-poliacrilamida, que

consisten en un gel de apilado y un gel de resolución. Se cargaron 50-100 µg de proteínas en geles SDS-PAGE de diversas concentraciones. Se añadió tampón de muestra SDS en igual volumen a las muestras y se hirvió a 100 °C durante 5 min antes de la carga. La electroforesis en gel se realizó en tampón de procesamiento a aproximadamente 100 V. Los pesos moleculares de proteínas de interés se evaluaron mediante marcadores de tamaño de proteínas (Biorad Kaleidoscope) cargados con cada gel.

Análisis de inmunotransferencia de Western

Siguiendo a la resolución las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon P, Millipore). La membrana se preparó mediante inmersión en metanol al 100 % durante 10 s, se enjuagó en agua destilada y se equilibró en tampón de transferencia Western. La transferencia tuvo lugar a 100 V a TA durante 1,5 h o durante la noche a 4 °C. La membrana se lavó durante 5 min en TBS-T y se dejó secar durante 1 h. Después, la membrana se bloqueó con leche desnatada al 3 % en TBS con Tween al 0,1 % durante 1 h a TA. La membrana se lavó tres veces durante 5 min con TBS-T y después se incubó con el anticuerpo primario diluido en leche desnatada al 3 %/TBS-T al 0,1 % o BSA al 3 %/TBS-T al 0,1 % durante 1-2 h a TA o durante la noche a 4 °C con agitación vigorosa. Siguiendo tres lavados de 5 minutos en TBS-T al 0,1 %, la membrana se incubó con peroxidasa de rábano picante conjugada con anticuerpos secuencias en tampón de bloqueo durante 1 h. La membrana se lavó de nuevo tres veces durante 5 minutos antes de detectar la unión a anticuerpos mediante quimioluminiscencia potenciada con sustrato de dirección extendida West Dura Super Signal® (Pierce N° 34075) o agentes de detección de inmunotransferencia Western ECL (Amersham Biosciences N° RPN2106). La luminiscencia se registró mediante autorradiografía usando película de exposición a CL (Kodak). Después del análisis, las manchas de inmunotransferencia se arrastraron con tampón de arrastre de membrana (TRIS 62,5 mM, pH 7, SDS al 2 %, β-mercaptoetanol al 7 %) durante 15 min a 60 °C, se lavó tres veces en TBS-T y se bloqueó de nuevo antes de un nuevo análisis.

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Las manchas relevantes de la inmunotransferencia se convirtieron en archivos .tif en Corel Photo-Paint Versión 8 (Corel Corporation) usando un escáner digital Vista (Umax). El análisis densitométrico se realizó en Image-Pro-Plus V4.5.1.22 para Windows (Media Cybernetics). Usando una calibración lineal en la que al blanco se asignó el valor 0 y al negro el valor 255, se seleccionó una región de interés correspondiente a la banda relevante y se determinó la intensidad de señal.

INMUNOPRECIPITACIÓN

Se incubaron 100-600 µg de lisado celular con diversos anticuerpo a un dilución 1:100 en microtubos de centrifugación en una rueda giratoria durante 1-2 h a Ta o 16 h a 4 °C tal como se ha indicado. Después de una centrifugación breve, se añadieron 30-40 µl de perlas Fast Flow de proteína A sefarosa al 50 % prelavadas (Sigma N° 9424) a cada tubo y se hicieron girar a 4 °C durante 1 h a TA o 4 °C. Después de una breve centrifugación, el sobrenadante se eliminó y la pella se lavó con 500 µl de tampón de lisis celular. Después de tres de dichos lavados, las perlas se usaron para ensayos enzimáticos o la proteína se eluyó hirviendo las perlas en 3x tampón de carga de proteína SDS durante 5 min y se resolvieron en geles SDS-PAGE.

ENSAYOS DE FOSFATASA

PP2Ac purificado humano y PP1 de conejo se diluyeron a 0,01 U/µl con el tampón de dilución proporcionado y se almacenaron en partes alícuotas a -20 °C.

ENSAYOS DE FOSFOPÉPTIDO CON FOSFATASAS PURIFICADAS

1 mg de fosfopéptidos sintéticos K-R-pT-I-R-R (Upstate N° 12-219) y R-R-A-pS-V-A (Upstate N° 12-220) se disolvió en 1,10-1,285 ml de H₂O destilada para preparar una solución 1 mM, después se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Se purificaron 0,01-0,05 U de dímero PP2A A-C purificado a partir de glóbulos rojos humanos, o 0,05 U de PP1 purificado a partir de músculo esquelético mezclados con 500 µM de fosforpéptido y se incubaron en presencia de varios tratamientos tal como se indica a 37 °C sobre un bloque de calentamiento durante 15 min. Cada reacción se completó hasta un volumen total de 25 µl con tampón pNPP (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, CaCl₂ 100 µM). La reacción enzimática se terminó añadiendo 100 µl de solución de verde de malaquita (verde de malaquita al 0,03 4% en molibdato de amonio 10 mM, HCl 1 N, etanol al 3,4 %, Tween-20 al 0,01 %). La malaquita verda forma un complejo verde estable en presencia de molibdato y ortofosfato, permitiendo la medición de la concentración de fosfato inorgánico presente. La absorbancia se leyó por duplicado para cada muestra a 590 nm.

INMUNOPRECIPITACIÓN DE PP2A Y ENSAYO DE FOSFATASA

Se plaquearon 1x10⁶ células PC3 en placas de 60 mm, se dejó que se unieron durante 8 horas y después se privaron de suero durante la noche. Siguiendo diversos tratamientos tal como se indica, los medios se aspiraron y las células se lavaron una vez con TBS. Las células se lisaron en 0,3 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0,

Igepal-CA al 1 %, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, 1x cóctel inhibidor de proteasa completo) y se eliminaron los fosfatos haciendo pasar el lisado a través de una columna de giro de desalación Zeba (Pierce N° 89890). La concentración de proteína del lisado desalado se determinó mediante ensayo BCA tal como se ha descrito previamente. Se inmunoprecipitaron 100-150 µg de proteína total con 4 µg de anticuerpo monoclonal anti-PP2A y 30 µl de suspensión de proteína A-sefarosa a 4 °C durante 2 h. Después las muestras se peletizaron a 14.000 rpm durante 1 min, se lavaron tres veces en TBS en exceso y una vez con tampón de ensayo pNPP. Después del giro final todo el sobrenadante se eliminó cuidadosamente y se añadieron 500 µM de péptido fosfotreonina a un volumen final de 80 µl a las perlas. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 10 min con agitación, y la reacción se terminó mediante la adición de solución de verde de malaquita. La absorbancia se leyó por duplicado para cada muestra a 590 nm.

ENSAYO DE HIDRÓLISIS DE PNPP

El para-nitrofenilfosfato (pNPP) es un sustrato químico de enzimas fosfatasa que después de hidrólisis del resto fosfato genera para-nitrofenol, un cromógeno intensamente amarillo, soluble en condiciones alcalinas. En ensayos para medir la actividad de fosfatasa relativa, se mezclaron 0,05 U de PP2A purificado con 5 µl de NiCl₂ 40 mM y 5 µl de solución de BSA (5 mg/ml) en un microtubo de centrifugación. Se añadieron varios tratamientos tal como se indica, y el volumen se ajustó a 80 µl con tampón de ensayo pNPP. Las muestras se preincubaron a 37 °C durante 15 min. Se preparó sustrato pNPP nuevo antes de cada ensayo disolviendo 1,5 mg/ml de pNPP en Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. Para iniciar la reacción de fosfatasa, se añadieron 120 µl de sustrato pNPP y las muestras se incubaron durante 15 min adicionales a 37 °C. La absorbancia de cada muestra se midió por duplicado a 405 nm con 590 nm como referencia. La actividad de PP2A se calculó usando la ecuación siguiente: actividad = (volumen de muestra en litros) x A₄₀₅/1,78x10⁴M⁻¹cm⁻¹ (coeficiente de extinción) x 0,25 cm x 15 min x 0,05 U de enzima.

MEDICIÓN DE GRUPOS SULFHIDRILOS LIBRES TOTALES

El cambio en grupos sulfhidrilo libres en PP2A purificado siguiendo varios tratamientos se determinó usando reactivo de Ellman. Se añadieron 0,01 U de PP2A a 37,5 µl de tampón de dilución (Tris-HCl 30 mM, EDTA 3 mM, pH 8,2), 12,5 µl de reactivo DTNB (reactivo de Ellman) y 200 µl de metanol. Las muestras se incubaron durante 5 min a TA, y después la extinción se midió por duplicado para cada una a 412 nm. Los resultados se compararon con una curva patrón generada con N-acetilcisteína.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE QUINASA DE AKT

El efecto de selenato de sodio sobre la actividad de quinasa de Akt1 se determinó usando el kit de actividad de AKT K-LISA™ (Calbiochem N° CBA019). Este es un ensayo basado en ELISA que usa un sustrato peptídico biotinilado (GRPTSSFAEG) que está fosforilado en la segunda serina por Akt1, Akt2, Akt3, SGK (quinasa glucocorticoide de suero) y MSK1. El sustrato Akt biotinilado y la muestra de Akt se incubaron en presencia de ATP en pocillos de un juego de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina, lo que permite la fosforilación y la captura de sustrato en una única etapa. El sustrato fosforilado se detecta con un anticuerpo de detección de fosfo-serina, seguido por un conjugado HRP-anticuerpo y desarrollo del color con sustrato TMB.

Al comienzo de cada realización del ensayo, se preparó una nueva parte alícuota de solución de funcionamiento de sustrato de Akt biotinilado diluyendo la solución madre 1:100 con H₂O destilada. A continuación se añadió después a cada pocillo en este orden: 10 µl de 5x tampón de ensayo de quinasa; 10 µl de solución de funcionamiento de sustrato de Akt biotinilado; 250 ng de Akt1 recombinante humano y 10 µl de H₂O; selenato de sodio 50 µM o estaurosporina 1 µM en 10 µl de H₂O destilada, o solo H₂O destilada para controles positivos; 10 µl de 5x mezcla ATP/MgCl₂ hasta un total de 50 µl por pocillo. La placa se selló con sellador de placas, se mezcló brevemente sobre un agitador de microplaca y se incubó durante 30 m a 30 °C. La reacción de quinasa se detuvo después añadiendo 10 µl de solución de detención de quinasa a cada pocillo. Los contenidos de cada pocillo se descartaron y después se lavó 3 veces con 1x solución de lavado de ELISA (preparado diluyendo la solución de lavado de ELISA madre 1:20 con H₂O destilada), se invirtieron y se golpearon con el dedo para que cayeran sobre papel de inmunotransferencia hasta secado. Después se añadieron 100 µl de solución de funcionamiento de anticuerpo de detección de fosfo-serina (recién preparado para cada realización del ensayo diluyendo la solución madre de anticuerpo de fosfo-serina 1:1000 con H₂O destilada) y después se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a TA. Las placas se lavaron después tal como se ha descrito anteriormente. Después se añadieron 100 µl de solución de funcionamiento de conjugado HRP-anticuerpo (recién preparado para cada realización del ensayo diluyendo la solución madre de conjugado HRP-anticuerpo 1:1000 con H₂O destilada) y después se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a TA. La placa se lavó después de nuevo tal como se ha descrito anteriormente. Después se añadieron 100 µl de sustrato TMB a cada pocillo y el color se dejó desarrollar durante 20 min a TA. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de solución de detención de ELISA a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm con referencia a 590 nm usando un lector de microplacas.

ENSAYO DEL ESTADO RÉDOX INTRACELULAR

El estado rédox intracelular se determinó usando diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA). El DCFDA es

no fluorescente y permeable a células libremente, pero en presencia de especies de oxígeno reactivo (ROS) se convierte rápidamente en la célula en 2',7'-diclorofluoresceína impermeable pero altamente fluorescente (DCF). Las células se equilibraron con DCFDA 5 μ M durante 15 min antes de diversos tratamientos. Después se recogieron las células adherentes, se lavaron dos veces con PBS y la proporción de células fluorescentes se determinó inmediatamente mediante citometría de flujo.

La citación de cualquier referencia en el presente documento no debería entenderse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica anterior" de la presente solicitud.

