



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

# **Estrategias farmacológicas dirigidas hacia la proteína $\beta$ -amiloide en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2020

**Autor: Fátima Estébanez Ayala**

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor: Francisco Navarrete Rueda

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
2.1. Definición, epidemiología y factores etiológicos de la enfermedad de Alzheimer	4
2.2. Clínica y diagnóstico de la EA .....	5
2.3. Neuropatología de la EA.....	6
2.4. Tratamiento de la EA: objetivos, aproximaciones terapéuticas y limitaciones ...	9
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>15</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
5.1. Reducción de la síntesis de proteína beta amiloide mediante inhibición enzimática .....	18
5.2. Eliminación de las placas amiloides mediante la activación de sus enzimas de degradación .....	23
5.3. Reducción de la agregación de la proteína beta amiloide .....	29
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>39</b>

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurológico progresivo y degenerativo que se ha convertido en la forma más común de demencia entre personas mayores. Actualmente no existe cura para la EA, y los tratamientos farmacológicos disponibles sirven exclusivamente para paliar los síntomas e intentar retrasar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en ningún caso tienen la capacidad de prevenir o modificar el curso de la enfermedad. Por estas razones, existe un interés creciente en el desarrollo de herramientas farmacológicas capaces de modular la etiopatogenia de la enfermedad y, con ello, su curso clínico. El objetivo principal de este trabajo ha sido recopilar información sobre los estudios que han dirigido diferentes estrategias hacia la proteína  $\beta$ -amiloide como posible terapia en la EA.

La selección de artículos incluidos en los resultados se ha llevado a cabo mediante una búsqueda bibliográfica en la base de datos Medline, a través de su buscador Pubmed. Los resultados han sido agrupados en 3 bloques para diferenciar las diversas estrategias dirigidas hacia esta proteína. El primer bloque aborda el empleo de fármacos capaces de reducir la síntesis de proteína  $\beta$ -amiloide mediante la regulación de la actividad de enzimas secretasas. En el segundo y tercer bloque se han recopilado las estrategias más innovadoras dirigidas hacia la eliminación de placas amiloides mediante la activación de sus enzimas de degradación, y la reducción de la agregación de proteína  $\beta$ -amiloide, respectivamente.

La estrategia dirigida a reducir la síntesis de  $\beta$ -amiloide había mostrado buenos resultados en modelos animales, pero su traslación a la clínica no parece reflejar los beneficios esperados. Sin embargo, los resultados que se han obtenido hasta ahora con aquellas aproximaciones que tienen como objetivo promover la eliminación de las placas amiloides o reducir su agregación, sugieren su potencial terapéutico. A pesar de ello, todavía es necesario realizar un mayor número de estudios para valorar su aplicabilidad en la clínica como tratamiento prometedor para la EA, con capacidad de prevenir o modificar, al menos en parte, el desarrollo de la enfermedad y ofrecer una mayor calidad de vida al paciente.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Definición, epidemiología y factores etiológicos de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por ser la causa más común de demencia, representando entre el 60-80% de los casos. Se trata de una enfermedad neurológica, degenerativa y progresiva, que a día de hoy no presenta ninguna cura<sup>1</sup>.

Existen una serie de factores de riesgo que pueden predisponer o aumentar la probabilidad de aparición de la EA, entre los que se podrían destacar los siguientes:

- Edad: es el factor más determinante en la EA. Se ha comprobado que conforme se incrementa la edad, especialmente a edades avanzadas, se produce un aumento exponencial de la aparición de la enfermedad.
- Género: las mujeres presentan un mayor riesgo que los hombres.
- Factores tóxico-ambientales como el consumo de tabaco u otras drogas.
- Factores nutricionales: padecer hipercolesterolemia, deficiencia en vitamina B12 y folatos, obesidad o consumo elevado de alcohol.
- La presencia de patologías psiquiátricas o cardiovasculares, entre otras.
- Factores genéticos: la historia familiar de la EA es la segunda causa más importante de la aparición de Alzheimer, ya que el 40% de los afectados presentan un familiar que la haya sufrido. Además, el riesgo de padecer Alzheimer se multiplica entre 2 y 3 veces si el familiar es de primer grado. Las mutaciones genéticas que pueden dar lugar a esta enfermedad pueden aparecer en tres tipos de genes: proteína precursora amiloide (APP) y presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2).

