



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

NUEVAS DIANAS FARMACOLOGICAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero 2019

Autor: Javier Hoya Cano
Modalidad: Revisión bibliográfica
Tutor/es: María Salud García Gutiérrez

Índice

0. Resumen.....	3
1. Introducción	4
1.1. Situación actual	4
1.2. Etiopatogenia	4
1.3. Abordaje farmacológico	6
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
4. Resultados.....	11
4.1. Inhibidores de enzimas secretasa.....	11
4.2. Inhibidores de la agregación amiloide.....	11
4.3. Aumento del aclaramiento de amiloide.....	12
4.4. Inhibidores de fosfodiesterasa.....	13
4.5. Fármacos estabilizadores de microtúbulos.....	14
4.6. Inhibidores de la fosforilación de la proteína tau.....	16
4.7. Hipótesis de unión hidrófoba-repulsión electrostática (HyBER).....	17
5. Conclusión	27
6. Referencias.....	29

0. Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que supone la principal causa de demencia en la población anciana de países desarrollados. Actualmente solo existen dos grupos de fármacos para su tratamiento, los antagonistas NMDA o los inhibidores de la acetilcolinesterasa que retrasan la aparición de los síntomas más graves de la enfermedad. Debido a que el mecanismo patológico mediante el cual se desarrolla el Alzheimer no se conoce totalmente y afecta a diversas vías, en los últimos años se han estudiado diferentes dianas mediante las cuales se podría detener el progreso de la enfermedad y poder esclarecer su origen. En este trabajo se exponen los estudios sobre las nuevas dianas farmacológicas descubiertas para el tratamiento del Alzheimer que han demostrado cierta eficacia en los estudios realizados hasta la fecha.



1. Introducción

1.1. Situación actual

La demencia es la principal causa de discapacidad y dependencia entre las personas mayores de 65 años. Se puede manifestar como enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia por cuerpos de Lewys o como demencia frontotemporal. La *enfermedad de Alzheimer* es la forma más común de demencia representando entre el 60%-70% de los casos de esta enfermedad¹.

En Europa la enfermedad de Alzheimer presenta una prevalencia del 4,4% en personas mayores de 65 años. Debido al rápido crecimiento de la población anciana, según las predicciones, en 2050 el número de enfermos ascenderá a 16 millones. Asimismo, se prevé un aumento del 87% de nuevos casos entre los años 2010 y 2050. Un metaanálisis en el que se compararon diferentes estudios sobre la prevalencia de la enfermedad en diferentes rangos de edad en diversos países de Europa dio como resultado que la prevalencia de la enfermedad en mujeres es mayor que en hombres, siendo la prevalencia en mujeres de un 7.13% y un 3.31% en hombres².

Estudio	Rango edad	Casos de EA (n)	Hombres	Mujeres	65-74 años	75-84 años	≥85 años	≤79 años	≥80 años
Manubens et al.	70-91	119 (1.019)	41 (562)	78 (565)	1 (146)	52 (613)	66 (368)	24 (457)	95 (670)
Ott et al.	55-106	339 (7.528)	76 (2.939)	263 (4.589)	24 (2.563)	121 (1.643)	190 (709)	–	–
Prencipe et al.	> 64	50 (968)	21 (418)	27 (550)	7 (544)	32 (359)	11 (65)	–	–
Ferini-Strambi et al.	> 59	27 (673)	7 (254)	20 (419)	–	–	–	11 (573)	16 (100)
Obadia et al.	≥ 70	82 (1.068)	16 (432)	66 (636)	–	–	–	28 (679)	54 (389)
Salamon et al.	≥ 65	128 (4.123)	–	–	–	–	–	–	–
Tsolaki et al.	≥ 70	20 (365)	4 (159)	16 (206)	2 (118)	12 (206)	6 (41)	10 (230)	10 (135)
Tola-Arribas et al.	≥ 65	143 (2.170)	26 (933)	117(1237)	10 (1024)	63 (813)	70 (333)	37(1473)	106 (697)
Metaanálisis		5,05% (4,73-5,39)	3,31% (2,85-3,80)	7,13% (6,56-7,72)	0,97% (0,70-1,28)	7,66% (6,79-8,59)	22,53% (20,20-24,08)	3,18% (2,61-3,81)	14,04% (12,44-15,73)

Tabla 1 Datos poblacionales de la enfermedad de Alzhéimer en Europa (2017).²

1.2. Etiopatogenia

Desde el descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer en 1907 hasta la actualidad se han propuesto varias hipótesis sobre su origen y desarrollo, como la *hipótesis colinérgica*, la *hipótesis inflamatoria* o la *hipótesis β-amiloide* entre otras. Sin embargo, ninguna explica todos los cambios fisiológicos de esta

enfermedad. Actualmente la hipótesis más aceptada es la hipótesis de la cascada amiloide.

La proteína amiloide precursora (APP) es metabolizada por las neuronas, en condiciones normales, por las enzimas α -secretasa y γ -secretasa produciendo metabolitos no tóxicos. En condiciones patológicas es metabolizada por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa dando lugar a metabolitos péptidos β -amiloides que, espontáneamente, se unen formando oligómeros solubles ($A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$), y estos a su vez forman fibrillas insolubles en conformación de lámina beta que se depositaran formando placas seniles (figura 1)³.

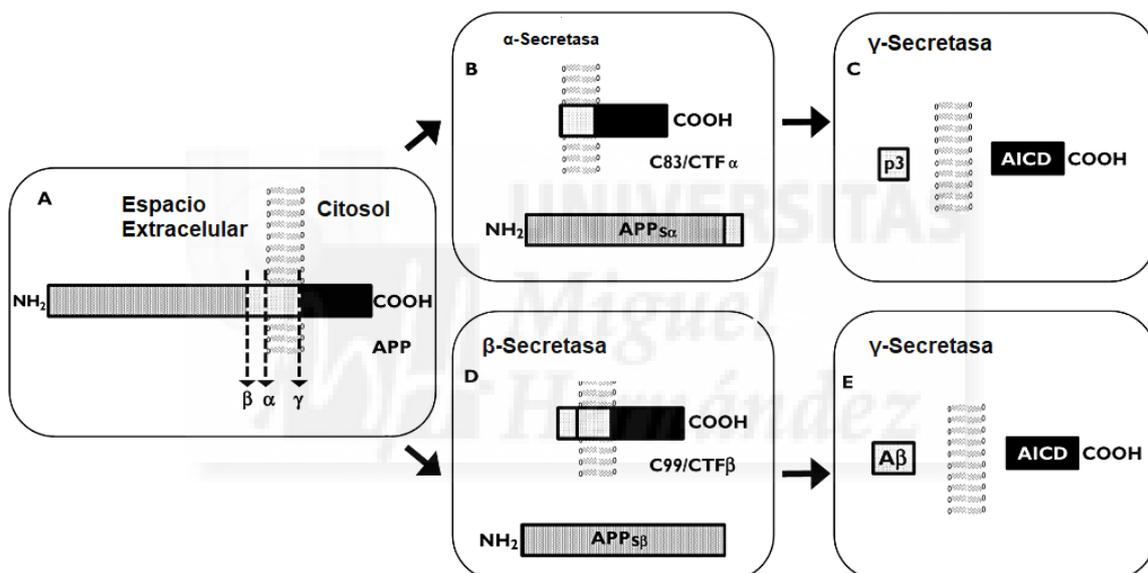


Figura 1 Síntesis de $A\beta_{42}$ por acción de la β -secretasa.³

Cuando se forman los oligómeros β -amiloide 42 ($A\beta_{42}$) en las neuronas se produce la activación de la microglía. Como consecuencia de esta activación los astrocitos producen citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 1- β (IL-1 β) o el interferón γ (IFN- γ) IL-1 β , TNF- α y IFN- γ . Estas citoquinas estimulan a las neuronas y astrocitos cercanos a producir más oligómeros $A\beta_{42}$ aumentando así su concentración y dispersión. Este aumento de oligómeros causa la destrucción de sinapsis, daños cerebrovasculares y la hiperfosforilación de la proteína tau. La hiperfosforilación de esta proteína es la causante de la desestabilización de los

microtúbulos de las neuronas y su consecuente formación de los ovillos neurofibrilares, que junto con los oligómeros causan neurotoxicidad causando así la pérdida cognitiva característica de la enfermedad de Alzheimer⁴. Este tipo de difusión “contagiosa” se pudo observar experimentalmente cuando al introducir células productoras de β -amiloide en cerebros de ratas sanas las neuronas de estas comenzaron a producir también este compuesto⁵.

En enfermos con Alzheimer se ha observado un aumento de la concentración del neurotransmisor óxido nítrico (NO) que se asocia con la disminución de la degradación de péptidos β -amiloides, ya que el NO reduce la función enzimática de la enzima degradante de insulina (IDE), enzima que degrada los oligómeros β -amiloides⁶.