A lo largo de la memoria el objetivo ha sido describir las realizaciones preferentes de la invención sin limitación de la invención a una realización cualquiera o conjunto específico de características. Los expertos en la técnica apreciarán, por lo tanto, que a la luz de la presente divulgación, pueden realizarse diversas modificaciones y cambios en las realizaciones ejemplares particulares sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Se pretende que todas dichas modificaciones y cambios estén incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 10

Efecto de selenato sobre actividades de fosforilación de tau tanto en tejidos de cerebro de ratón como en líneas celulares de neuroblastoma humano

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular. Las líneas celulares de neuroblastoma humano SY5Y y BE2M17 se obtuvieron de Janetta Culvenor (Departamento de Patología, Universidad de Melbourne, VIC). Se cultivaron de forma rutinaria células SY5Y en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) suplementado con suero de bovino fetal al 10 % (FBS, Invitrogen, GIBCO), aminoácidos no esenciales al 1 % (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), HEPES 10 mM (Invitrogen, GIBCO), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, GIBCO) y mezcla antibiótico/antimicótico al 1 % (Invitrogen, GIBCO). Se cultivaron células BE2M17 en medio de suero reducido OPTI-MEM I (Invitrogen, GIBCO) suplementado con FBS al 10 % (Invitrogen, Invitrogen, GIBCO), aminoácidos no esenciales al 1 % (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, GIBCO) y mezcla antibiótico/antimicótico al 1 % (Invitrogen, GIBCO). Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 %. El selenato de sodio se obtuvo de Sigma (St Louis, MO, Estados Unidos).

Anticuerpos Los anticuerpos siguientes se obtuvieron de Pierce Endogen (Rockford, Estados Unidos), a menos que se indique lo contrario: monoclonal PHF-Tau antihumano (clon AT100; AT180; AT270), y monoclonal Tau antihumano (clon HT-7). inmunoglobulinas/HRP policlonal de cabra antiratón policlonal (Dako, Dinamarca) y antitubulina (G712A, Promega).

In vitro: Se plaquearon 2×10^5 células SY5Y o BE2M17 en cada pocillo en una placa de 6 pocillos Falcon, bien con superficies recubiertas o bien no recubiertas, y se dejó que se unieran durante la noche al 5 % de CO₂/ 37 °C en medio de crecimiento completo (tal como se ha descrito anteriormente). El medio se reemplazó por medio de crecimiento completo nuevo que contenía una concentración 100 μ M de selenato de sodio y se cultivaron durante 3 horas. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos Falcon con superficies recubiertas bien con gelatina al 0,1 % (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), matrigel (cat N° 354234, BD, NSW, Australia) o bien 0,5 μ g/ml de fibronectina (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos).

In vivo: Se obtuvieron ratones macho Balb/C Nu Nu de 14 semanas de edad de ARC. Los ratones recibieron una única inyección subcutánea de 300 μ g de selenato de sodio por 200 μ l en PBS. Después los ratones se sacrificaron en diversos puntos temporales después de la inyección y se recogieron especímenes de sangre y tejido cerebral.

Preparación de lisados e inmunotransferencia: Las células se lavaron dos veces en PBS frío y se lisaron en 150 μ l de tampón RIPA (que contenía glicerina al 10 %, Tris 20 mM, NaCl 137 mM, SDS al 0,1 %, IGEPAL al 0,05%, Triton X-100 al 1 %, EDTA 2 mM, NaV al 10 %, NaF al 2 % y 4X inhibidor de proteasa) frío, de forma similar, se homogeneizaron tejidos cerebrales en hielo seco usando un mortero, y se lisaron en 150 μ l de tampón RIPA. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos, seguido por centrifugación a 13000 rpm/ 10 minutos/4 °C. El sobrenadante se recogió y se calculó la estimación de proteínas para cada muestra usando reactivo BCA (Sigma). Se cargaron cantidades iguales de proteína en cada carril de un gel de SDS-poliacrilamida al 10 %. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) y se bloquearon con solución de leche desnatada al 5 % (blotto) durante 2 horas. Después de bloquear la membrana, se incubaron anticuerpos primarios: bien PHF-tau antihumano (AT100 a 1:200, AT180 a 1:1000 y AT270 a 1:2500) o bien Tau antihumano (HT-7 a 1:1000) durante la noche a 4 °C en solución de leche desnatada al 5 % (blotto). Antes de la incubación del anticuerpo secundario, las membranas se enjuagaron 3x seguido por 3x5 minutos de lavado en solución salina tamponada con Tris con Tween al 0,01 % a temperatura ambiente. Seguido por 1 hora de incubación del anticuerpo secundario policlonal de cabra antiratón (Dako, Dinamarca) acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) a 1:10000 diluciones en solución de leche

desnatada al 5 % (blot)/ temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tal como se ha descrito anteriormente y se detectaron usando reactivo de detección de inmunotransferencia Western Amersham ECL (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, RU). Las membranas se arrastraron usando tampón de arrastre SDS/ β -mercaptoetanol al 2 % y se volvieron a analizar para determinar tubulina (Promega) para confirmar la carga proteica.

5 Las inmunotransferencias de la línea celular BE2M17 de neuroblastoma humano con PHF-Tau antihumano en presencia (+) o ausencia (-) de selenato de sodio, en diversas superficies de recubrimiento se muestran en la figura 11. El selenato de sodio 100 μ M se preparó en medio de crecimiento completo BE2M17. Las células se cultivaron con selenato de sodio durante 3 horas en fibronectina, sin recubrimiento (plástico) o matrigel (tal como se ha descrito en la sección de métodos).

RESULTADOS

15 Se detectó PHF-Tau clon AT100 en 68kDa. En presencia de selenato de sodio, la señal de PHF-Tau pareció estar reducida en células cultivadas en fibronectina y matrigel, en comparación con células no tratadas con selenato.

20 Se detectó PHF-Tau clon AT180 en 71 y 67 kDa. Las células tratadas con selenato cultivadas en fibronectina, plástico (sin recubrimiento) y matrigel parecieron tener una señal de PHF-Tau más débil en comparación con células no tratadas con selenato. Las células cultivadas en matrigel dan una señal más fuerte de PHF-Tau en 67kDa en comparación con células cultivadas en fibronectina y plástico.

25 Se detectó PHF-Tau clon AT270 en 66 y 63 kDa. Las células tratadas con selenato cultivadas en fibronectina, plástico (sin recubrimiento) y matrigel parecieron tener una señal de PHF-Tau más débil en comparación con células no tratadas con selenato. Nótese que existe solo una ligera diferencia entre las células tratadas con selenato y las células no tratadas cultivadas en matrigel.

Se detectó Tau clon HT-7 en 68, 64, y 57kDa. Las células cultivadas en fibronectina con selenato parecen reducir la expresión de Tau.

30 Se detectó anti-tubulina que muestra una carga proteica igual.

35 La inmunotransferencia de la línea celular BE2M17 de neuroblastoma humano con PHF-Tau antihumano en presencia (+) o ausencia (-) de selenato de sodio, en diversas superficies de recubrimiento se muestra en la figura 12. El selenato de sodio 100 μ M se preparó en medio de crecimiento completo de SY5Y. Las células se cultivaron con selenato de sodio durante 3 horas en gelatina, fibronectina, sin recubrimiento (plástico) o matrigel (tal como se ha descrito en la sección de métodos).

RESULTADOS

40 Se detectó específicamente PHF-Tau clon AT270 en 70 kDa. Las células tratadas con selenato cultivadas en gelatina y fibronectina parecieron tener una señal de PHF-Tau más débil en comparación con células no tratadas con selenato.

45 Se detectó Tau anti-humano clon HT-7 a 60 kDa. Tanto el matrigel como la fibronectina parecieron reducir la señal anti-Tau. En particular, las células cultivadas en fibronectina con selenato parecieron tener una señal más débil para anti-Tau que las cultivadas sin selenato.

Se detectó anti-tubulina que muestra una carga proteica igual relativa.

50 La inmunotransferencia de lisados cerebrales totales de ratones macho Balb/C Nu Nu de 14 semanas de edad con PHF-Tau antihumano (tal como se ha indicado) bien con (+) o bien sin (-) selenato de sodio se muestra en la figura 13. A los ratones tratados con selenato de sodio se les administró inyección subcutánea de 1,5 μ g/ μ l. En ausencia de selenato de sodio (-) a los ratones se les inyectó subcutáneamente PBS. Se recogió tejido cerebran en varios puntos temporales: 0, 2 y 6 horas (tal como se ha descrito en la sección de métodos).

55 RESULTADOS

60 El PBS pareció tener un efecto sobre la señal de PHF Tau antihumano para todos los clones estudiados (AT100, AT180 y AT270). Para confirmar una carga de proteína igual, se sometieron a arrastre todas las membranas y se volvieron a analizar para determinar tubulina tal como se ha descrito en la sección de métodos.

65 La figura 13A muestra la inmunorreactividad de PHF Tau antihumano clon AT100 a 60 kDa. En presencia de selenato de sodio, la señal PHF Tau parece reducirse en los puntos temporales de 2 y 6 horas en comparación con células no tratadas con selenato.

La figura 13B muestra la inmunorreactividad de PHF Tau antihumano clon AT180 a 60 kDa. En presencia de

selenato de sodio, la señal PHF Tau se reduce claramente en los puntos temporales de 2 y 6 horas en comparación con células no tratadas con selenato.

5 La figura 13C muestra señales de inmunoreactividad similares de AT270 en comparación con clones AT180. Parece que los clones AT270 detectan tres isoformas de PHF Tau a 73, 70 y 60 kDa.

La figura 13D muestra la expresión de proteína Tau en lisados totales cerebrales de ratón bien con (+) o bien sin (-) selenato de sodio. La Tau antihumana, específicamente el clon HT-7, parece ser no específica en tejidos cerebrales de ratones.

10 Ejemplo 11

Efectos del selenato de sodio sobre el comportamiento y la patología cerebral de Tau de ratones transgénicos que sobreexpresan Tau 441 humana (TMHT)

15 **MÉTODOS**

Introducción

20 El estudio se diseñó para evaluar los efectos de un tratamiento con selenato de sodio sobre el comportamiento y la morfología cerebral de ratones TMHT transgénicos (Tg) TAU441 (fondo C57BL6) que sobreexpresan el gen TAU441 humano con dos mutaciones, V337M y R406W, bajo el control de un promotor Thy-1 murino específico de cerebro. El comportamiento de todos los ratones Tg se evaluó después de 1,5 y 3 después del tratamiento en el ensayo en Campo Abierto, el ensayo Rota Rod (RR) y el ensayo de curiosidad y actividad Nose poke, este último para evaluar el comportamiento de curiosidad. Al finalizar el tratamiento de memoria y aprendizaje adicionalmente se evaluaron en el ensayo de Morris Water Maze (MWM). Los ratones no tratados del grupo de línea base también se analizaron en el ensayo al aire libre, el ensayo de RR, el ensayo de Nose poke y el ensayo MWM. La patología cerebral de Tau se determinó inicialmente en 3 animales por grupo de tratamiento.

30 Animales

Se usaron ratones Tg TMHT machos y hembras que expresan TAU441 humana que portan las mutaciones missense V337M y R406W bajo el control regulador del promotor Thy-1 específico de cerebro. Los ratones se generaron y se criaron en JSW-Research, Graz, Austria. El fondo C57BL/6 para estos ratones dio como resultado que los ratones se destacaron como buenos aprendices. Este modelo murino semeja la patología tau de enfermedad de Alzheimer humana. Al comienzo del tratamiento las ratones tenían una edad de 5 meses \pm 2 semanas y esta fue también la edad del grupo de línea base.

Identificación de los animales y alojamiento

40 Los ratones se identificaron con marcas en las orejas. Se alojaron en jaulas ventiladas individuales (IVC) en camas para roedores estandarizadas suministradas por ABEDD®. Cada jaula contenía un máximo de cinco ratones. Los ratones se mantuvieron según los procedimientos operativos estándar basados en normas internacionales.

45 Cada jaula se identificó mediante una tarjeta de colores indicando el número de estudio, sexo, los número de registro individuales (NRI) de los animales, fecha de nacimiento, así como los datos de análisis y la designación de grupo de tratamiento.

50 La temperatura durante el estudio se mantuvo a aproximadamente 24 °C y la humedad relativa se mantuvo a aproximadamente el 40 - 70 %. Los animales se alojaron con un ciclo de luz constante (12 horas de luz/oscuridad).

Los animales tenían disponible pienso de roedor estándar peletizado seco (Altromin®) y agua del grifo normal a voluntad.