De acuerdo con los anteriores factores genéticos, la EA podría dividirse en formas de aparición tempranas, en edades anteriores a los 65 años (representan el 1-6%), o en formas de aparición tardías a partir de los 70 años, que representan el 95% de los casos. En las formas de aparición tempranas juegan un importante papel los genes mencionados anteriormente. Sin embargo, en las formas de aparición tardías, los genes que pueden estar implicados no son tan determinantes, aunque sí producen cierta predisposición en el individuo que los

posee. El principal gen estudiado en las formas de aparición tardía de la EA es el gen APOE (gen que codifica para la apolipoproteína P), aunque no tiene tanta relevancia como las mutaciones en los genes anteriormente descritos<sup>2-4</sup>.

## **2.2. Clínica y diagnóstico de la EA**

El síntoma más destacado de la EA es la pérdida de capacidad para recordar información reciente. El enfermo es capaz de recordar sucesos de hace años, pero no consigue recordar los nuevos. Esto se debe a que las primeras neuronas que resultan dañadas se encuentran en áreas del cerebro encargadas de la generación de nuevos recuerdos. Conforme avanza la enfermedad, las neuronas de otras regiones también sufren alteraciones, dando lugar a una gran variedad de síntomas comunes en el Alzheimer. Los síntomas psicológicos y conductuales aumentan la incapacidad funcional del paciente, y aparecen de manera casi simultánea a la pérdida de capacidad cognitiva. Entre estos síntomas destacan la depresión, alucinaciones, ansiedad, insomnio, agitación, identificación errónea de personas, inquietud o falta de motivación.

El conjunto de síntomas imposibilita que el paciente lleve una vida normal, ya que presenta dificultad para llevar a cabo tareas habituales de casa o el trabajo, presenta gran confusión en cuanto al lugar y al tiempo en el que se encuentra, pierde la capacidad de hablar, escribir o comprender una conversación. La clínica de la enfermedad empeora a medida que progresa, llevando al paciente a ser dependiente completamente de un cuidador, y finalmente fallecer<sup>1, 5</sup>.

Actualmente, la única prueba diagnóstica que nos permite corroborar que un paciente sufre Alzheimer es un diagnóstico neuropatológico post-mortem, en el que se pueden comprobar la presencia de determinados hallazgos anatomopatológicos siendo destacables las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, cuyo origen y composición se mencionarán con detalle más adelante<sup>2</sup>. Aun así, existen una serie de pruebas y evaluaciones clínicas que el neurólogo podrá llevar a cabo para poder realizar el diagnóstico de la forma más certera posible. Entre las diferentes pruebas, se lleva a cabo una exploración física general y una exploración neurológica mediante pruebas preestablecidas que nos ayudan a determinar el grado de demencia. Además, también se

solicitan análisis de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) e imágenes cerebrales (TAC, RMN) para descartar otras posibles enfermedades que no tengan relación con el Alzheimer. Asimismo, es muy importante la adecuada anamnesis del paciente, en la que se tenga en cuenta su historia familiar y sus antecedentes personales<sup>1, 6</sup>.

Debido a la necesidad de diagnosticar el Alzheimer en los estadios iniciales, con el objetivo de poder retrasar todo lo posible el avance de la enfermedad, su detección precoz mediante la valoración de cambios en determinados biomarcadores se ha convertido en un foco muy importante de investigación<sup>7, 8</sup>. Los biomarcadores deben ser específicos de la enfermedad y presentar una sensibilidad adecuada. Por una parte, se encuentran los biomarcadores presentes en el LCR que reflejan características patológicas centrales de la EA. Los biomarcadores más estudiados en el LCR son el péptido beta-amiloide y la proteína Tau. La disminución de los niveles de  $\beta$ -amiloide 42 ( $A\beta_{42}$ ) en el LCR y el aumento notable de los niveles de proteína Tau favorecen el diagnóstico de la EA. El problema que presentan estos biomarcadores es que no poseen un buen balance coste-efectividad, y son demasiado invasivos.