Como consecuencia del aumento de concentración de oligómeros β -amiloides se induce la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato al espacio sináptico donde se unirá a los receptores extrasinápticos de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) de los astrocitos. Estos a su vez producirán la liberación de Ca^{2+} que producirá una cascada de eventos en el resto de neuronas que desembocan en la destrucción de las espinas dendríticas y la sinapsis.

Esta cascada de reacciones provoca alteraciones neuropsicológicas como la pérdida de memoria, afasia, apraxia y agnosia. También es causante de otros síntomas como la alteración del estado de ánimo y de la conducta, pudiendo llegar a producirse comportamientos violentos, dificultades para orientarse, y en fases avanzadas se puede ver afectada la musculatura y la movilidad.

1.3. Abordaje farmacológico

La enfermedad se divide en tres fases o estadios leve, moderado o avanzado según la sintomatología y progresión de la enfermedad⁷. Debido a que no se conoce de manera exacta el origen de la enfermedad solo se pueden tratar los síntomas de esta. Actualmente solamente hay dos grupos de fármacos aprobados para su tratamiento, los *fármacos inhibidores de la*

acetilcolinesterasa (IACE) y antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA).

El déficit colinérgico es uno de los efectos del daño neuronal producido en esta patología, y dado que el sistema colinérgico es el principal mediador en el hipocampo y en la corteza cerebral, las zonas del cerebro encargadas de la memoria y aprendizaje, este déficit colinérgico es una de las causantes de los síntomas característicos del alzhéimer. Los IACE aumentan el tiempo que la acetilcolina actúa sobre los receptores colinérgicos (nicotínicos y muscarínicos) al inhibir las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa encargadas de degradar dicho neurotransmisor. Se ha demostrado que estos fármacos mejoran el estatus cognitivo, la disfunción y los síntomas conductuales, principalmente la agitación, la apatía y la psicosis.⁸

Dentro de este grupo, sólo están aprobados 3 fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: donepezilo, rivastigmina y galantamina, con algunas diferencias entre ellos. El *donepezilo* es un inhibidor de la acetilcolinesterasa de naturaleza piperidínica que se caracteriza por inhibir la acetilcolinesterasa de manera reversible y no competitiva. Presenta una mayor afinidad por esta que por la butirilcolinesterasa. Además, presenta mayor afinidad por la acetilcolinesterasa cerebral que por la periférica, siendo la inhibición de esta última la responsable de la aparición de la mayor parte de sus efectos secundarios. Los efectos del donepezilo empiezan a observarse a partir de la tercera semana de tratamiento. Pero se ha observado que al retirar el tratamiento con este fármaco el paciente vuelve al estado inicial sin presentar ninguna mejoría.

La *rivastigmina* está indicada también en Alzheimer leve a moderado. Es un inhibidor pseudoreversible de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, que presenta acción selectiva en el hipocampo y el córtex. Presenta mayor actividad inhibitoria en el sistema nervioso central que el periférico.

La *galantamina* es el único fármaco de este tipo indicado para el Alzheimer severo. Es un inhibidor selectivo, reversible y competitivo de la acetilcolinesterasa. Además mejora la actividad de la acetilcolina sobre los receptores nicotínicos mediante regulación alostérica sobre estos receptores.⁹

La eficacia de los IACE es similar pero producen una meseta en sus efectos a los 6-12 meses de tratamiento.¹⁰

El otro grupo de fármacos lo constituyen *los antagonistas del receptor NMDA* que actúan modulando la actividad glutamatérgica implicada en los procesos de aprendizaje y memoria. Además, protege de la neurotoxicidad producida por el aumento de la actividad glutamatérgica. La *memantina* es un antagonista del receptor NMDA no competitivo con afinidad moderada y dependiente de voltaje. Este fármaco modula los efectos patológicos que provoca la alta concentración de glutamato que puede desembocar en la disfunción neuronal. La memantina reduce así la excitotoxicidad inducida por los receptores NMDA, pero permite la activación de los receptores para su actividad fisiológica normal.¹¹

Dado que no existe tratamiento farmacológico que detenga o trate directamente el origen de la enfermedad y, los datos epidemiológicos prevén un aumento de su prevalencia en los próximos años, se hace necesario estudiar nuevas dianas farmacológicas que puedan mejorar el pronóstico de esta enfermedad. Actualmente la investigación se ha centrado, entre otras, en dianas relacionadas con la inhibición de diversos procesos que afectan a la formación y concentración de β -amiloide, como por ejemplo aumentando su aclaramiento o disminuyendo su transporte. En este trabajo fin de Grado se recogen los principales resultados hallados al respecto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo es realizar una búsqueda bibliográfica sobre nuevas dianas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que actúen sobre el origen de la enfermedad o frenen su avance ya que el arsenal terapéutico actual para afrontar esta enfermedad presenta reducida eficacia.

2.2 Objetivos secundarios

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre las principales dianas que afectan directamente a la formación de β -amiloides como sería la inhibición de la β -secretasa, la inhibición de la formación de oligómeros, actuando directamente en el proceso de agregación o promoviendo la eliminación de $A\beta_{42}$, impidiendo que los β -amiloide se plieguen en su conformación secundaria o inhibiendo la fosforilación de la proteína tau.

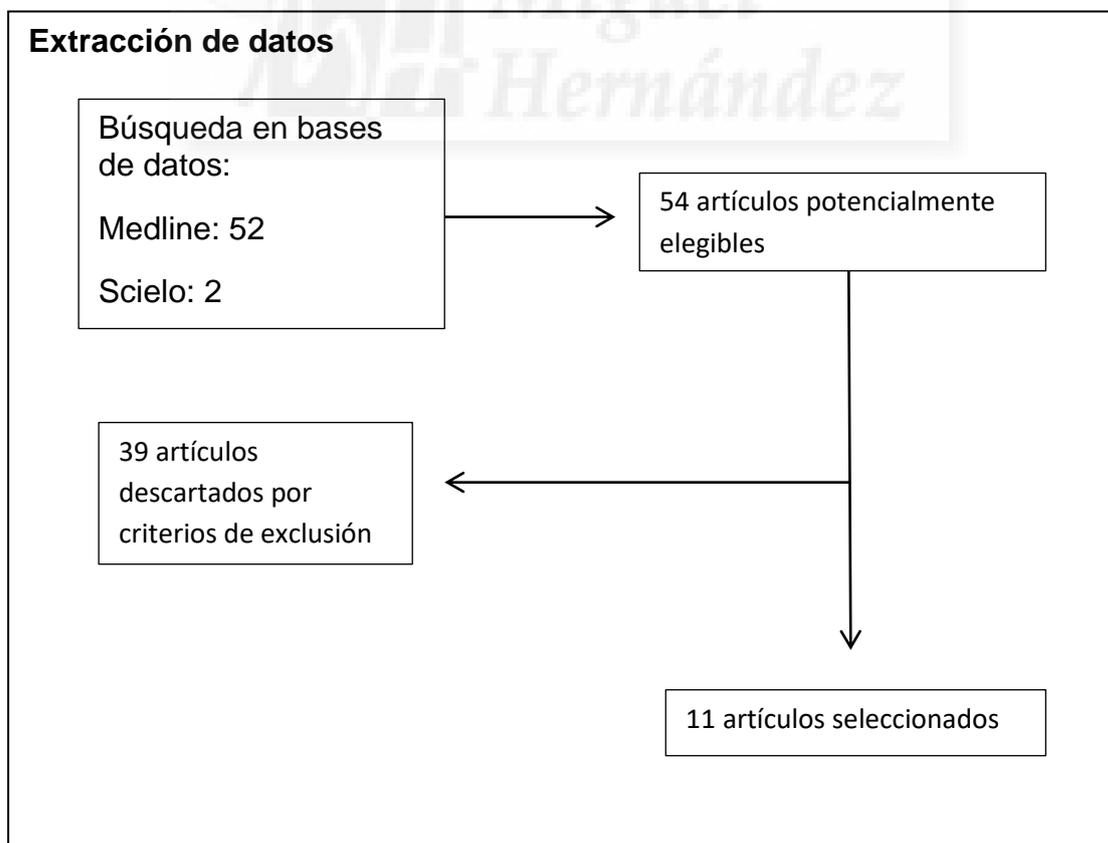
2. Realizar una revisión bibliográfica sobre otras dianas que previenen de la toxicidad producida por los β -amiloide como sería la inhibición de las fosfodiesterasa o la estabilización de los microtúbulos.

3. Materiales y métodos

Para el desarrollo este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica para la que se han utilizado la base de datos como Medline, gogle academic o Scielo.