55 Tratamiento

Los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos A (selenato de sodio), B (vehículo) y C (línea base). El grupo de tratamiento A recibió selenato de sodio a través del agua de bebida durante 12 semanas, mientras que los ratones control (B) tenían acceso a agua del grifo normal. Par la aplicación, se disolvieron 1,2 mg de selenato de sodio en 100 ml de agua estéril, el peso se registró y la botella se dispuso en la jaula. Esto se realizó cada lunes, miércoles y viernes, y el agua se pesó a la vuelta para medir el consumo.

Análisis de comportamiento

65 *Ensayo en Campo Abierto*

La medición general más estandarizada de función locomotora es la actividad espontánea en campo abierto (OF). Para las presentes investigaciones se usó un campo abierto de Plexiglas (48x48 cm; TSE-System®). Los haces de luz infrarroja se dispusieron a 1,4 cm de distancia alrededor de la caja. Para detectar cuando el animal se yergue sobre sus patas traseras se montó otra fila de haces de luz 4 cm sobre la primera. Las sesiones del ensayo duraron 5 minutos para analizar el comportamiento del ratón en su nuevo entorno, así como su habituación. Después, se contó el número de bolos fecales, como medida de la emocionabilidad. El OF se limpió con etanol al 70 % después de cada ratón para eliminar restos de olor. El estudio se realizó en condiciones de iluminación del sitio estándar durante la fase de luz del ciclo circadiano.

10 *Ensayo de Rota Rod*

Este ensayo se usó para detectar posibles déficits motores de los ratones Tg TAU. Las investigaciones se realizaron en un aparato Rota Rod de aceleración de cinco carriles (TSE-Systems®). Los ratones tuvieron que completar un programa durante un máximo de 300 s. Empezaron con una velocidad de 5 rpm y después de 120 s el tubo alcanzó una velocidad de 60 rpm. Después de esta operación, se calcularon la caída de la latencia y la velocidad del tubo en ese momento.

Ensayo de curiosidad y actividad Nose poke

20 El aparato de tabla con agujero ofrece un método sencillo de medición de las respuestas de un ratón a un ambiente nuevo y aprovecha la naturaleza curiosa de los ratones y su tendencia a meter sus hocicos en los agujeros. La investigación del comportamiento de curiosidad se realizó en cajas OF equipadas con tablas con agujeros (16 agujeros/tabla). Cuando los ratones introducen la cabeza en un agujero, interrumpen los haces de infrarrojos situados justo debajo del borde de cada agujero. El número y la duración de introducciones de cabeza se calcularon para cada animal durante un periodo de 5 minutos.

Morris Water Maze (MWM)

30 El ensayo Morris Water Maze se realizó en una pileta circular negra de un diámetro de 100 cm. La pileta se llenó con agua del grifo a una temperatura de 22 ± 1 °C y la pileta se dividió virtualmente en cuatro sectores. Se dispuso una plataforma transparente (8 cm de diámetro) aproximadamente 0,5 cm por debajo de la superficie del agua. Durante toda la sesión de ensayo, excepto el preensayo, la plataforma se ubicó en el cuadrante suroeste de la pileta.

35 Un día antes de la sesión de entrenamiento que duró 4 días, los animales tuvieron que realizar el denominado "preensayo" (dos ensayos de 60 segundos) para asegurar que la capacidad visual de cada animal fuera normal. Solo los animales que superaron esta prueba continuaron con el ensayo MWM.

40 En el ensayo MWM cada uno de los ratones tuvo que realizar tres pruebas en cuatro días consecutivos. Cada prueba individual duró un máximo de un minuto. Durante este tiempo, los ratones tuvieron la oportunidad de encontrar el objetivo diáfano oculto. Si el animal no podía encontrar un "camino" fuera del agua, el investigador guiaba al ratón hacia la plataforma o lo colocaba sobre la misma. Después de cada prueba, se dejó al ratón descansar sobre la plataforma durante 10-15 segundos. Durante este tiempo, el ratón tenía la posibilidad de orientarse en el entorno. Las investigaciones tuvieron lugar en condiciones de luz tenue, para evitar que el sistema de seguimiento tuviera influencias negativas (Kaminski; PCS, Biomedical Research Systems). Una de las paredes que rodeaban la pileta, se fijaron carteles con símbolos geométricos grandes negros (es decir, un círculo y un cuadrado) para que los ratones pudieran usar los símbolos como referencia para orientarse.

50 Un grupo de nadadores por prueba consistía en cinco o seis ratones, de modo se aseguró un periodo de tiempo entre las pruebas de aproximadamente cinco a diez minutos.

55 Para la cuantificación de la latencia de escape (el tiempo en segundos que el ratón necesita para encontrar la plataforma oculta y, por lo tanto, para escapar del agua), de la ruta (la longitud de la trayectoria en metros para alcanzar el objetivo) y de su presencia en el cuadrante objetivo, se usó un sistema de seguimiento por ordenador. El ordenador se conectó a la cámara situada sobre el centro de la pileta. La cámara detectaba la señal del diodo emisor de luz (LED), que se fijó con una pequeña horquilla a la cola del ratón.

Ensayo de sonda

60 Una hora después del último ensayo el día 4, los ratones tuvieron que cumplir el denominado ensayo de sonda. En este momento, la plataforma se retiró de la pileta y durante el ensayo de sonda de un minuto, el experimentador contó el número de pasadas sobre la posición objetivo anterior. Adicionalmente, se midió la presencia en este cuadrante.

Preparación de tejidos y muestreo

65 Al finalizar el periodo de tratamiento, y siguiendo todos los análisis de comportamiento, en el sacrificio de cada

animal, se obtuvieron sangre (plasma y suero), CSF y cerebro, se procesaron inmediatamente y se almacenaron para experimentos posteriores.

5 Para todos los fines, todos los ratones se sedaron con inhalación estándar de anestesia (isoflurano, Baxter). Se obtuvo fluido cerebroespinal por disección directa y exposiciones del foramen magno. Después de la exposición, se insertó una pipeta Pasteur a una profundidad aproximada de 0.3 - 1 mm en el foramen magno. Se recogió CSF succionando y por acción capilar hasta que cesó totalmente el flujo. Cada muestra se congeló inmediatamente y se conservó a -80 °C hasta que estuvo lista para análisis posteriores con la técnica ELISA.

10 Después del muestreo de CSF, cada ratón se colocó en recumbencia dorsal y se insertó una aguja del calibre 26 unida a una jeringa de 1 ml en el tórax a través de un diafragma a una profundidad aproximada de 2 cm. Se aplicó una succión ligera a la aguja y se confirmó la disposición en la cámara cardiaca (ventricular) del ratón mediante flujo de sangre a la cámara de la jeringa. La sangre se aspiró hasta que cesó el flujo, se recogió en viales con EDTA y se almacenó a -20 °C hasta un uso posterior.

15 Después del muestreo de sangre, los ratones transgénicos se perfundieron intracardiamente con cloruro de sodio al 0,9 %. Los cerebros se retiraron rápidamente y la mitad derecha se fijó por sumersión durante 24 horas en paraformaldehído al 4 % recién preparado y se embebió en parafina para las investigaciones histológicas. El hemisferio derecho se congeló sobre hielo seco y se almacenó a - 80 °C para posibles análisis bioquímicos posteriores.

Inicialmente, se realizaron nueve (9) evaluaciones histológicas de hemisferios cerebrales (≥ 3 por grupo de animal Tg) para evaluar cualitativa y cuantitativamente la patología TAU.

25 Se cortaron quince (15) secciones coronales consecutivas (Leica SM 2000R) (5 μ m de espesor) en cada uno de las 5 capas cerebrales diferentes entre Bregma -1,82 y -1,34 mm, que se eligieron según el atlas morfológico "The Mouse Brain" de Paxinos y Franklin (2ª edición), para la tinción de Gallyas y la determinación de la patología TAU con anticuerpos específicos (AT180 y HT7). Los tejidos de todos los animales transgénicos investigados se manipularon en exactamente el mismo modo para evitar diferencias debidas a la variación de este procedimiento.

30 Los hemisferios o tejidos cerebrales restantes no usados se guardaron y almacenaron hasta que el patrocinador decidió como proceder o hasta el fin del estudio.

Determinación inmunquímica de patología TAU

35 Se determinaron deposiciones TAU usando los anticuerpos monoclonales TAU AT180 y HT7 (Pierce Endogen®). El AT180 reconoce PHF-TAU y formaciones tipo ovillo [el epítotope de este anticuerpo es el residuo Thr231] y el HT7 TAU normal humano y PHF-TAU [el epítotope de este anticuerpo se ha cartografiado en TAU humano entre los residuos 159 y 163].

40 Se tiñieron secciones de parafina coronaria de cinco (5) μ m de espesor para cada una de las cinco capas diferentes con los anticuerpos TAU antihumanos de ratón monoclonales descritos anteriormente (AT180 - 1:100; HT7 - 1:1000) y se visualizaron usando un Cy3 antirratón secundario (1:500, Jackson Laboratories®). Los protocolos de tinción detallados se exponen más adelante:

45 Protocolo de incubación de AT180 para la determinación de deposiciones PHF-TAU humanas

1. Desparafinar e hidratar secciones de tejido mediante Tissue Clear (Sakura®) y series de alcohol de grado (Merck®).

50 2. Lavar durante 2 minutos en Aqua bidest (Fresenius-Kabi®)

3. Disponer secciones del tejido para enmascarar el antígeno en tampón de citrato al 10 % (Labvision®) durante 15 minutos a 95 °C en un vaporizador y enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

55 4. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

5. Bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 1 % (Linaris®) en metanol (Merck®) durante 10 minutos. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

60 6. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

7. Bloquear uniones no específicas con reactivo de bloqueo MOM (Vector®) durante 60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

65 8. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

9. Bloquear uniones no específicas con diluyente MOM (Vector®) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

10. Incubar con AT180 (Pierce Endogen®; 1:100 en diluyente MOM) durante 60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

5 11. Lavar las secciones durante 3 x 5 minutos en PBS.

12. Bloquear uniones no específicas con suero normal de cabra no inmune al 10 % (Dako®) durante 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

10 13. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

14. Incubar con Cy3 de cabra antirratón (Jackson®; 1:500 en diluyente MOM) durante 60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

15 15. Lavar las secciones durante 5 minutos en PBS.

16. Lavar las secciones durante 5 minutos en Aqua bidest.

20 17. Cubrir las secciones con Moviol y cubreobjetos.

Productos químicos y reactivos:

Peróxido de hidrógeno al 1 % en metanol:

25 60 ml de metanol + 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % + 0,6 ml de Triton X-100 (Amresco®).

Reactivo de bloqueo MOM:

30 2 gotas de reactivo de bloqueo IgG de ratón MOM (del kit MOM (Vector®)) + 2,5 ml de PBS.

Diluyente MOM:

35 10 ml de PBS + 800 µL de concentrado de proteína (del kit MOM (Vector®)).

Anticuerpo AT180:

1:100 en diluyente MOM

40 *Anticuerpo Cy3 de cabra antirratón:*

1:500 en diluyente MOM

Protocolo de incubación de HT7 para la determinación de deposiciones TAU y PHF-TAU normales humanas

45 1. Desparafinar e hidratar secciones de tejido mediante Tissue Clear (Sakura®) y series de alcohol de grado (Merck®).

50 2. Lavar durante 2 minutos en Aqua bidest (Fresenius-Kabi®)

3. Disponer secciones del tejido para enmascarar el antígeno en tampón de citrato al 1% (Labvision®) durante 15 minutos a 95 °C en un vaporizador y enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

55 4. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

5. Bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 1 % (Linaris®) en metanol (Merck®) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

60 6. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

7. Bloquear uniones no específicas con reactivo de bloqueo MOM (Vector®) durante 60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

65 8. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

9. Bloquear uniones no específicas con diluyente MOM (Vector®) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

10. Incubar con HT7 (Pierce Endogen®; 1:1000 en diluyente MOM) durante 60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

5 11. Lavar las secciones durante 3 x 5 minutos en PBS.

12. Bloquear uniones no específicas con suero normal de cabra no inmune al 10 % (Dako®) durante 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

10 13. Lavar las secciones durante 2 x 5 minutos en PBS.

14. Incubar con Cy3 de cabra antirratón (Jackson®; 1:500 en diluyente MOM) durante 60 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

15 15. Lavar las secciones durante 5 minutos en PBS.

16. Lavar las secciones durante 5 minutos en Aqua bidest.

17. Cubrir las secciones con Moviol y cubreobjetos.

20

Productos químicos y reactivos:

Peróxido de hidrógeno al 1 % en metanol:

25 60 ml de metanol + 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % + 0,6 ml de Triton X-100 (Amresco®).