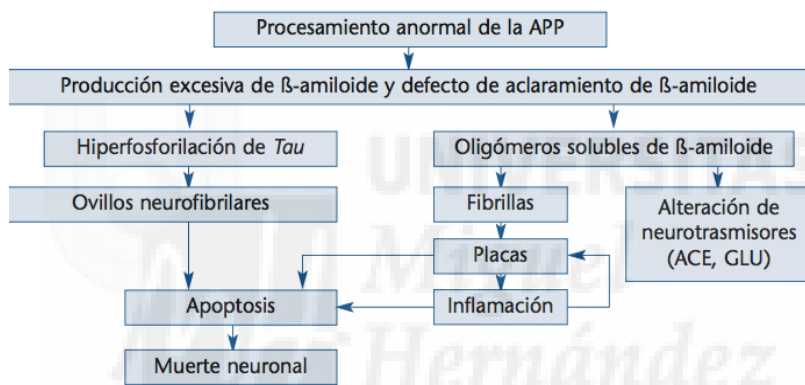
Por otra parte, tenemos los biomarcadores sanguíneos que resolverían en parte los problemas mencionados para los anteriores. Aun así, su identificación para un fiable diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer sigue siendo muy limitada. Los principales biomarcadores sanguíneos serían el neurofilamento ligero (NFL), un marcador de daño neuronal que aumenta sus concentraciones cuando el paciente presenta Alzheimer, y la proteína Tau, teniendo menor importancia el marcador  $A\beta$ <sup>9</sup>.

### **2.3. Neuropatología de la EA**

Las demencias se caracterizan por presentar deterioro en las funciones cerebrales superiores o cognitivas, dando lugar a la disminución de la memoria, el lenguaje o la resolución de problemas en la vida cotidiana. Este deterioro de las funciones cerebrales se debe al daño o destrucción de neuronas que se encargan de regular la función cognitiva. En el caso de la EA son muchos tipos de neuronas las que sufren daño, pero inicialmente destaca el que se produce

en las neuronas colinérgicas, el cual se relaciona con la aparición de diferentes alteraciones neuropatológicas como las placas seniles y los ovillos neurofibrilares que veremos más adelante (Figura 1). Asimismo, el daño y la pérdida de neuronas en etapas más avanzadas de la EA termina afectando a diversas zonas cerebrales, llegando a imposibilitar funciones como tragar o caminar. El deterioro funcional del sistema nervioso central en la EA está determinado por 3 procesos principalmente:

- Formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares.
- Alteración en diferentes sistemas de neurotransmisión.
- Apoptosis de neuronas, llevando a la pérdida neuronal progresiva característica del Alzheimer<sup>3</sup>.



**Figura 1. Imagen en la que se detalla la neuropatología de la EA.**

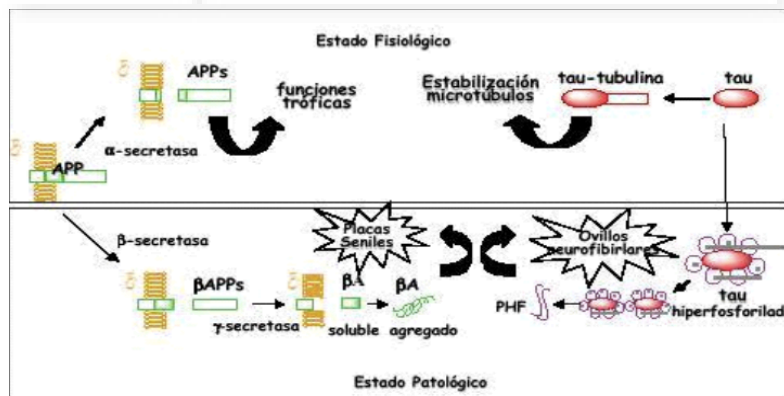
*Esquema de los procesos neuropatológicos principales que se producen en el cerebro en la EA, dando lugar al deterioro funcional característico (APP: proteína precursora amiloide, ACE: Acetilcolina, GLU: glutamato). Imagen extraída de la guía de seguimiento farmacoterapéutico de los pacientes con Alzheimer, publicada por la Universidad de Granada en el año 2006. Autora: Laura Tuneu Valls.*

En las placas seniles, el principal componente es la proteína beta amiloide, la cual proviene de la proteína precursora amiloide (APP, de sus siglas en inglés), que presenta como función fisiológica la adhesión celular. La APP se inserta en la membrana celular, donde puede ser procesada por distintas proteasas que compiten por la misma parte de la proteína, dando lugar a dos posibles vías (Figura 2):

- Vía no amiloidogénica: la proteína precursora de amiloide es procesada por una  $\alpha$ -secretasa, originando  $\alpha$ - APP y un fragmento C-terminal

asociado a membrana, el cual es procesado posteriormente por una  $\gamma$ -secretasa, que libera el carboxilo dentro de vesículas lisosomales para su degradación. Por tanto, en esta vía se libera  $\alpha$ -APP al espacio extracelular y no se generan depósitos.