Se efectuó una búsqueda sencilla usando palabras claves, el uso de descriptores MeSH y el uso de modificadores de búsqueda AND y OR para recoger y condensar la información necesaria para realizar el trabajo. Las palabras clave utilizadas fueron las siguientes: “Alzheimer disease”, “dementia”, “therapy” y “Amyloid beta-peptides”.

Se incluyeron en la búsqueda aquellos artículos que trataran tanto sobre nuevos fármacos sintetizados para su uso contra el Alzhéimer como fármacos ya comercializados que están siendo estudiados para su uso en el Alzhéimer. También se incluyeron aquellos que estuvieran realizados en humanos y animales. Se excluyeron todos aquellos artículos que trataran sobre la fisiopatología de la enfermedad o de la farmacología usada actualmente, así como los artículos publicados antes del año 2004.



4. Resultados

A continuación, se desarrollan los principales resultados de la búsqueda anteriormente descrita donde se explican los mecanismos mediante los cuales se actúa sobre las mencionadas posibles nuevas dianas, que efectos tendría actuar sobre ellas y posibles fármacos que pueden afectar a estas.

4.1. *Inhibidores de enzimas secretasa.*

Debido a la gran importancia de las secretasas en la formación de β -amiloide se ha investigado su uso como diana. Se ha estudiado la inhibición de β y γ -secretasas pero esta última se ha descartado debido a que también tiene un papel en la regulación de la homeostasis celular, por lo que su inhibición causa toxicidad. Debido a la similitud de esta secretasa con otras enzimas como la renina es un problema a la hora de encontrar fármacos selectivos de esta enzima. Se ha observado que el fármaco OM99-2, aún en estudios preclínicos, presenta resultados positivos frente a la inhibición de esta proteasa.¹²

4.2. *Inhibidores de la agregación amiloide.*

Otra diana estudiada es la agregación de los oligómeros solubles de β -amiloide en fibrillas insolubles reduciendo así la formación de placas seniles. Actualmente hay un fármaco, el *tramiprosato*, en ensayos clínicos de fase III.¹³ Estos ensayos se realizaron a un grupo de 790 pacientes diagnosticados de alzhéimer que llevaban en tratamiento con inhibidores de colinesterasa y memantina durante un mes o más antes de comenzar el ensayo. A estos pacientes se les administró de forma aleatoria y mediante doble ciego dosis de 100 mg y 150 mg de tramiprosato por vía oral y placebo dos veces al día durante 78 semanas. Este fármaco se une a los β -amiloide solubles evitando su agregación.

In vitro el fármaco presenta efectos neuroprotectores frente a la neurotoxicidad producida por los β -amiloide a corto plazo y largo plazo, debido a la activación de los receptores GABA_A contrarrestando así los efectos de la activación de los receptores de NMDA. Por otra parte, en los ensayos comentados anteriormente se ha observado una disminución de los niveles de oligómeros A β ₄₂ en el líquido cefalorraquídeo.¹³

4.3. Aumento del aclaramiento de amiloide.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto el importante papel que desempeñan diversas proteasas en el aclaramiento y degradación de β -amiloide en el sistema nervioso central como la enzima degradante de insulina (*IDE*), *plasmina* o la *neprilisina*, aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual se produce este proceso.¹⁴

Cabe destacar el papel de la plasmina ya que se encuentra en todo el sistema nervioso central presentando una mayor expresión en las neuronas. La plasmina se genera a partir del plasminógeno mediante la acción del activador tisular del plasminógeno (t-PA) (Figura 2). Esta enzima es activada por los oligómeros $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ ya que se ha demostrado que son sustratos de esta.¹⁵

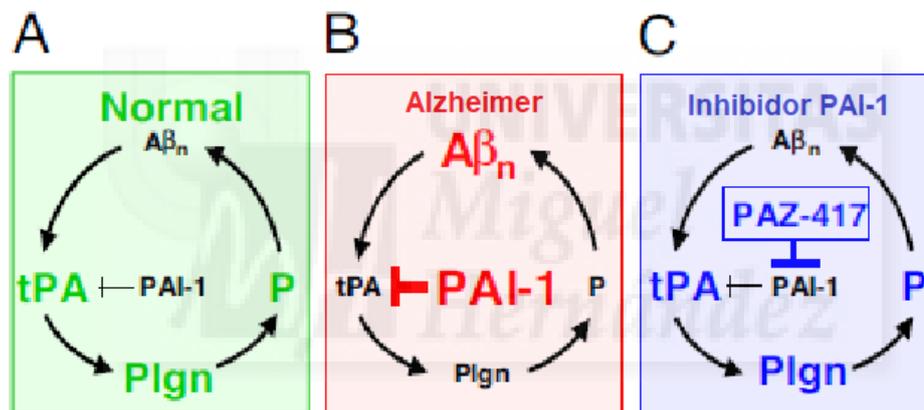


Figura 2 Síntesis de la plasmina. Plgn: Plasminógeno; P: Plasmina.¹⁶

Esto debería producir un aumento de la síntesis de plasmina pero en los pacientes con enfermedad de Alzheimer se observa una baja actividad de esta tanto en el cerebro como en el suero. Este hecho sugiere que la cascada de activación del t-PA está inhibida en la enfermedad de Alzheimer. Existe un inhibidor de esta cascada, el *inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1* (*PAI-1*) que se une irreversiblemente a la t-PA inhibiendo así la formación de plasmina. Esta proteína se encuentra en niveles elevados cerca de los depósitos amiloides del cerebro, tal y como se ha observado en cerebros de ratones ancianos y en ratones transgénicos Tg2576, ratones modificados genéticamente para acumular elevados niveles de β -amiloide. La plasmina

también se ha encontrado en concentraciones elevadas en el plasma y en el cerebro de pacientes con Alzheimer.

Actualmente se está desarrollando un fármaco inhibidor de la PAI-1 en fase II, el PAZ-417, que ha demostrado ser un potente inhibidor de PAI-1 aumentando la formación de plasmina, y como se ha observado en modelos ratones Tg2576 este fármaco reduce los niveles de β -amiloide tanto en el cerebro como en el plasma además de revertir el déficit cognitivo.¹⁶

Para ello se administró a una población de ratones Tg2576 diferentes dosis de PAZ-417 (3, 10, 30 y 100 mg/kg) y a las 6 horas se midió la concentración β -amiloide en plasma dando los resultados mostrados en la *Figura 3*.

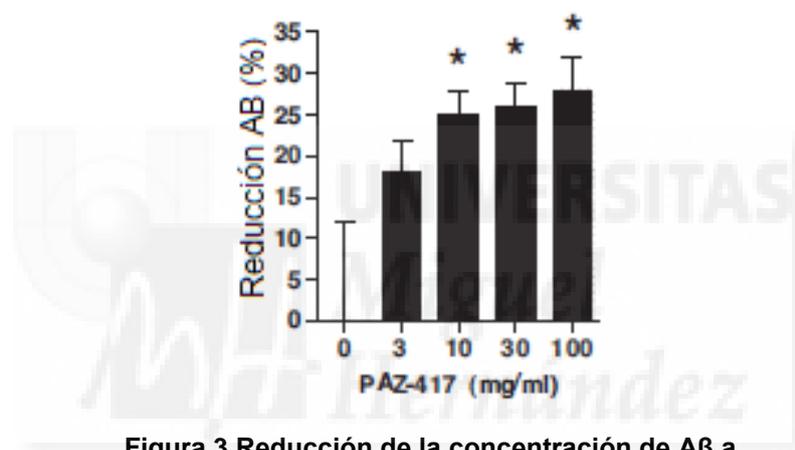


Figura 3 Reducción de la concentración de A β a distintas dosis de PAZ-417.¹⁶

A partir de estos datos se demostró que la dosis mínima efectiva es la de 10 mg/kg que redujo los niveles de A β en un 25%. Las dosis de 30 y 100 mg/kg dieron resultados comparables a la de 10 mg/kg. Pero la dosis de 3 mg/kg se desestimó ya que no presentaba diferencias significativas respecto a los resultados de los ratones no tratados. Esto demuestra que el PAZ-417 es capaz de aumentar el aclaramiento de A β de las neuronas lo que se podría traducir en una disminución de su toxicidad¹⁶.

4.4. Inhibidores de fosfodiesterasa.

Los oligómeros de β -amiloide modifican diferentes procesos intracelulares que finalmente producen toxicidad celular, por lo que es interesante el estudio de fármacos que puedan interrumpir estas vías. Una de estas vías es la vía

AMPC/PKA/CREB (AMPC/ proteína kinasa cAMP dependiente/ elemento de respuesta a AMPC) cuya inhibición produce una deficiencia de la potenciación a largo plazo (LTP, de sus siglas en inglés *long term potentiation*), uno de los principales mecanismos que subyacen a la plasticidad sináptica y, por lo tanto, al aprendizaje y la memoria. El *rolipram*, fármaco inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 4, ha demostrado ser capaz de restaurar la vía cAMP/PKA/CREB al aumentar los niveles de cAMP.