Reactivo de bloqueo MOM:

2 gotas de reactivo de bloqueo IgG de ratón MOM (del kit MOM (Vector®)) + 2,5 ml de PBS.

30

Diluyente MOM:

10 ml de PBS + 800 µl de concentrado de proteína (del kit MOM (Vector®)).

35 *Anticuerpo HT7:*

1:100 en diluyente MOM

Anticuerpo Cy3 de cabra antirratón:

40

1:500 en diluyente MOM

EVALUACIÓN

45 Comportamiento

En el campo abierto (OF) se midieron la actividad horizontal y vertical, el número de bolos fecales, el número y la duración del levantamiento sobre las patas traseras, la hiperactividad y el tiempo transcurrido en el centro frente al tiempo pasado en el perímetro del campo abierto.

50

En el ensayo de curiosidad y actividad Nose poke se calculó el número y la duración de introducciones de cabeza.

En el Rota Rod se calcularon la caída de la latencia y la velocidad del tubo en ese momento.

55 En las pruebas Morris water maze se registraron la longitud de las vías de nado y las latencias de escape. La velocidad de nado se calculó como ruta de nado dividida por latencia de escape. En el ensayo de sonda, un ensayo con plataforma retirada, se registró el número de pasadas sobre la posición anterior de la plataforma en las hojas de datos, así como el tiempo pasado en cada cuadrante de la pileta.

60 Neuropatología

Para determinar la extensión de inmunorreactividad de TAU en hipocampo y amígdala se usó el programa informático de análisis de imagen especializado (Image Pro Plus, versión 4.5.1.29). Se evaluaron y calcularon los parámetros siguientes:

65

- Área de la región del hipocampo y amígdala en cada porción.

- Área absoluta de células positivas inmunorreactivas en la regiones del cerebro específicas de hipocampo y amígdala.

5 - Número de áreas positivas inmunorreactivas relativas al área de la región del cerebro específica del hipocampo y la amígdala.

Procedimiento de cuantificación:

10 a) contrastar la imagen para una mejor visualización de la morfología de la porción sin aplicar el contraste a la imagen.

b) dibujar de forma interactiva las representaciones y medir el área del hipocampo (área de la región)

15 c) dibujar interactivamente el área de interés (AOI), en la que los objetos teñidos se detectan sobre una intensidad basada en niveles umbral. Para determinar el valor umbral se dibujó interactivamente un histograma de línea cerca del AOI en un área sin inmunorreacción visible. Los niveles de intensidad media de todos los píxeles del histograma de línea más una constante definieron los valores umbrales de intensidad. Los objetos con un tamaño inferior a $7 \mu\text{m}^2$ se excluyeron.

20 d) medir el área de cada objeto y la suma de área teñida en el AOI.

e) repetir a-d) para la amígdala.

25 f) calcular el área inmunopositiva de TAU (= "área suma de inmunorreactividad TAU / área de región * 100").

30 g) exportar los datos automáticamente a una página amplia de Excel que incluye los parámetros "título de la imagen, área de la región, área TAU total y área TAU en porcentaje. Se usó un campo para comentarios para registrar la calidad de imagen y criterios de exclusión, respectivamente. Los criterios de exclusión fueron partes perdidas de la porción, muchas arrugas o defectos dominantes.

h) cerrar la imagen sin guardar (mantener datos brutos).

ESTADÍSTICAS

35 Se calcularon para todos los parámetros las SEM o desviaciones típicas medias.

RESULTADOS

40 Observaciones generales

En general puede establecerse que el tratamiento con selenato de sodio no condujo a ningún efecto secundario negativo o causó ninguna muerte prematura

45 Resultados de comportamiento

Campo abierto

50 Aunque los parámetros de actividad (actividad, hiperactividad, comportamiento de levantarse sobre las patas traseras) se vieron influenciados por el tratamiento con selenato de sodio, los ratones tratados con selenato de sodio mostraron un comportamiento tigmotáctico alterado durante la primera sesión OF. Los resultados en una presencia significativamente alta en el centro en la caja de campo abierto, significan menos tigmotaxis, mientras que los animales tratados con vehículo y selenato de sodio en el primer turno (véase la figura 14 - "tigmotaxis", ensayo T para animales tratados $p = 0,19$). Al final del tratamiento en el turno 2 el comportamiento tigmotáctico se normalizó al nivel de los controles vehículo.

55 Los animales de línea base presentaron tasas de defecación más altas en el ensayo OF que ambos grupos tratados investigados un mes y medio más tarde (ANOVA: $p = 0,018$, $p < 0,05$ para ambos grupos tratados) indicando una reacción emocional más alta en el procedimiento de ensayo.

60 *Rota Rod*

La realización motora permaneció inalterada con el tratamiento con selenato de sodio.

65 *Ensayo de curiosidad y actividad Nose poke*

El comportamiento de curiosidad permaneció inalterado con el tratamiento con selenato de sodio.

Morris Water Maze

5 Los resultados de la realización de Morris Water Maze (MWM) de los dos grupos de tratamiento diferentes más la línea base (tratamiento de animales de 5 de edad) se muestran en la figura 15 y la tabla 4 que muestra los resultados del análisis estadístico. Las pruebas MWM revelaron diferencias pronunciadas, en algunos casos (véase la tabla 4) incluso significativas, entre animales tratados con selenato de sodio en comparación con el grupo vehículo e incluso en comparación con el grupo de línea base tres meses más joven.

10

Tabla 4: Tabla de resultados del ensayo en U de Mann Whitney para resultados de Morris Water Maze:

TIEMPO				LONGITUD			
sel frente a vehículo				sel frente a vehículo			
	n sel	n vehículo	valores de p		n sel	n vehículo	valores de p
DÍA 1	15	16	0,0020	DÍA 1	15	16	0,4945
DÍA 2	15	16	0,0082	DÍA 2	15	16	0,4701
DÍA 3	15	16	0,0267	DÍA 3	15	16	0,6823
DÍA 4	15	16	0,1015	DÍA 4	15	16	0,5196
sel frente a línea base				sel frente a línea base			
	n sel	n línea base	valores de p		n sel	n línea base	valores de p
DÍA 1	15	15	0,0295	DÍA 1	15	15	0,6236
DÍA 2	15	15	0,6827	DÍA 2	15	15	0,8063
DÍA 3	15	15	0,3669	DÍA 3	15	15	1,0000
DÍA 4	15	15	0,5125	DÍA 4	15	15	0,9349
vehículo frente a línea base				vehículo frente a línea base			
	n vehículo	n línea base	valores de p		n vehículo	n línea base	valores de p
DÍA 1	16	15	0,5196	DÍA 1	16	15	0,6260
DÍA 2	16	15	0,0655	DÍA 2	16	15	0,7701
DÍA 3	16	15	0,1195	DÍA 3	16	15	0,7112
DÍA 4	16	15	0,1751	DÍA 4	16	15	0,6260

Los resultados muestran claramente el potencial de selenato de sodio para mejorar funciones cognitivas.

15 Resultados de histología e inmunohistoquímica de cerebro

Resultados generales

20 En las cuantificaciones de AT180 y HT7, las áreas de región de IHC del hipocampo y la amígdala fueron muy constantes en todos los cerebros investigados, lo que excluye efectos negativos en tejidos en etapas de tinción inmunohistoquímica (por ejemplo, contracción, circunstancias de corte diferentes) y es además un signo de que no hubo atropía inducida por tratamiento. Los datos de carga TAU medidos se refirieron al tamaño de región individual en la porción que era capaz de afrontarse con diferencias mínimas.

25 *HT7 y AT180*

30 El porcentaje de área HT7-TAU relativa en el hipocampo se redujo significativamente en animales tratados con selenato de sodio (1,2 mg) frente a vehículo (ANOVA: $p < 0,05$, ensayo T de grupos tratados: $p = 0,04$) y grupos de línea base no tratados (ANOVA: $p < 0,05$; véase la figura 16A). Este efecto fue más pronunciado en amígdala (véase la figura 16B) en la que los ratones tratados con selenato de sodio mostraron un porcentaje significativamente reducido de área HT7-TAU relativa frente a grupo de línea base no tratado (ANOVA: $p < 0,01$) y frente a animales

tratados con vehículo (ANOVA: $p < 0,05$, ensayo T de tratados solo: $p = 0,0018$).

De forma similar al HT7-TAU también el porcentaje de área AT180-TAU relativa en el hipocampo estaba reducida en animales tratados con selenato de sodio (1,2 mg) frente a vehículo (ensayo T de grupos tratados: $p = 0,04$, véase la figura 17A), sin embargo a un nivel inferior de significancia. De nuevo este efecto fue más pronunciado en amígdala (véase la figura 17B) en la que los ratones tratados con selenato de sodio mostraron un porcentaje significativamente reducido de área HT7-TAU relativa frente a grupo de vehículo (ANOVA: $p < 0,05$, ensayo T de grupos tratados: $p = 0,0045$) pero no frente a grupo de línea base no tratado.

10 Las neuronas positivas inmunorreactivas AT180 y HT7 en hipocampo y amígdala mostraron deposiciones masivas de TAU en soma neuronal, que estaba empaquetado densamente con PHF TAU. El tratamiento con selenato de sodio reduce visiblemente la carga de TAU, así como células positivas de TAU en la amígdala y la capa neuronal de la región CA1 del hipocampo.

15 RESUMEN DE EFECTOS Y CONCLUSIONES

○ Menos tigmotaxis un mes y medio después del tratamiento comienza a sugerir en cambios en el miedo relacionados con estructuras amigdaloidicas en los ratones transgénicos tratados con selenato de sodio. Después de un tratamiento prolongado con selenato de sodio, los ratones volvieron a un comportamiento tigmotático comparable y normal de controles tratados con vehículo en el segundo ensayo en Campo Abierto realizado antes del sacrificio.

○ Todos los parámetros motores como la realización de Rota Rod, la actividad en campo abierto, la hiperactividad y el comportamiento de levantarse sobre las patas traseras no se vieron influenciados por el tratamiento con selenato de sodio.

○ El tratamiento con selenato de sodio pudo mejorar las capacidades cognitivas analizadas en el Morris Water Maze. El día 1, 2y 3 los animales tratados con selenato de sodio pudieron encontrar la plataforma con de forma significativamente más rápida ($p \leq 0,01$) que los animales del vehículo y el día 1 también más rápido que animales tres meses más jóvenes del grupo de línea base.

○ Los efectos pronunciados del tratamiento con selenato de sodio pueden observarse cuando se evalúan la deposición de TAU inmunopositiva a HT7 y la carga de TAU en hipocampo y amígdala de ratones Tg TMHT.

35 Debido al tratamiento, puede observarse un área de TAU positiva a HT7 en hipocampo y amígdala en comparación con el grupo de línea base no tratado o más bien en la amígdala también con los controles tratados con vehículo (H_2O).

40 ○ Los resultados de la deposición de HT7-TAU está apoyados por la incubación de AT180. En este caso puede observarse una reducción significativa de TAU positivo a AT180 después del tratamiento con selenato de sodio en el hipocampo y amígdala en comparación con los controles tratados con vehículo (H_2O).

Referencias

45 Alonso, A.D.C. y col., Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.*, 1996. 2: p. 783-787.

50 Barrett, W.C. y col., Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*, 1999. 274(49): p. 34543-6.

Barton, G.J., P.T. Cohen y D. Barford, Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem*, 1994. 220(1): p. 225-37.

55 Bass, D.A. y col., Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*, 1983. 130(4): p. 1910-7.

60 Bramblett, G.T. y col., Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*, 1993. 10: p.1089-1099.

60 Bryant, J.C., R.S. Westphal y B.E. Wadzinski, Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory Balpha subunit. *Biochem J*, 1999. 339 (Pt 2): p. 241-6.

65 Cayla, X. y col., Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, α protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 1994. 269(22): p. 15668-75.