- Vía amiloidogénica: existe esta ruta alternativa de procesamiento de la APP en condiciones patológicas, que pueden deberse a multiplicaciones aberrantes del gen para APP, así como mutaciones en el gen APP o en genes de enzimas involucradas en el procesamiento de APP. En esta vía, el APP es procesado por una  $\beta$ -secretasa, generando  $\beta$ -APP y un fragmento C-terminal asociado a la membrana que posteriormente será procesado por una  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a la liberación de  $A\beta$  en fragmentos de distinto tamaño, pero especialmente se generarán péptidos  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ . Estos péptidos tienen una solubilidad limitada, y son capaces de formar agregados insolubles, formando fibrillas de amiloide que son neurotóxicas, y que son las principales constituyentes de las placas seniles en la EA. Para la agregación de  $A\beta$  es necesaria una alta concentración, además se puede ver acelerada por algunos factores como la presencia de chaperonas, apolipoproteína J, metales catalizadores de reacciones redox o mutaciones<sup>10-12</sup>.



**Figura 2. Representación de las 2 posibles vías de procesamiento de la APP y Tau**

En la imagen podemos diferenciar los procesamientos de la APP y la proteína Tau en condiciones normales y en condiciones patológicas. Podemos diferenciar cómo se forman los ovillos neurofibrilares a partir de la proteína Tau hiperfosforilada, y la formación de placas seniles tras el procesamiento anómalo de la APP mediante una beta y gamma secretasas. La imagen ha sido obtenida del artículo "La enfermedad de Alzheimer: bases moleculares y aproximaciones terapéuticas" de la asociación española de científicos. Autores: Ana Castro, Ana Martínez.



Por otra parte, tenemos los ovillos o acumulaciones neurofibrilares, que están formados principalmente por la proteína Tau hiperfosforilada. El citoesqueleto neuronal está formado por microtúbulos, neurofilamentos y microfilamentos, que tienen como funciones el transporte de nutrientes y otras sustancias en los axones y el mantenimiento estructural de la neurona. La función de Tau en el citoesqueleto se basa en ayudar a la tubulina a polimerizarse para formar los microtúbulos, así como establecer vínculos entre estos y los neurofilamentos. La proteína Tau presenta un equilibrio entre su estado fosforilado y defosforilado, originando cambios estructurales y de conformación que regulan la estabilidad del citoesqueleto. En la EA, la proteína tau se fosforila en múltiples sitios produciéndose su hiperfosforilación, lo que conduce a una alteración en la estructura de los microtúbulos en el citoesqueleto. Este fenómeno junto con el empaquetamiento de la proteína Tau, dan lugar a una afectación en el mecanismo de transporte neuronal. Las neuronas son incapaces de transmitir señales eléctricas y de transportar nutrientes<sup>13</sup>.

#### **2.4. Tratamiento de la EA: objetivos, aproximaciones terapéuticas y limitaciones**

Finalmente, el tratamiento farmacológico de la EA presenta los siguientes objetivos: mejorar la calidad de vida del paciente mediante la recuperación de las funciones perdidas, y preservar la función cognitiva durante el mayor tiempo posible retrasando así la aparición de la enfermedad. Para poder abordar estos objetivos, el abordaje terapéutico de la EA puede dirigirse hacia las siguientes 3 estrategias:

- Sintomática: mantenimiento y/o recuperación de neurotransmisores como la acetilcolina que se ven disminuidos.
- Etiopatogénica: bloqueo desde un principio de la síntesis de proteínas A $\beta$  y de la hiperfosforilación de la proteína tau.
- Inmunoterapia: empleo de vacunas dirigidas a frenar el inicio y progresión de la enfermedad actuando principalmente sobre las proteínas  $\beta$ -amiloide y tau mediante diferentes aproximaciones.