Para demostrar la efectividad del rolipram se realizó un ensayo en ratones transgénicos APP/PS1 modelo animal de los depósitos amiloides que reproducen los síntomas de los pacientes con Alzheimer. Estos ratones están modificados genéticamente para formar APP y tienen inhibida la neprilisina, enzima encargada de la degradación de angotensina II. En el estudio de cultivos del hipocampo de estos ratones se observó que el rolipram contrarresta los efectos inhibitorios de β -amiloide sobre la plasticidad sináptica, además de retrasar significativamente el deterioro cognitivo producido por los β -amiloide. También se observó que el rolipram no solo aumenta la concentración de AMPC sino que además es capaz de revertir la inhibición de PKA y CREB.¹⁷

Además, se ha observado que la inhibición de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) tiene efecto en la plasticidad sináptica y en la memoria. Para ello se llevó a cabo un ensayo con sildenafil en ratones APP/PS1, fármaco inhibidor de PDE5 empleado para el tratamiento de la disfunción eréctil en humanos. Se observó que el sildenafil restablece la fosforilación de CREB inhibida por los β -amiloide contrarrestando así los efectos negativos en la plasticidad y la memoria producidos por la acumulación de β -amiloide. También se observó que reduce los niveles de β -amiloide dentro de las células, reforzando la teoría de que el CREB regula la transcripción de genes que controlan la formación y degradación de β -amiloide.¹⁸

4.5. Fármacos estabilizadores de microtúbulos.

Otra diana interesante para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es la proteína tau. Esta proteína es expresada en el cerebro durante la edad adulta y en condiciones normales es la encargada de mantener y estabilizar la

red de microtúbulos esencial para el transporte axonal, pero cuando la actividad de la proteína tau se ve modificada esta puede causar diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer donde se observan inclusiones de tau en forma de ovillos neurofibrilares como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau. Los taxanos se unen de forma reversible a la subunidad β de los microtúbulos favoreciendo la polimerización de microtúbulos estables, esto podría contrarrestar la pérdida de función de la proteína en la enfermedad de Alzheimer. Debido a esto se ha estudiado el posible efecto que podría tener el *paclitaxel* en el tratamiento del Alzheimer.

Para ello se emplearon ratones modificados genéticamente para que sobreexpresaran una isoforma de la proteína tau, modelo animal de enfermedades neurodegenerativas. Como control se usaron ratones no modificados genéticamente de la misma camada. Se trataron ratones transgénicos con dosis diferentes de paclitaxel (10 mg/m^2 y 25 mg/m^2) semanalmente por vía intraperitoneal durante 12 meses y se compararon con ratones transgénicos sin tratar y ratones sanos de la misma camada sin la modificación genética, evaluándose diversos factores como el transporte axonal rápido, el número de microtúbulos, los niveles de tau o la función motora.

Se observó que los ratones tratados presentaban un transporte axonal mejorado frente a los ratones transgénicos sin tratar. En cuanto al número de microtúbulos (MT), los ratones tratados presentaban mayor concentración de MT frente a los ratones sanos y presentaban una función motora igual a los ratones sanos. Sin embargo, los niveles de tau no se vieron modificados en los ratones tratados frente a los ratones sin tratar. Esto sugiere que el paclitaxel protege frente a diferentes problemas originados por la enfermedad de Alzheimer, sin afectar a los niveles de tau.

Esto supone el posible descubrimiento de una nueva diana farmacológica para contrarrestar los procesos neurodegenerativos producidos por el Alzheimer.¹⁹

4.6. Inhibidores de la fosforilación de la proteína tau.

La enzima *glucógena sintasa cinasa-3 β* (GSK-3 β) desempeñaría un papel importante en la fosforilación de la proteína tau. En cultivos de neuronas humanas del hipocampo expuestas a β -amiloide se ha observado una activación de la GSK-3 β con la consecuente hiperfosforilación y muerte celular.²⁰ También se han detectado niveles elevados de esta enzima en el cerebro de pacientes con Alzheimer y se ha detectado en ovillos neurofibrilares.

En este sentido, el litio es un inhibidor de la GSK-3 β que podría ser útil para evitar la neurodegeneración producida en la enfermedad de Alzheimer. En diferentes estudios se ha observado que el litio tiene diferentes efectos sobre esta enfermedad ya que inhibe la hiperfosforilación de la proteína tau, y evita la muerte celular neuronal inducida por β -amiloide.²¹

Para comprobar que el litio presenta estas propiedades se realizó un estudio en ratones modificados genéticamente para que presenten una sobreexpresión de la enzima GSK-3 β . Los síntomas de la taupatía inducida en estos ratones se empiezan a observar a los 12 meses de edad. Estos ratones de 12 meses de edad fueron alimentados con pienso conteniendo litio de 1.7g/kg por vía oral durante 7 meses y medio para comprobar el efecto preventivo del litio (grupo 1). Para comprobar si el litio presentaba también efectos de reversión en la hiperfosforilación de tau se alimentó a otro grupo de estos ratones de 18 meses de edad con piensos con dosis de litio de 1.7g/kg durante 4 semanas y luego con 2.55 g/kg (grupo 2). El grupo control fue un grupo de los mismos ratones alimentados con el mismo pienso pero sin litio.

En cuanto al efecto preventivo del litio se observó que las neuronas de hipocampo de los ratones del grupo 1 no presentaban acumulación de proteína tau hiperfosforilada al igual que las neuronas del grupo control. Por otro lado, en el grupo 2 se pudo observar que el litio revertía parcialmente la taupatía ya que al comparar las neuronas del hipocampo de ratones del grupo 2 y del grupo control se observó una reducción del 25% de las inclusiones de proteína tau hiperfosforilada.

4.7. Hipótesis de unión hidrófoba-repulsión electrostática (HyBER)

Recientemente se ha observado que la albúmina sérica humana y bovina produce la inhibición de la agregación de $A\beta_{42}$. Al sustituir parte de los grupos amino de esta proteína por grupos carboxilo el efecto inhibitorio aumentó. Para explicar esta inhibición se elaboró la hipótesis de la unión hidrofóbica-repulsión electrostática (HyBER) que propone que los péptidos de β -amiloides se unen a las zonas hidrofóbicas de las proteínas por el carbono terminal o por sus zonas hidrofóbicas centrales (unión hidrófoba). Simultáneamente, debido a que el péptido unido, el β -amiloides, está cargado negativamente, sufre la repulsión electrostática de los grupos carboxilo añadidos a la albumina. Estas fuerzas opuestas hacen que el β -amiloides se estire formando una conformación distinta a la de lámina- β . Por lo que los β -amiloides ya no se agregarán en esta conformación y por lo tanto ya no generarán toxicidad.

Debido a que las diferentes cargas de la albumina y sus zonas hidrofóbicas están distribuidas de manera muy heterogénea, los estudios con estas proteínas no son suficientes para comprobar esta hipótesis. Para demostrar esta hipótesis se llevó a cabo un estudio con poliamidoaminas terminadas en grupo carboxilo de quinta generación (PAMC). Esta molécula es un dendrímero biocompatible que en su superficie solo presenta grupos carboxilo. Como los PAMC no presentan zonas hidrófobas en su superficie para que se puedan unir los β -amiloides, se introdujeron grupos fenilo en su superficie mediante su reacción con feniletilamina. Con esta reacción (figura 4) se consiguió la síntesis de PAMC derivados de fenilo (PAMP) con una superficie hidrofóbica con carga negativa.^{22 23}

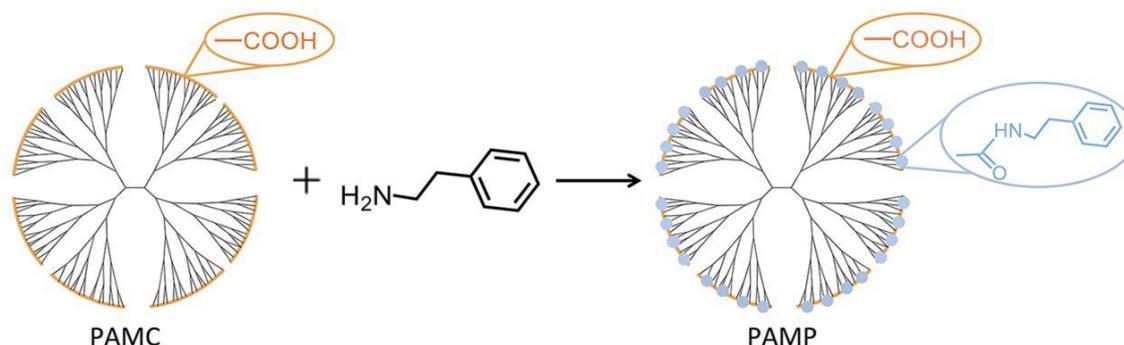


Figura 4 Síntesis de PAMP.²²

Se caracterizaron 4 PAMP con diferente grado de sustitución que difieren en el número de grupos fenilo en su superficie y se denominaron PAMP 1-4 en orden creciente de sustitución siendo el de menor grado el 1 y el de mayor el 4. Se realizaron distintas pruebas para comprobar si se cumple la hipótesis HyBER, si el grado de sustitución afectaba al resultado y comprobar que esta nueva molécula es biocompatible.