- Chen, J., B.L. Martin y D.L. Brautigan, Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science*, 1992. 257(5074): p. 1261-4.
- 5 Chen, J., S. Parsons y D.L. Brautigan, Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem*, 1994. 269(11): p. 7957-62.
- Cohen, P.T., Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(7): p. 245-51.
- 10 Conway, K., Harper, J., Lansbury, P., 1998. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* 4, 1318-1320.
- Cross, D.A. y col., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase B. *Nature*, 1995. 378(6559): p. 785-9.
- 15 Diehl, J.A. y col., Glycogen synthase kinase-3 beta regulates cyclin D1 proteolysis and cellular localization. *Genes Dev.*, 1998. 12(22): p. 3499-511.
- Duda, J.E., Giasson, B.I., Mabon, M.E., Miller, D.C., Golbe, L.I., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2002. Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 104, 7-11.
- 20 Ellman, G.L., A colorimetric method for determining low concentration of mercaptans. *Arch Biochem Biophys*, 1958. 74(2): p. 443-50.
- 25 Feany, M.B., Bender, W.W., 2000. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394-398.
- Fernandez, J.J.y col., Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr Med Chem*, 2002. 9(2): p. 229-62.
- 30 Forman, M.S., Schmidt, M.L., Kasturi, S., Perl, D.P., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2002. Tau and alpha-synuclein pathology in amygdala of Parkinsonism-dementia complex patients of Guam. *Am. J. Pathol.* 160, 1725-1731.
- Frasier, M. y col. / *Experimental Neurology* 192 (2005) 274-287 285.
- 35 Gallego, M. y Virshup, D.M., 2005. Protein serine/threonine phosphatases life, death, and sleeping. *Curr Opin Cell Biol*, 17(2):197-202.
- 40 Giasson, B.I., Duda, J.E., Quinn, S.M., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2002. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34, 521-533.
- Giasson, B.I., Forman, M.S., Higuchi, M., Golbe, L.I., Graves, C.L., Kotzbauer, P.T., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2003. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300, 636-640.
- 45 Grundke-Iqbal, I. y col., Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 1986a. 261: p. 6084-6089.
- 50 Grundke-Iqbal, I. y col., Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986b. 83: p4913-4917.
- Guo, H. y Z. Damuni, Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(6): p. 2500-4.
- 55 Hashimoto, M., LJ, H., Xia, Y., Takeda, A., Sisk, A., Sundsmo, M., Masliah, E., 1999. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ α -synuclein in vitro. *NeuroReport* 10, 717-721.
- He, X. y col., Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patternin in *Xenopus* embryos. *Nature*, 1995, 374(6523): p. 617-22.
- 60 Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., Dickson, D.W., 2003. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 389-397.
- Jensen, P.H., Hager, H., Nielsen, M.S., Hojrup, P., Gliemann, J., Jakes, R., 1999. alpha-Synuclein binds to tau and stimulates the protein kinase A catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J. Biol. Chem.* 274, 25481-25489.
- 65

- Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoj, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J.Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretschmar, H.A., Haass, C., 2001. Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am. J. Pathol.* 159, 2215-2225.
- 5 Kamibayashi, C. y col., Comparison of heterotrimeric protein phosphatases 2A containing different B subunits. *J. Biol. Chem.* 1994. 269: p.20139-20148.
- 10 Kohn, A.D., F. Takeuchi y R.A. Roth, Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J Biol Chem*, 1996. 271(36): p. 21920-6.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J., Schols, L., Riess, O., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding a-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106-108.
- 15 Kwon, J.y col., Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(47): p. 16419-24.
- Lee, J.y col., A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996. 93(12): p. 6043-7.
- 20 Lee, V.M-Y. y col., Neurodegenerative Tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. 24: p. 1121-1159.
- Lee, V.M-Y. y col., A68: A major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science*, 1991.251: p.675-678.
- 25 Li, T. y Paudel, H.K., Glycogen Synthase Kinase β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser 396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*, 2006, 45(10): p.3125-3133.
- 30 Liu, F. y col., Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 2005. 22(8): p. 1942-50.
- Longin, S.y col., An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methyltransferase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J*, 2004. 380(Pt 1): p. 111-9.
- 35 Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., Mucke, L., 2000. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265-1269.
- 40 Mumby, M.C. y Walter, G., Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* 1993. 73: p. 673-700.
- Ostremova-Golts, N., Petrucelli, L., Hardy, J., Lee, J., Farrer, M., Wolozin, B., 2000. The A53T a-synuclein mutations increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J. Neurosci.* 20, 6048-6054.
- 45 Paik, S., Shin, H., Lee, J., Chang, C., Kim, J., 1999. Copper(II)-induced self-oligomerization of a-synuclein. *Biochem. J.* 340, 821-828.
- 50 Paik, S.R., Shin, H.J., Lee, J.H., 2000. Metal-catalyzed oxidation of alphasynuclein in the presence of copper(II) and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 269-277.
- Peterson, R.T. y col., 1999. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(8):4438-42.
- 55 Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- 60 Salmeen, A. y col., Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*, 2003. 423(6941): p. 769-73.
- Silverstein, A.M. y col., 2002. Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(7):4221-6.
- 65 Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muenter, M.,

- Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- 5 Sohn, J. y J. Rudolph, Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. *Biochemistry*, 2003. 42(34): p. 10060-70.
- Sontag, E. y col., A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J. Cell Biol.*, 1995. 128: p. 1131-1144.
- 10 Sontag, E. y col., Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron*, 1996. 17: p. 1201-1207.
- Spillantini, M., Schmidt, M., VM-Y, L., Trojanowski, J., Jakes, R., Goedert, M., 1997. a-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.
- 15 Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M., 1998b. a-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6469-6473.
- 20 Tolstykh, T. y col., Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *Embo J*, 2000. 19(21): p. 5682-91.
- Van Hoof, C. y col., Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem J*, 2005. 386(Pt 1): p. 93-102.
- 25 Van Kanegan, M.J. y col., 2005. Distinct protein phosphatase 2A heterotrimers modulate growth factor signalling to extracellular signal-regulated kinases and Akt. *J Biol Chem*, 280(43):36029-36.
- Wang, J.Z. y col., Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase 2A and 2B. *J. Biol. Chem.* 1995. 270: p. 4854-4860.
- 30 Wang, J.Z. y col., Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase 2A, 2B and 1. *Mol. Brain Res.* 1996. 38: p. 200-208.
- 35 Wang, X., V.C. Culotta y C.B. Klee, Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature*, 1996. 383(6599): p. 434-7.
- Welsh, G.I. y col., T-cell activation leads to rapid stimulation of translation initiation factor eIF2B and inactivation of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* 1996. 271(19): p. 11410-3.
- 40 Wera, S. y B.A. Hemmings, Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J*, 1995. 311 (Pt 1): p. 17-29.
- Woetmann, A. y col., 2003. Protein phosphatase 2A (PP2A) regulates interleukin-4-mediated STAT6 signaling. *J Biol Chem*, 278(5):2787-91.
- 45 Wu, J. y col., Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo. *Embo J*, 2000. 19(21): p. 5672-81.
- Xie, H. y S. Clarke, Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *J Biol Chem*, 1994. 269(3): p. 1981-4.
- 50 Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Tortosa, E.G., Del Ser, T., Munoz, D.G., De Yebenes, J.G., 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164-173.
- 55 Zhu, D. y col., 2004. Galpha12 directly interacts with PP2A: evidence FOR Galpha12-stimulated PP2A phosphatase activity and dephosphorylation of microtubule-associated protein, tau. *J Biol Chem*, 279(53):54983-6.

REIVINDICACIONES

1. Selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa.
- 5 2. El selenato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1, en el que la enfermedad neurodegenerativa es una tauopatía o una α -sinucleopatía.
- 10 3. El selenato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 2, en el que la tauopatía se selecciona de demencia presenil, demencia senil, enfermedad de Alzheimer, parkinsonismo ligado a cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis subnuclear progresiva, enfermedad de Pick, afasia progresiva primaria, demencia frontotemporal y demencia corticobasal.
- 15 4. El selenato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en combinación con otra terapia para el tratamiento o la prevención de, o para aliviar los síntomas de, enfermedades neurodegenerativas.
- 20 5. El selenato o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 2, en el que la α -sinucleopatía se selecciona de enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson con demencia, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Pick, síndrome de Down, atrofia del sistema múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y síndrome de Hallervorden-Spatz.
- 25 6. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 5, en el que la α -sinucleopatía es enfermedad de Parkinson.
- 30 7. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fosforilación de una proteína tau en una neurona, neuroglíocito o cuerpo de Lewy se inhibe o se reduce.
- 35 8. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 7, en el que la proteína tau es una proteína tau asociada a microtúbulos, o está en un ovillo neurofibrilar.
9. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo 7 o la reivindicación 8, en el que se inhibe o evita la hiperfosforilación de la proteína tau.
- 40 10. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la actividad de PP2A está potenciada.
11. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 10, en el que el PP2A es una isoforma que defosforila Akt o es una isoforma que defosforila proteínas tau.
- 45 12. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la reivindicación 11, en el que la proteína tau es una proteína tau asociada a microtúbulos que se encuentra en neuronas, neuroglíocitos o cuerpos de Lewy.
- 50 13. El selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la actividad de GSK3 β en una neurona o neuroglíocito está inhibida.
14. Uso de selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa es preferentemente tal como se define en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, y opcionalmente en el que dicho selenato o sal del mismo es para su uso en combinación con otra terapia para el tratamiento o la prevención de, o para aliviar los síntomas de, enfermedades neurodegenerativas.
- 55 15. Una composición farmacéutica que comprende selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y otro agente para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad degenerativa.
- 60 16. Un producto que contiene selenato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y otro agente para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa en forma de una preparación combinada para el uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa.
- 65 17. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 o el producto según la reivindicación 16, en el que el otro agente está seleccionado de uno o varios de un inhibidor de colinesterasa, un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato, un agente estrogénico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, levodopa, un inhibidor de dopa descarboxilasa, un agonista de dopamina, inhibidor de monoamina oxidasa B, un antocolinérgico y un inhibidor de COMT.

18. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 o el producto según la reivindicación 16, en el que el otro agente está seleccionado de tacrina, donepezilo, galantamina, rivastigmina, memantina, premarina, aspirina, ibuprofeno, levodopa, carbidopa, benserazida, bromocriptina, pergolida, pramipexol, ropinirol, cabergolina, apomorfina, lisurida, selegilina, rasasilina, mesilato de benzotropina, clorhidrato de trihexilfenidilo, entacapona, tolacapona y amantadina.

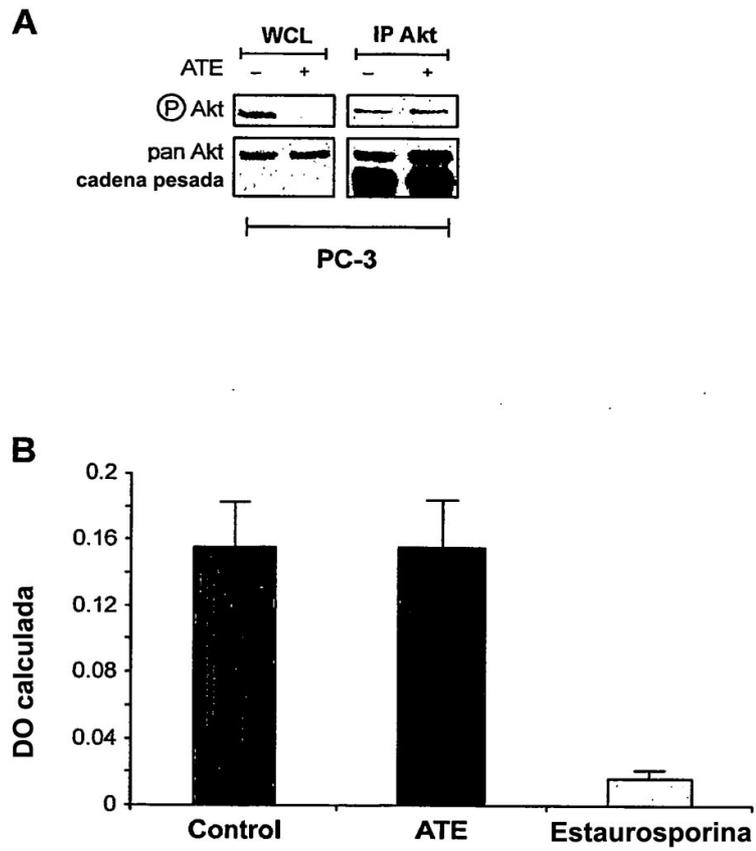


Figura 1

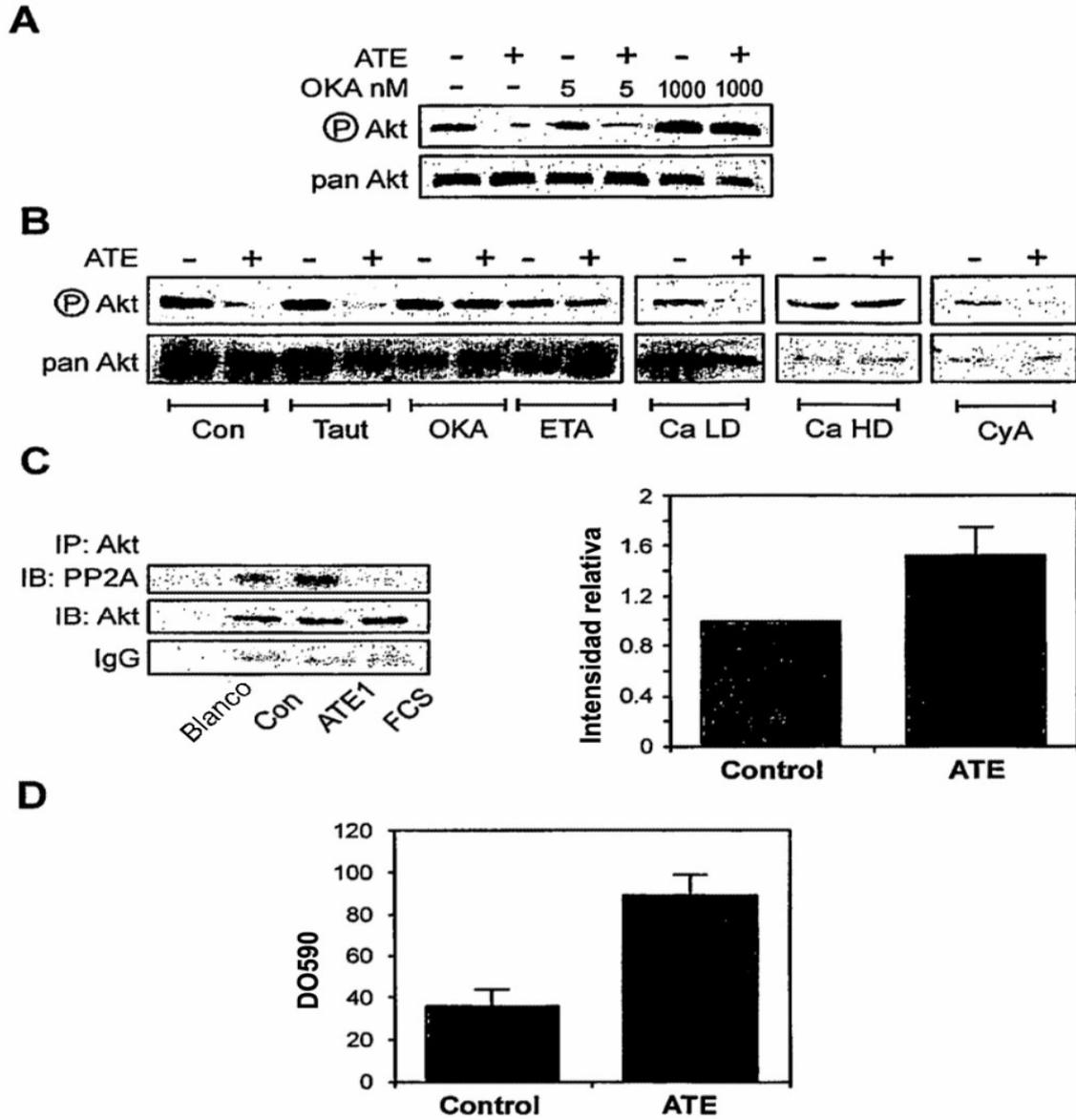


Figura 2

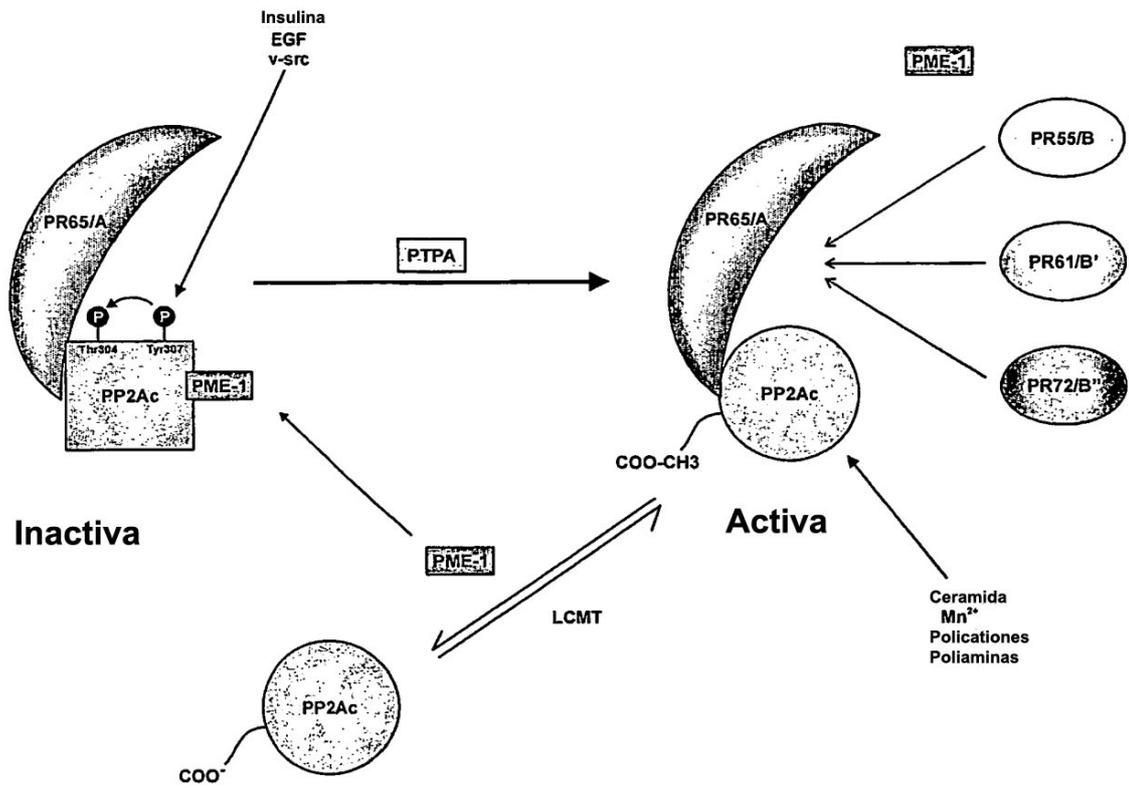


Figura 3

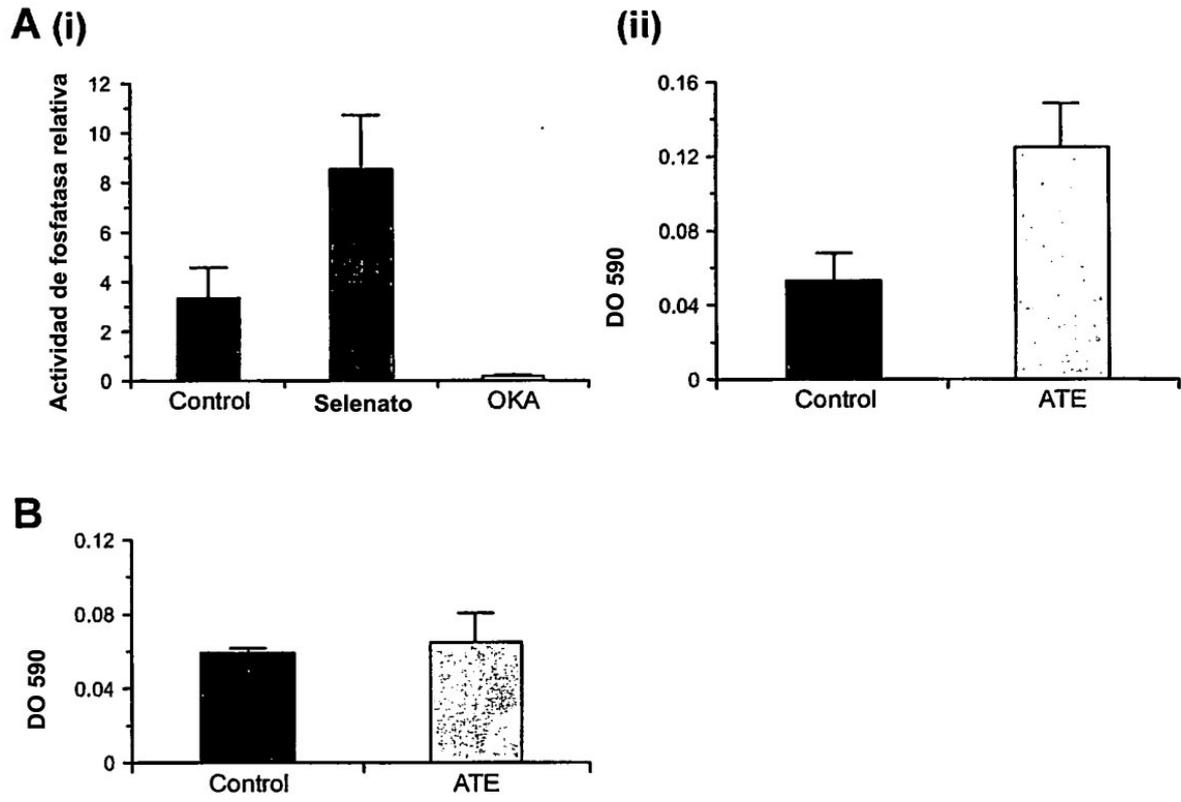


Figura 4

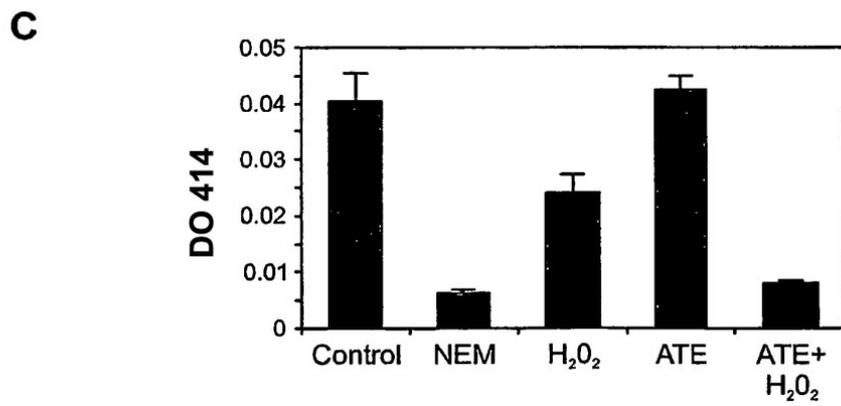
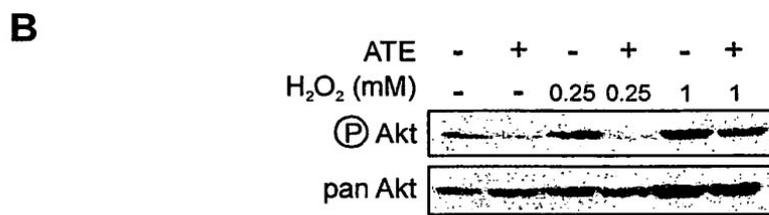
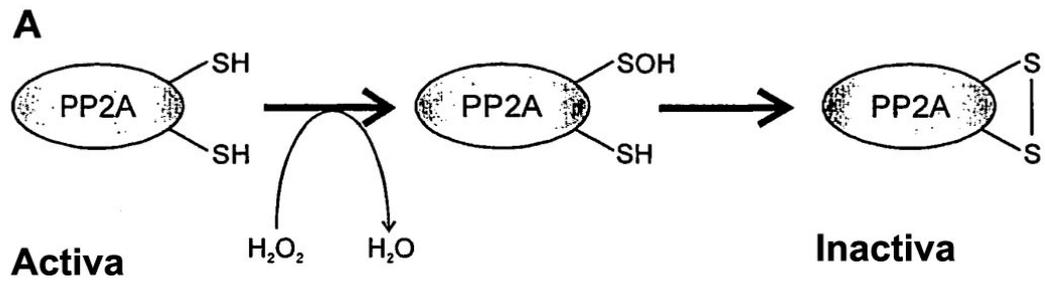