Para comprobar que los PAMP pueden inhibir la acción del $A\beta_{42}$ se realizó un ensayo de fluorescencia con tioflavina T (figura 5). La tioflavina T tiñe las fibrillas de $A\beta_{42}$ en forma de lámina- β . La prueba se realizó poniendo en contacto los PAMP a diferentes concentraciones y el $A\beta_{42}$ a una concentración de 25 μ M. Esto permite observar su acción según la fluorescencia observada. A menor fluorescencia observada mayor será el efecto inhibitorio. También se midió la acción de PAMC para comparar su actividad con la de los PAMP.

El PAMC no presentó actividad frente a la fibrilación de $A\beta_{42}$, solo cuando la concentración de PAMC era 25 veces mayor a la de $A\beta_{42}$ se observaba una actividad apreciable.

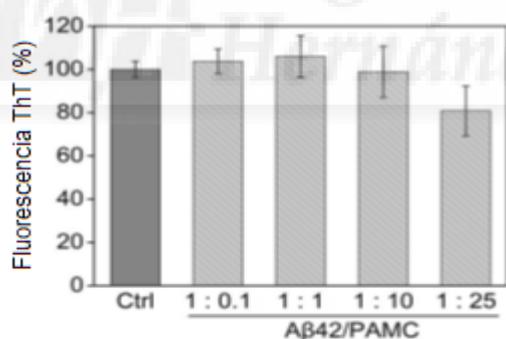


Figura 5 Resultados actividad inhibitoria de PAMC.²²

En cuanto a los PAMP se observó que disminuyen la agregación de $A\beta_{42}$ en conformación de lámina- β de manera dosis dependiente (figura 6). Los efectos se empezaron a observar a concentraciones bajas de 1:0.01 $A\beta_{42}$ /PAMP, y el efecto fue máximo a concentraciones de 1:1 donde las PAMP3 y 4 presentaron una reducción del 70% de la actividad de $A\beta_{42}$.^{24,22.}

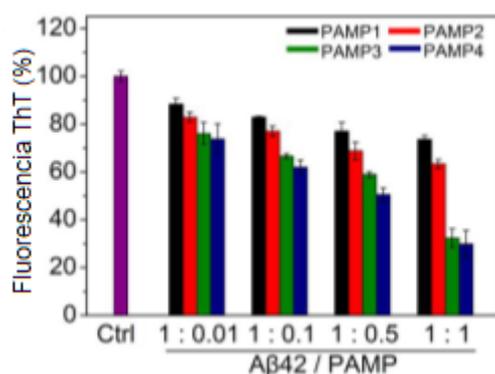


Figura 6 Resultados actividad inhibitoria de PAMC.²²

También se midió la actividad de feniletilamina, que solo posee grupos hidrófobos, frente $A\beta_{42}$ pero la formación de láminas- β no se vio afectada. Estos resultados indican que los PAMP reducen los niveles de $A\beta_{42}$ en conformación lámina- β y podría confirmar la hipótesis HyBER, ya que fue necesaria la combinación de las dos fuerzas (hidrofobia y repulsión electrostática) presentes en los PAMP para observar los efectos inhibitorios sobre $A\beta_{42}$. Estas fuerzas por separado, PAMC que no presenta zonas hidrófobas, y la feniletilamina, que no causa repulsión electrostática, no presentaron actividad por si solos.

Otra prueba que se realizó para demostrar la eficacia de los PAMP fue la observación directa de la morfología de los agregados de $A\beta_{42}$ mediante el microscopio de fuerza atómica. Primero se incubó una solución de $A\beta_{42}$ (25 μ M), sin ningún inhibidor, durante 48 horas para obtener una imagen control. En esta imagen se observó una gran cantidad de agregados en forma de fibras cubriendo toda la muestra. Cuando se incubó la solución de $A\beta_{42}$ con PAMC durante 48 horas no se observó ningún cambio de morfología de los agregados (figura 7). Solo cuando se aumentaba la concentración de PAMC, a 625 μ M, se observó una ligera disminución de la cantidad de fibrillas de $A\beta_{42}$. Estos resultados concuerdan con los resultados del ensayo de fluorescencia con tioflavina T, ya que en ninguna de las dos pruebas el PAMC ha demostrado inhibir la formación de láminas- β de forma significativa.

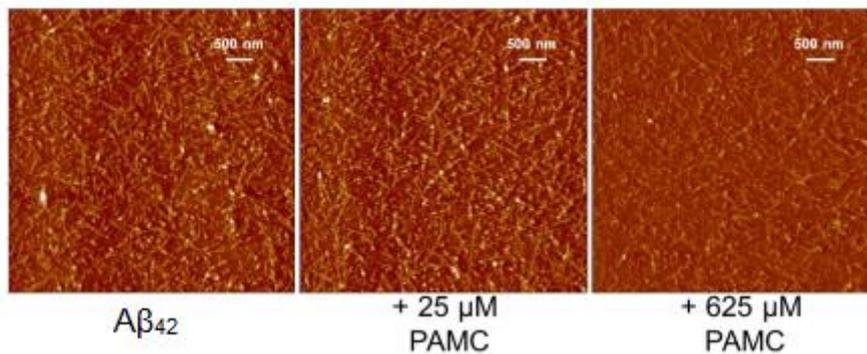


Figura 7 Muestras de PAMC+A β vistas al microscopio. ²²

Cuando se incubaron los diferentes PAMP a concentraciones de 2.5 y 25 μ M, con A β ₄₂ durante 48 horas se observó una clara disminución de agregados incluso con bajas concentraciones de PAMP, 2.5 μ M (figura 8). Los 4 PAMP demostraron tener efecto inhibitorio frente a la formación de fibrillas de A β ₄₂. Cuando se aumentó la concentración a 25 μ M en las muestras incubadas con PAMP3 y PAMP4 casi no se aprecian fibrillas solo agregados de forma irregular. Esto permitió clasificar los PAMP según su actividad inhibitoria siendo las más eficaces, el PAMP4 y PAMP3, que presentan una actividad similar, de actividad intermedia el PAMP2 y la de menor actividad el PAMP1. Esto coinciden también con los resultados del ensayo de fluorescencia ya que también se observa que los diferentes PAMP presentan diferentes niveles de inhibición y que a mayor concentración de PAMP mayor efecto inhibitorio se observa en las muestras.

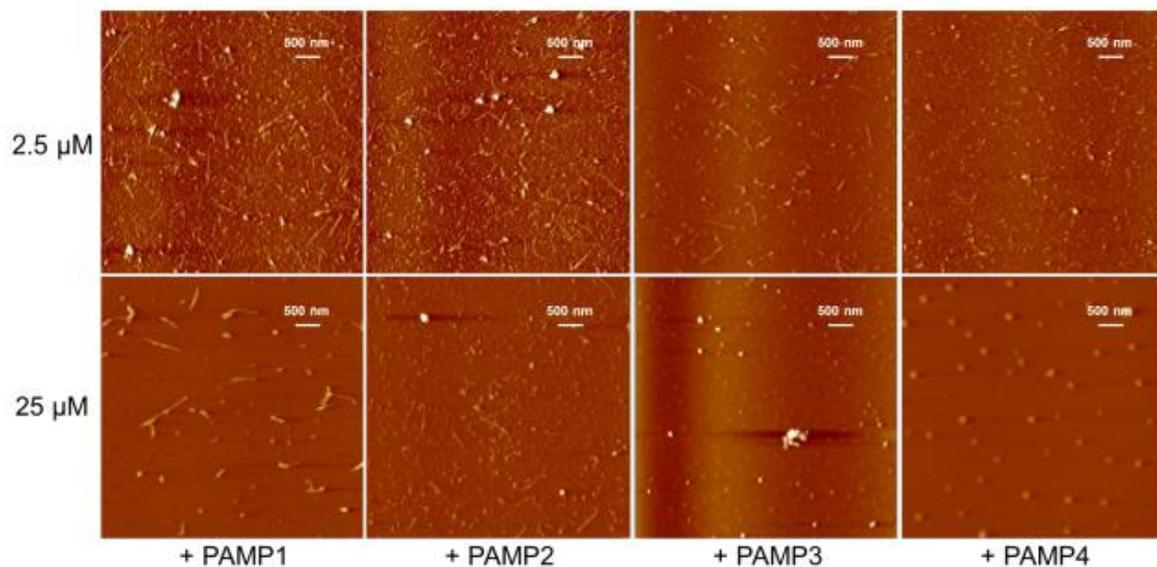


Figura 8 Muestras de PAMP+A β a distintas concentraciones vistas al microscopio²²

Para determinar cómo actúa el PAMC y los PAMP durante la agregación de A β_{42} se realizó una espectroscopía de dicroísmo circular del A β_{42} . Este tipo de espectroscopía se usa para observar el cambio de configuración de un estado fundamental a un estado excitado, mediante la absorción de radiación electromagnética polarizada. Para ello se prepararon muestras de una solución de A β_{42} a una concentración de 25 μ M, y se puso en contacto con los diferentes dendrímeros.