Figura 5

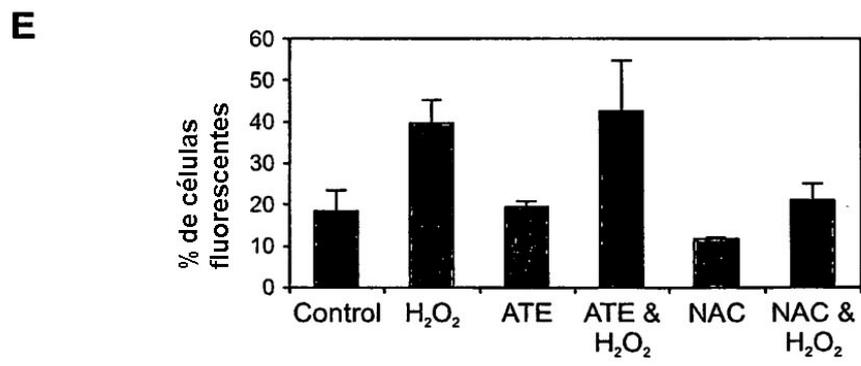
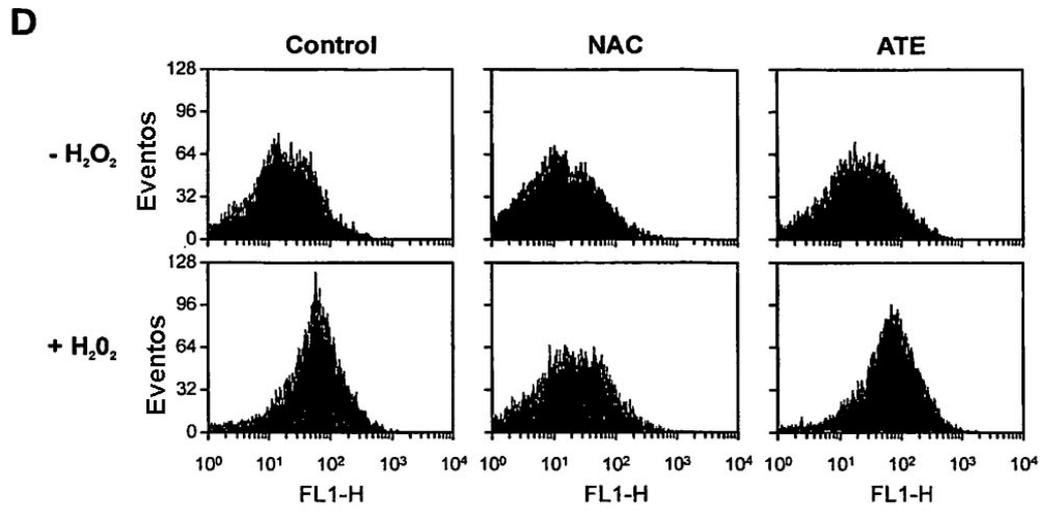
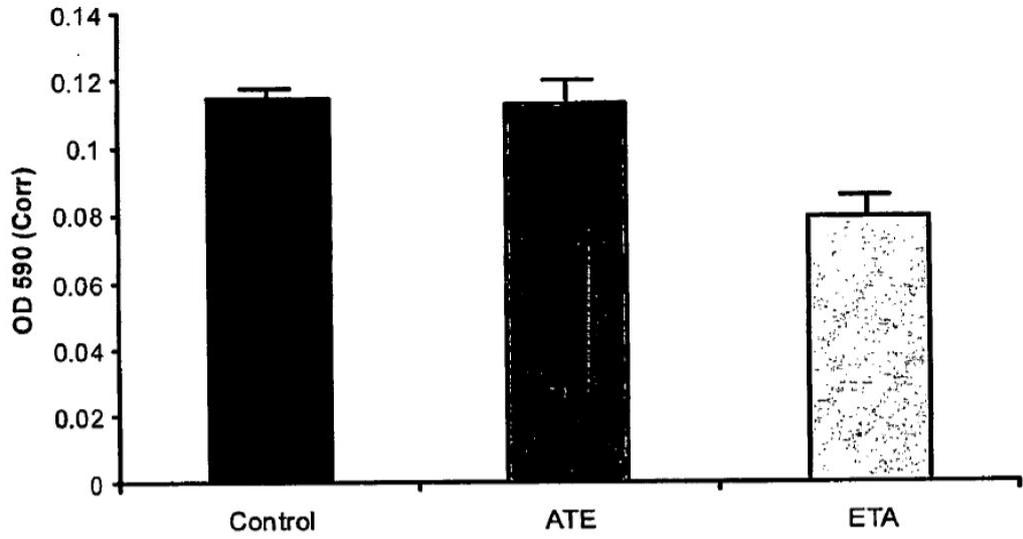
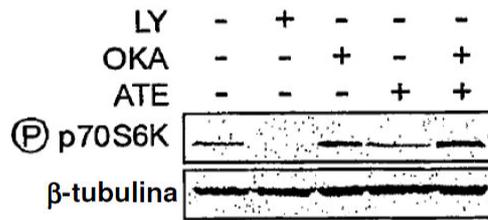


Figura 5

A



B



C

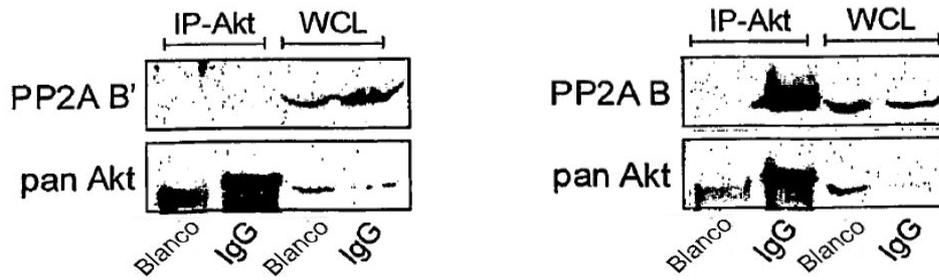


Figura 6

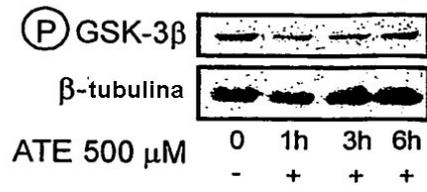


Figura 7

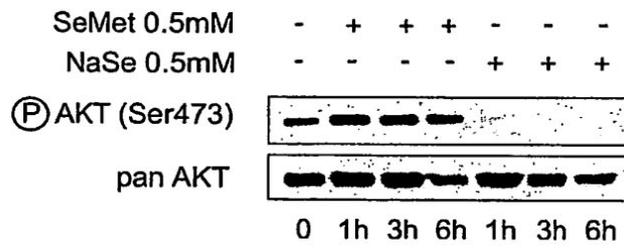


Figura 8

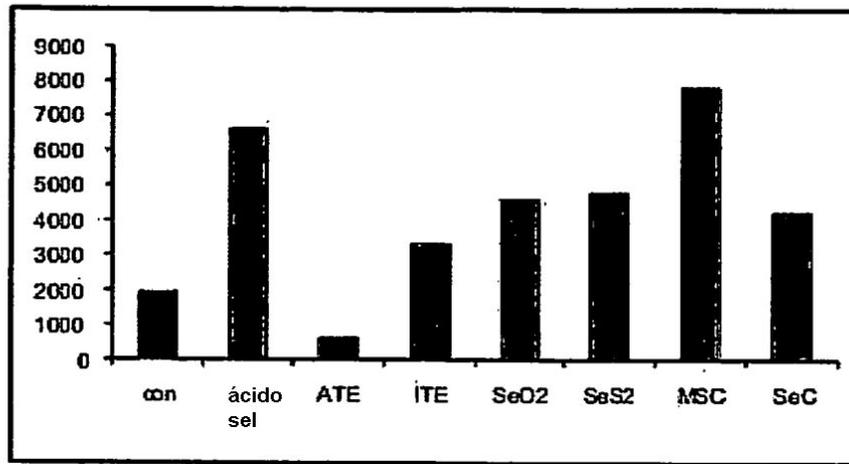


Figura 9

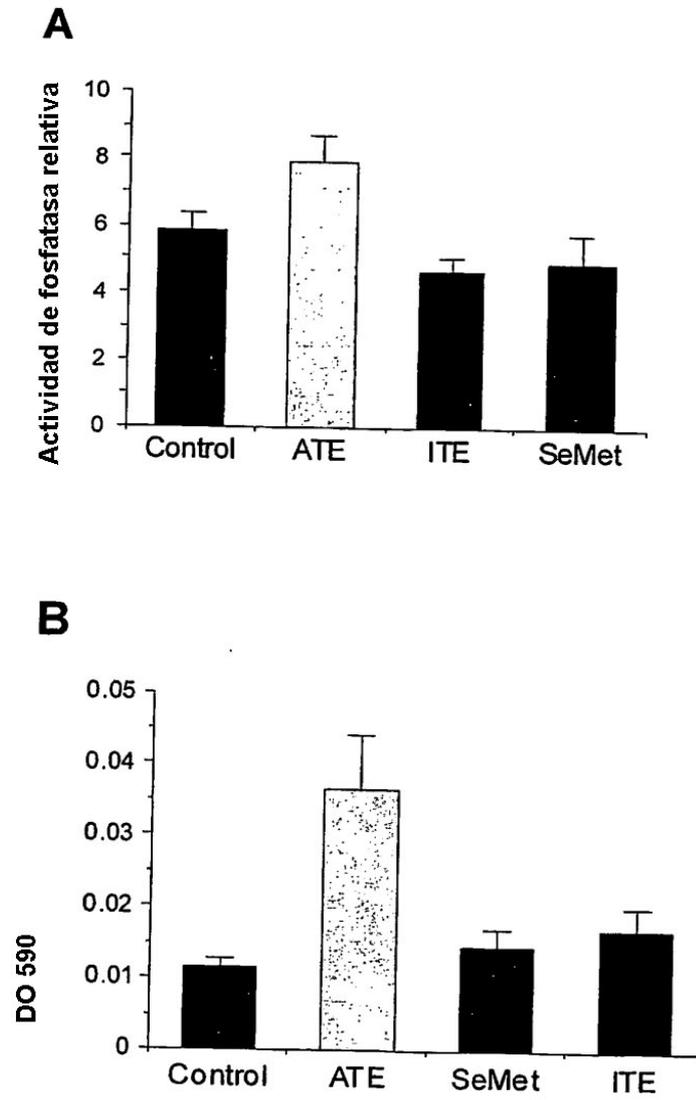


Figura 10

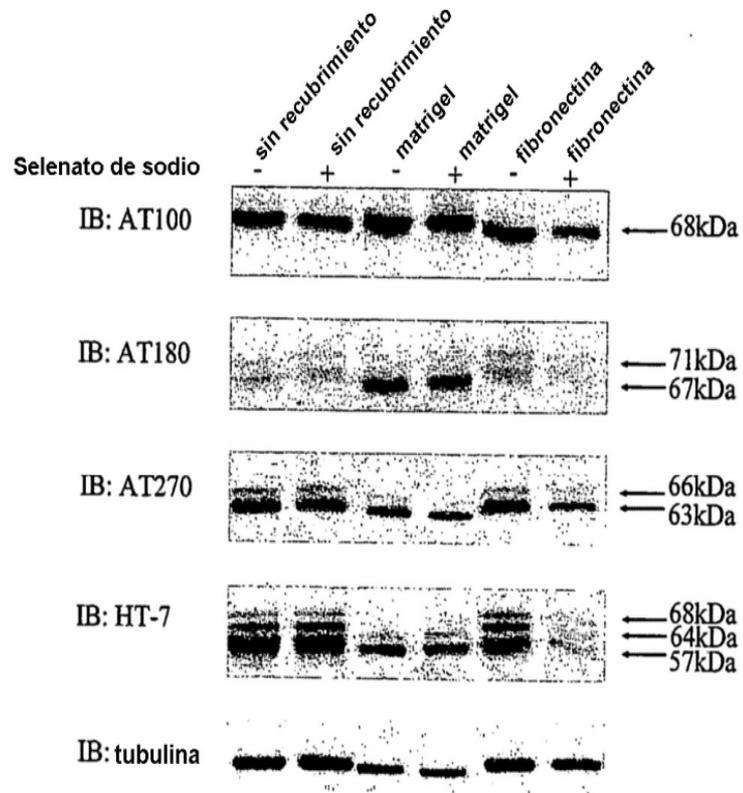


Figura 11

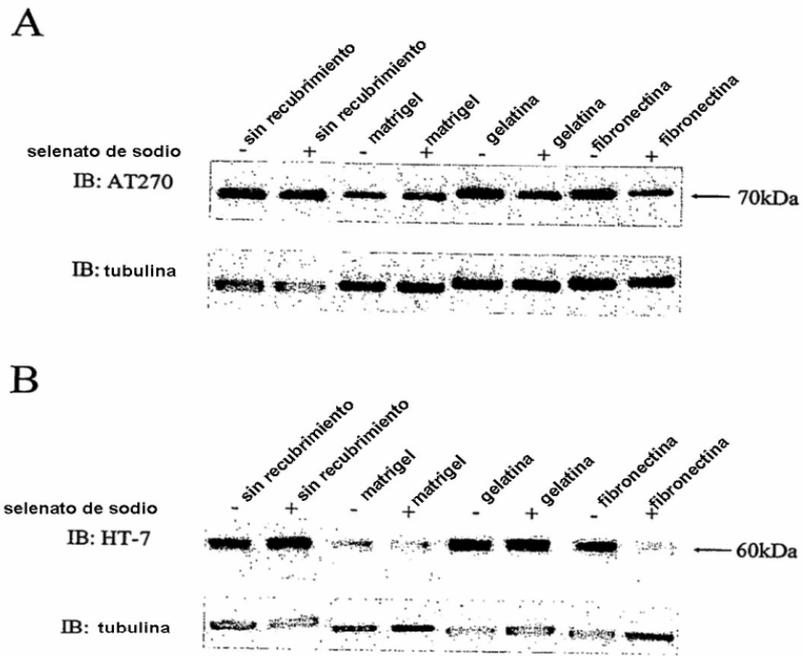


Figura 12

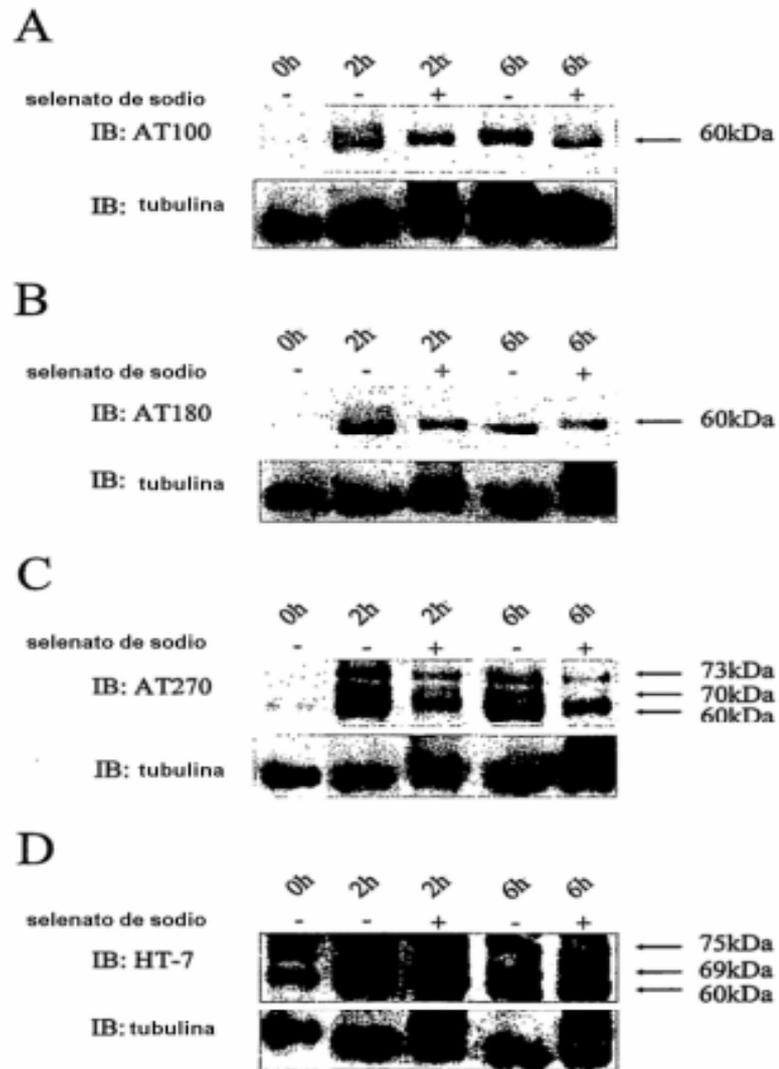


Figura 13

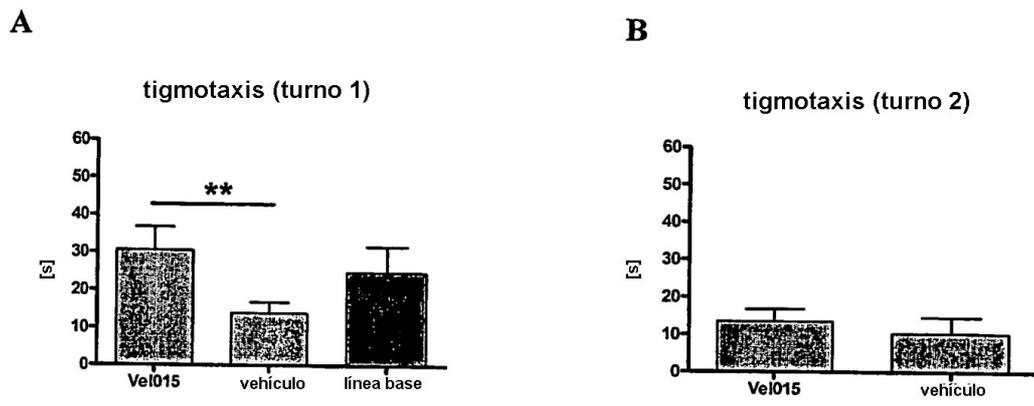
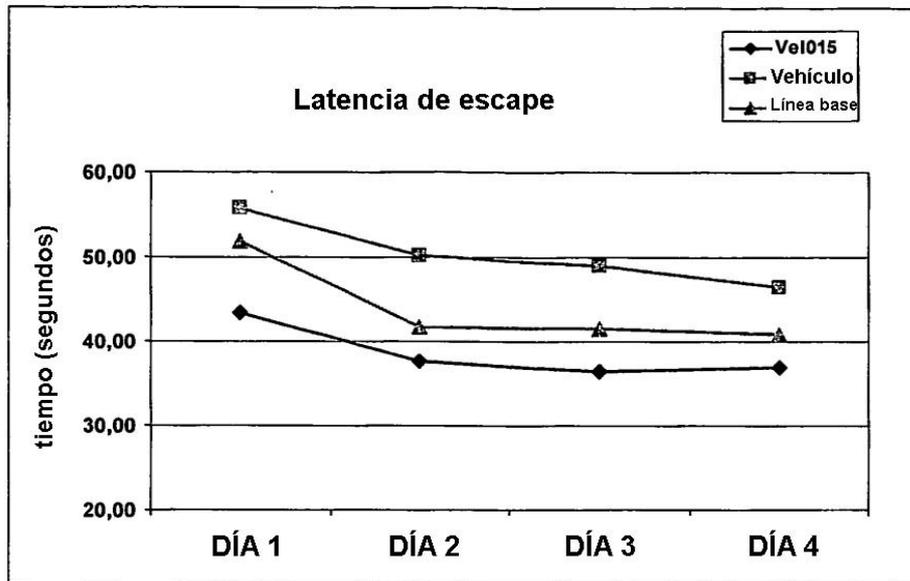


Figura 14

A



B

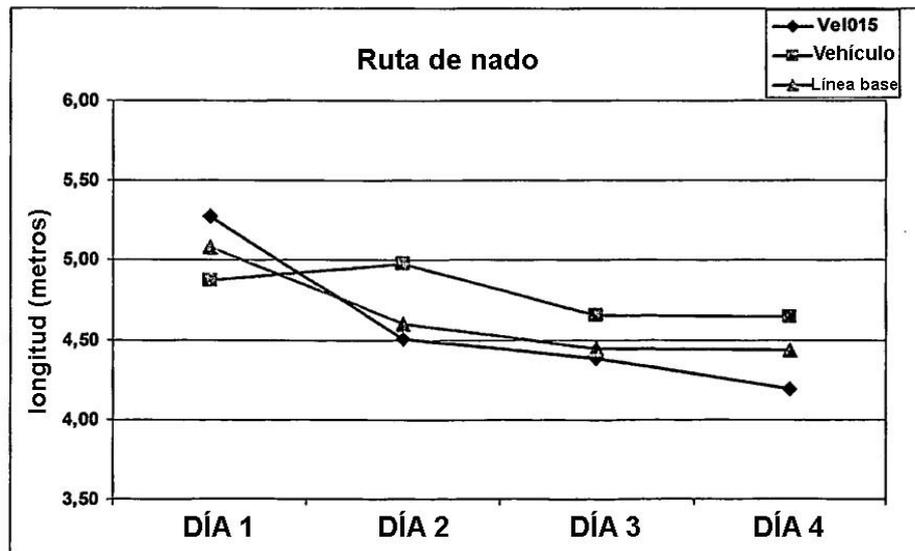
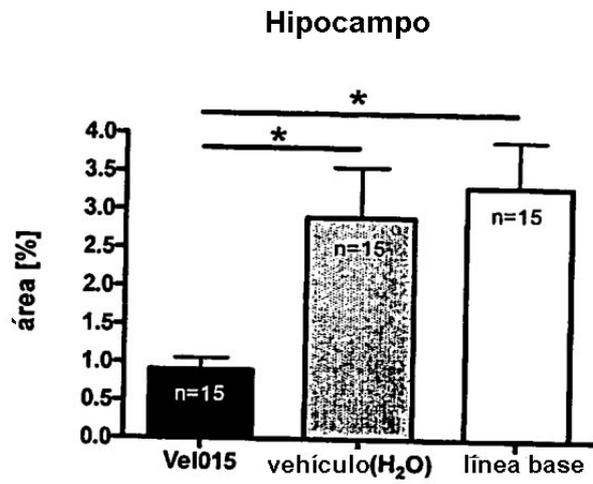


Figura 15

A



B

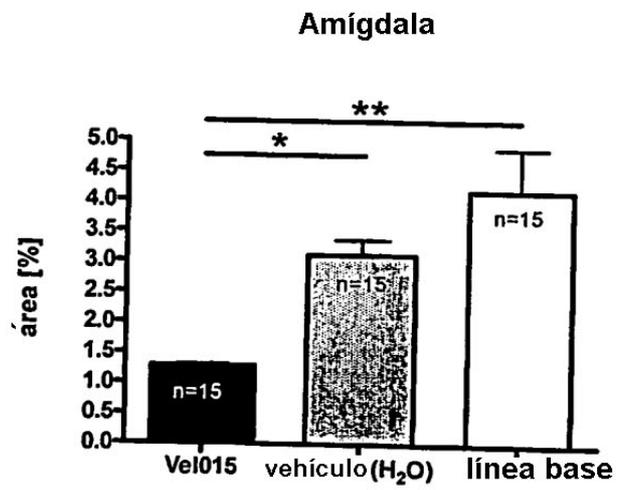
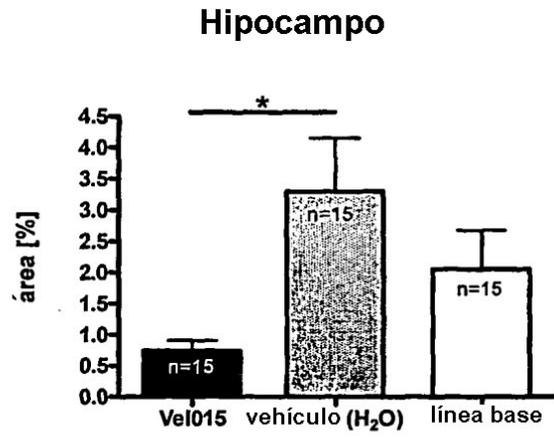


Figura 16

A



B

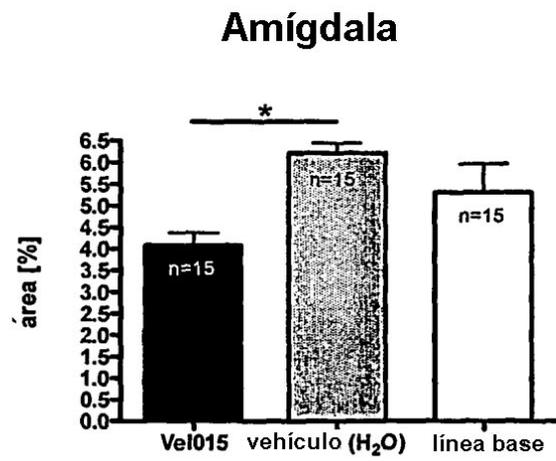


Figura 17