Primero se realizó con el péptido solo (muestra control) y se observó que la estructura secundaria inicial del A β_{42} es de hélice- α con un pico negativo de 200 nm (figura 9A), y tras una incubación de 48 horas aparece un pico positivo en 195 nm y otro negativo en 217 nm (figura 9B). Esta transición del pico positivo al negativo representa la formación de la estructura secundaria lámina- β . Cuando se incubó el péptido con el PAMC no se observó ningún efecto apreciable en la estructura secundaria.

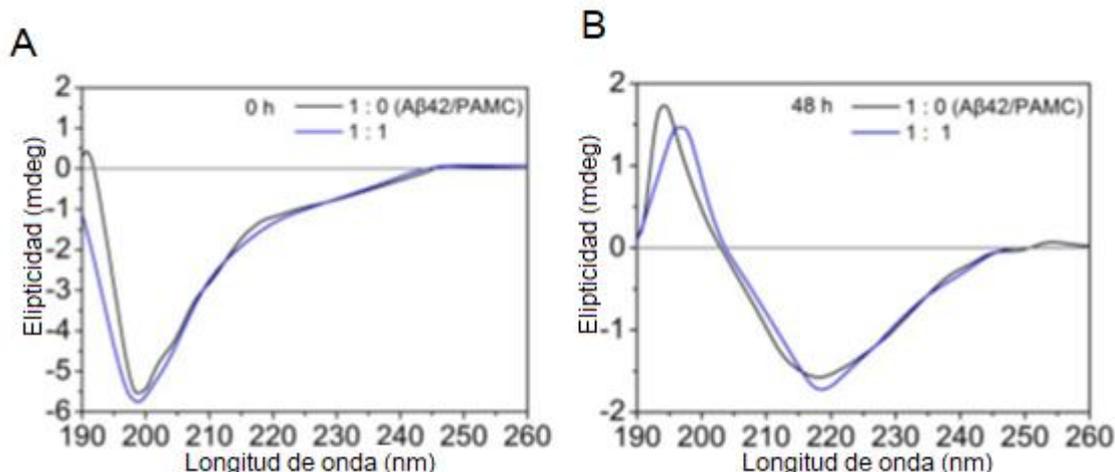


Figura 9 Resultados espectroscopia cambio conformación de A β 42 a distintas concentraciones de PAMC.²²

Cuando se realizó la misma prueba con los PAMP se observaron distintos resultados según el grado de sustitución de estos. Tras la incubación de 48 horas en el PAMP1 y PAMP2 se observa 2 picos negativos consecutivos entre 210 nm y 225 nm (gráficos verde y rojo de la figura 10B) que corresponde a la presencia simultánea de β -amiloides en configuración de hélice- α y lámina- β .

En los PAMP3 y PAMP4 tras 48 horas de incubación solo se observa un pico negativo alrededor de 200 nm (figura 10B) similar al pico observado al principio de la incubación (figura 10A). Esto quiere decir que los PAMP3 y 4 inhiben completamente la transición de hélice- α a lámina- β . Los resultados de esta muestra concuerdan con los resultados de las pruebas anteriores, además con estos resultados se puede confirmar que los PAMP interfieren en la transición de estructura secundaria del A β ₄₂, los de menor grado de sustitución de forma parcial y los de mayor grado de sustitución inhiben esta transición completamente.

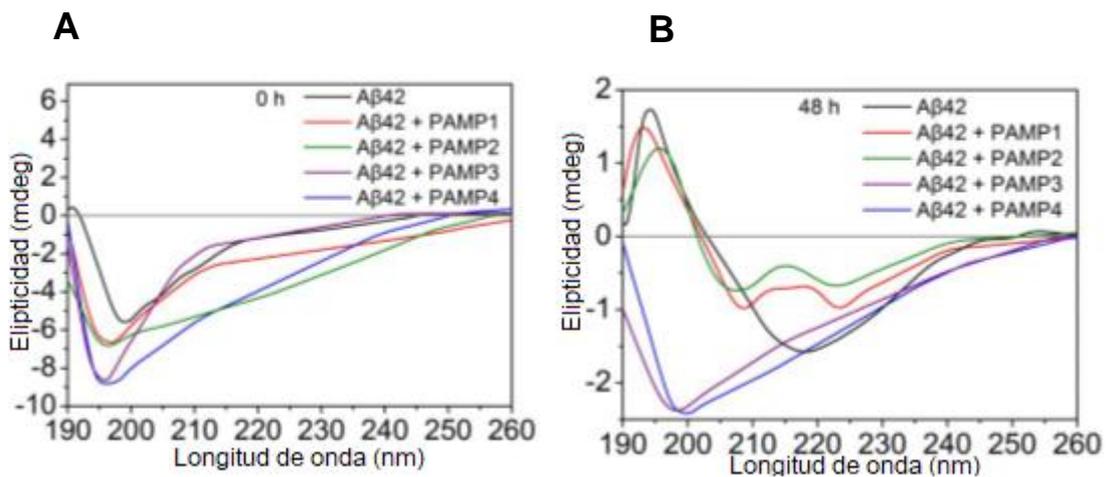


Figura 10 Resultados espectroscopia cambio conformación de Aβ42 con los diferentes PAMP.²²

Para estudiar los efectos de la concentración de PAMP frente a la inhibición de la formación de láminas-β de Aβ₄₂ se realizó el mismo ensayo (espectroscopía de dicroísmo circular) con diferentes concentraciones de PAMP3 y se determinó que el PAMP3 actúa de manera dosis dependiente y que la dosis que mayor efecto demostró fue la equimolar con el Aβ₄₂, 25 μM (figura 11). Estos resultados se extrapolaron al resto de PAMP.^{25,22.}

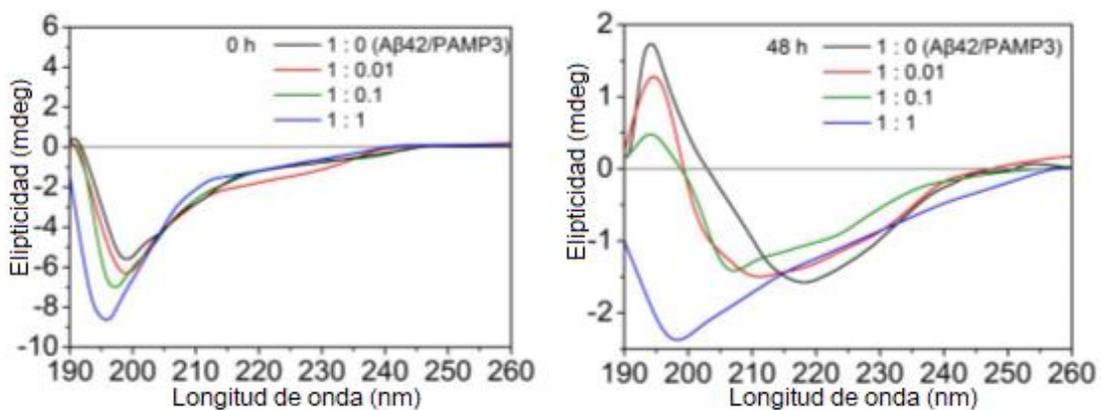


Figura 11 Relación dosis-efecto de PAMP3.²²

Una vez demostrada la acción inhibitoria de los PAMP se realizó un ensayo de biocompatibilidad para comprobar si estos podrían ser candidatos a ser fármacos. Para ello se inocularon los distintos PAMP a diferentes concentraciones en cultivos de células SH-SY5Y, células usadas para el estudio de la neurogénesis. Los PAMP1, 2 y 3 no presentaron citotoxicidad a ninguna de las concentraciones estudiadas llegando hasta 62.5 μM . En cambio, el PAMP4 a una concentración de 2.5 μM mostró una reducción de la supervivencia celular del 6%. Esto podría significar que el PAMP4 provoca cierta toxicidad. También se realizó esta prueba con el PAMC a las mismas concentraciones y tampoco se observó toxicidad.

Adicionalmente, se realizó un ensayo *in vitro* para observar la capacidad inhibitoria de los PAMP frente a la toxicidad producida por $\text{A}\beta_{42}$. Para ello, se prepararon varios cultivos de células SH-SY5Y con $\text{A}\beta_{42}$ a una concentración de 25 μM y los distintos PAMP y PAMC a distintas concentraciones (figura 12). En el cultivo que solo presenta $\text{A}\beta_{42}$ se produjo una disminución del 39% de la viabilidad celular. En el cultivo con PAMC no se observó ninguna mejora frente a la toxicidad de $\text{A}\beta_{42}$ a ninguna de las concentraciones estudiadas. En cuanto a los cultivos con PAMP se observó un aumento de la supervivencia celular de manera dosis-dependiente como se había observado anteriormente. También se observó que el PAMP que mayor viabilidad celular presentaba fue el PAMP3 que a niveles equimolares de $\text{A}\beta_{42}$ /PAMP3 (25 μM) muestra una viabilidad del 96%.²²

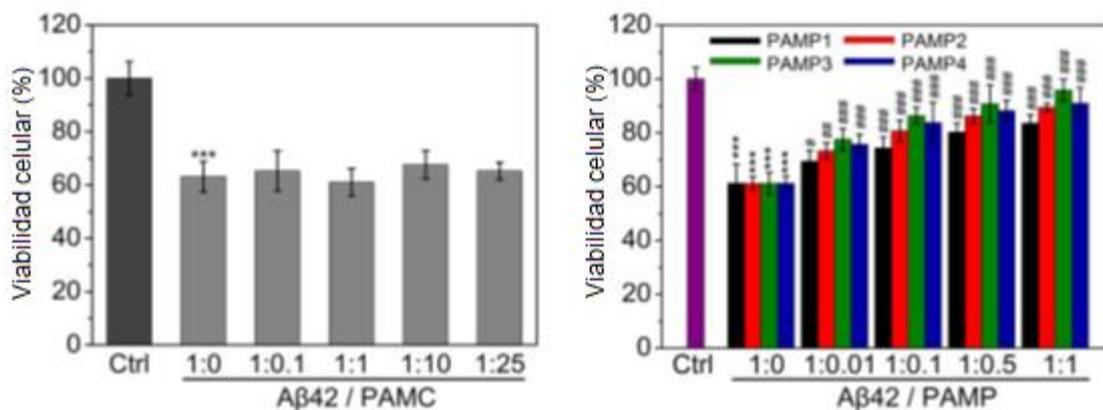


Figura 12 Inhibición de toxicidad producida por β -amilode.²²

Con todos los datos obtenidos anteriormente se demuestra que PAMP que presentan grupos hidrófobos y grupos que causan repulsión electrostática en su superficie causan fuerzas contrapuestas que son las responsables de la potente actividad inhibitoria que producen los PAMP, ya que se ha observado que el PAMC, solo con grupos carboxilo en su superficie, no ha ejercido dicha actividad.

Para confirmar que estos efectos se deben a la combinación de las dos fuerzas contrapuestas se ha estudiado la posibilidad de que un dendrímero con grupos hidroxilo en vez de grupos carboxilo tendría la misma actividad. Para ello se sustituyeron los grupos carboxilo del PAMP3, el de mayor actividad inhibitoria, por grupos hidroxilo mediante la reacción con etanolamina dando como resultado el PAMP3-OH. Una vez que se confirmó que no quedaban grupos carboxilo en PAMP3-OH mediante diversas técnicas de espectroscopia se realizó un ensayo de fluorescencia con tioflavina T en el que no se observó ninguna reducción de los niveles de agregados de $A\beta_{42}$. También se realizó una espectroscopia de dicroísmo circular (figura 13) en la que tampoco se observó ningún efecto sobre la formación de láminas- β .

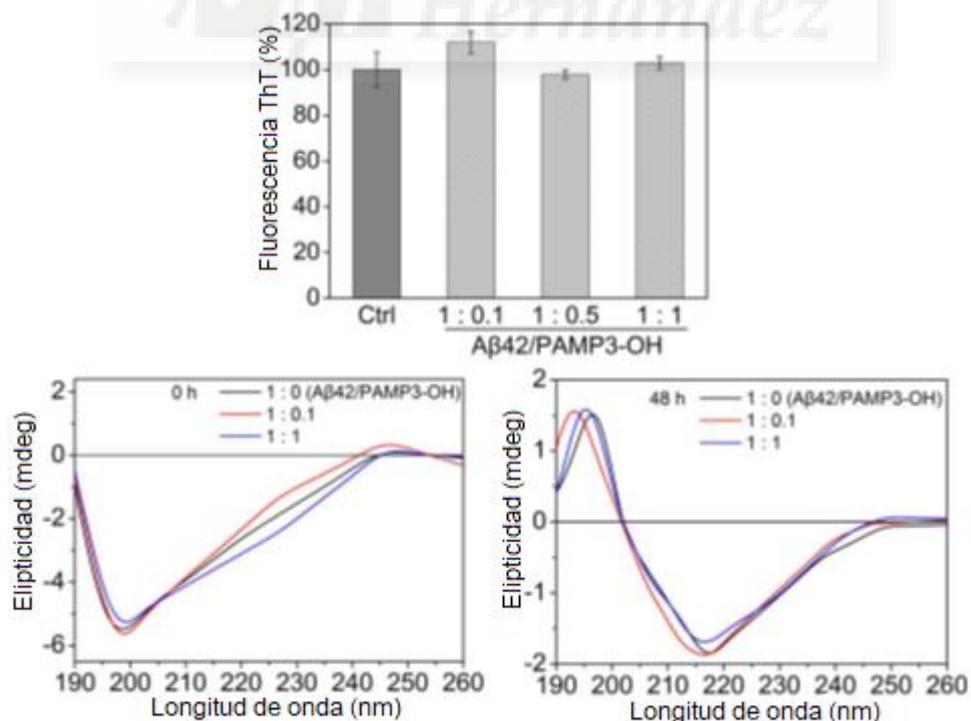


Figura 13 Resultados actividad inhibitoria del PAMP3-OH.²²

Todos estos resultados indican que los efectos inhibitorios del PAMP3 se deben a la presencia de grupos carboxilo en su superficie, ya que la sustitución de estos por grupos hidroxilo hace que pierda toda capacidad inhibitoria. Además, se demuestra la hipótesis HyBER, ya que, como se ha demostrado, el $A\beta_{42}$ presenta diversas zonas hidrófobas, como su centro hidrófobo o el carbono terminal, que se unen a los grupos fenilo (hidrófobos). Estas moléculas unidas al PAMP sufren una repulsión electrostática debido a la interacción de los grupos aniónicos carboxilo, cercanos a los grupos fenilo, con las cargas negativas del péptido (figura 14). Estas fuerzas opuestas resultan en que el $A\beta_{42}$ se estire en una conformación distinta a la lámina- β , causante de la aparición de los síntomas del alzhéimer. Por lo tanto gracias a los PAMP las moléculas de $A\beta_{42}$ ya no siguen la vía patológica y no se produce la muerte celular.^{26,22}

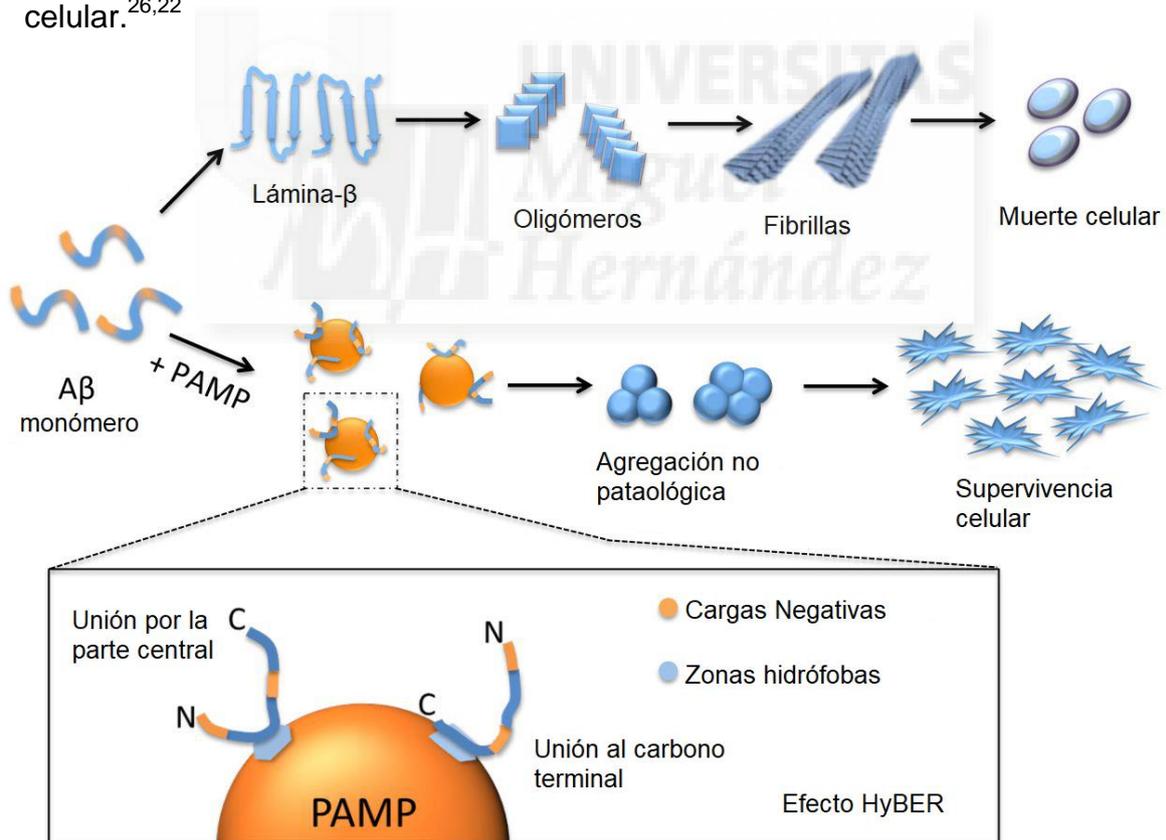


Figura 14 Mecanismo de acción del PAMP.²²

5. Conclusión

Como se ha observado en este trabajo la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa con gran prevalencia en la población anciana de los países desarrollados, y ante el esperado aumento de la prevalencia de la enfermedad es necesario el desarrollo de fármacos que actúen sobre el mecanismo y no solo sobre sus síntomas como los fármacos utilizados actualmente.

En este sentido, durante los últimos años se han estudiado diversas dianas farmacológicas que puedan servir como nuevas estrategias para el tratamiento del Alzheimer. Se ha investigado la interrupción de la formación de placas seniles tanto inhibiendo la secretasa, evitando que se produzca la agregación β -amiloide para la formación de $A\beta_{42}$, inhibiendo la hiperfosforilación de la proteína tau y consecuentemente sus efectos neurotóxicos, o evitando que los β -amiloides se plieguen en su conformación patógena. También se están investigando dianas que, aunque no afectan directamente al mecanismo de formación de β -amiloides evitan su formación como sería el caso del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1, que tras su bloqueo aumentaría el aclaramiento de β -amiloides. Otra estrategia es evitar la neurotoxicidad producida por los β -amiloides inhibiendo los procesos que la producen o contrarrestándolos.

En los distintos estudios incluidos en esta revisión, se ha observado que fármacos ya comercializados como el sildenafil, el palitaxel o el litio actúan en distintos procesos de la enfermedad y podrían ser efectivos en el tratamiento de esta patología. El hecho de que estén comercializados hace más inmediato su posible uso ya que se tienen datos sobre su toxicidad, lo que no ocurre con los nuevos fármacos, que tardarían más tiempo en estar disponibles en la práctica clínica.

Recientemente se ha sintetizado una nueva molécula, PAMP, que además de confirmar la hipótesis HyBER que abre un nuevo camino para la investigación del tratamiento del Alzheimer, ha presentado muy buenos resultados *in vitro* aumento notablemente la supervivencia de células en un entorno con $A\beta_{42}$.

Por lo tanto es necesario seguir investigando esta molécula para poder llegar a conseguir estos efectos en humanos, y también es necesaria la investigación de otras nuevas dianas para poder contar con el mayor arsenal terapéutico posible para el abordaje farmacológico de la enfermedad de Alzheimer.



6. Referencias

- ¹ *Demencia*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Accedido 24 de diciembre de 2018.
- ² Niu, H., et al. «Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis». *Neurología*, vol. 32, n.º 8, octubre de 2017, pp. 523-32.
- ³ Salomone S, Caraci F, Leggio GM, Fedotova J, Drago F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73(4):504–17.
- ⁴ Kumar, Anil, et al. «A Review on Alzheimer's Disease Pathophysiology and Its Management: An Update». *Pharmacological Reports*, vol. 67, n.º 2, abril de 2015, pp. 195-203.
- ⁵ Eisele, Y. S., et al. «Peripherally Applied A β -Containing Inoculates Induce Cerebral β -Amyloidosis». *Science*, vol. 330, n.º 6006, noviembre de 2010, pp. 980-82.
- ⁶ Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S-i. et al. Ab induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(27):2518–27.
- ⁷ Berbel Á, et al. Protocolo terapéutico de la demencia. *Medicine*. 2011;10(76):5178-82
- ⁸ López Locanto Óscar. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Arch. Med Int* ; 37(2): 61-67.
- ⁹ Flórez, Jesús, et al. *Farmacología humana*. Masson, 2001.
- ¹⁰ López Locanto Óscar. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Arch. Med Int* ; 37(2): 61-67.
- ¹¹ McKeage, Kate. «Memantine: A Review of Its Use in Moderate to Severe Alzheimer's Disease». *CNS Drugs*, vol. 23, n.º 10, octubre de 2009, pp. 881-97.
- ¹² Ghosh, Arun K., et al. «Developing β -Secretase Inhibitors for Treatment of Alzheimer's Disease: β -Secretase Inhibitor Drugs». *Journal of Neurochemistry*, vol. 120, enero de 2012, pp. 71-83.
- ¹³ Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, Saumier D, Haine D, Garceau D, et al. Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease – a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the AI phase Study). *Arch Med Sci* 2011;7(1):102–11.
- ¹⁴ Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL (2004) Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: The many roads to perdition. *Neuron* 43:605–608.
- ¹⁵ Tucker HM, et al. (2000) The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 20:3937–3946.
- ¹⁶ Jacobsen JS, Comery TA, Martone RL, Elokda H, Crandall DL, Oganessian A, et al. Enhanced clearance of Ab in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(25):8754–9.
- ¹⁷ Gong, Bing, et al. «Persistent Improvement in Synaptic and Cognitive Functions in an Alzheimer Mouse Model after Rolipram Treatment». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, n.º 11, diciembre de 2004, pp. 1624-34.

-
- ¹⁸ Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S, et al. Phospho-diesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid- β load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* 2009;29(25): 8075–86.
- ¹⁹ Trojanowski, John Q., et al. «Microtubule-Binding Drugs Offset Tau Sequestration by Stabilizing Microtubules and Reversing Fast Axonal Transport Deficits in a Tauopathy Model». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, n.º 1, enero de 2005, pp. 227-31.
- ²⁰ Takashima A., Noguchi K., Michel G., Mercken M., Hoshi M., Ishiguro K. and Imahori K. (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25–35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci. Lett.* 203, 33–36.
- ²¹ Engel, Tobias, et al. «Chronic Lithium Administration to FTDP-17 Tau and GSK-3 β Overexpressing Mice Prevents Tau Hyperphosphorylation and Neurofibrillary Tangle Formation, but Pre-Formed Neurofibrillary Tangles Do Not Revert». *Journal of Neurochemistry*, vol. 99, n.º 6, diciembre de 2006, pp. 1445-55. *Crossref*, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04139.x.
- ²² Wang, Ziyuan, et al. «Hydrophobic Modification of Carboxyl-Terminated Polyamidoamine Dendrimer Surface Creates a Potent Inhibitor of Amyloid- β Fibrillation». *Langmuir*, vol. 34, n.º 47, noviembre de 2018, pp. 14419-27. *ACS Publications*, doi:10.1021/acs.langmuir.8b02890.
- ²³ Navarro, G. and de Larduya, C. T. Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine* 2009, 5, 287-297.
- ²⁴ Biancalana, M. and Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 2010, 1804, 1405-1412.
- ²⁵ Wahlström, A.; Hugonin, L.; Perálvarez-Marín, A.; Jarvet, J. and Gräslund, A. Secondary structure conversions of Alzheimer's A β (1–40) peptide induced by membrane-mimicking detergents. *FEBS J.* 2008, 275, 5117-5128.
- ²⁶ Xie, B.; Dong, X.; Wang, Y. and Sun, Y. Multifunctionality of Acidulated Serum Albumin on Inhibiting Zn²⁺-Mediated Amyloid beta-Protein Fibrillogenesis and Cytotoxicity. *Langmuir.* **2015**, 31, 7374-7380.