Actualmente solo se emplea la estrategia sintomática debido a la gran cantidad de limitaciones existentes en la búsqueda de nuevos tratamientos que veremos con detalle más adelante<sup>2</sup>. Dentro de la estrategia sintomática, tenemos 2 grupos de fármacos que ayudan en el tratamiento de la enfermedad:

- Fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa: dentro de este grupo de fármacos se encuentran el Donepezilo, la Rivastigmina y Galantamina. El primer fármaco descubierto en este grupo fue la Tacrina, pero debido a su elevada hepatotoxicidad dejó de comercializarse. La acetilcolina es inactivada e hidrolizada por las enzimas Acetilcolinesterasa (ACE) y Butirilcolinesterasa (BuCE) en la hendidura sináptica. La ACE es unas 10 veces más abundante en el cerebro que la BuCE, siendo esta última más abundante en los tejidos periféricos. La unión de estos fármacos a los sitios de unión de la enzima impide que se pueda fijar la acetilcolina, evitando su hidrólisis e inactivación, y aumentando su concentración localmente.

En el sistema nervioso central, el aumento de acetilcolina mejora la función cognitiva, las actividades de la vida diaria, la conducta y el estado clínico global en pacientes que sufren Alzheimer de leve a moderado. Es decir, los inhibidores de la acetilcolinesterasa mejoran el cuadro de esta patología a corto plazo, pero no impiden la progresiva neurodegeneración. Además, es necesario un periodo de estabilización del paciente de unos 3 meses, puesto que se asocian a efectos secundarios que requieren de un tiempo de tratamiento para verse atenuados y sean tolerados de manera adecuada por el paciente. Esto se debe al aumento de la acetilcolina, pues produce a su vez un aumento de la actividad colinérgica central y periférica, produciendo síntomas como vómitos, diarrea, mareos o mialgias. Actualmente, la eficacia clínica de estos fármacos en cuanto a la mejoría o no agravamiento, puede durar en algunos pacientes más de 2 años.

- Moduladores de glutamato: en este grupo encontramos la Memantina, que se caracteriza por ejercer un bloqueo no competitivo y fácilmente reversible del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA). El

glutamato estimula entre otros receptores postsinápticos, el NMDA, que interviene en procesos de formación de memoria y en la patogenia de demencias. Un aumento de la concentración de glutamato puede derivar en una sobreestimulación glutamatérgica, produciendo daño neuronal como ocurre en la EA. Esta situación se conoce como excitotoxicidad, y está asociada a una sobrecarga de calcio en el interior de la neurona que lleva a su degeneración. Por lo tanto, lo que se busca es un equilibrio, mantener la actividad glutamatérgica imprescindible para mantener una actividad cerebral normal.

La memantina no interfiere en procesos de formación y consolidación de la memoria, y además presenta un efecto neuroprotector. Se utiliza en pacientes con EA de moderada a grave, o bien en pacientes en los que no funcionan los inhibidores de la acetilcolinesterasa y presentan una enfermedad de leve a moderada<sup>2, 3</sup>.

Además de las alteraciones cognitivas que padecen los pacientes con EA, también suelen aparecer otras comorbilidades como trastornos afectivos (depresión, ansiedad), psicóticos (alucinaciones, irritabilidad, agitación), trastornos del sueño (insomnio, despertares precoces), de tipo sexual, maniformes, apatía y trastornos de la conducta alimentaria (bulimia, anorexia), los cuales necesitan de un tratamiento adicional. Por tanto, el abordaje farmacológico de la EA requiere adicionalmente al manejo del deterioro cognitivo el tratamiento de estas comorbilidades, haciendo mucho más complejo el tratamiento integrado del paciente con EA<sup>3</sup>.

Fármaco	Mecanismo de acción	Duración de la acción y posología	Principales efectos adversos
<b>Tacrina</b>	Inhibe tanto a la AChE como a la BuChE. No selectiva para el SNC	6 horas 2-3 veces al día vía oral	Pocos efectos secundarios colinérgicos. Hepatotoxicidad
<b>Donepezilo</b>	Inhibidor selectivo de la AChE en el SNC	24 horas 1 vez al día vía oral	Ligeros efectos secundarios colinérgicos
<b>Rivastigmina</b>	Inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la AChE y la BuChE	8 horas 2 veces al día vía oral	Efectos secundarios colinérgicos que suelen desaparecer con el tratamiento mantenido
<b>Galantamina</b>	Inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la AChE y la BuChE	8 horas 2 veces al día vía oral	Pocos efectos secundarios colinérgicos
<b>Memantina</b>	Antagonista no competitivo del receptor NMDA	6 horas 1-2 veces al día vía oral	Alucinaciones, confusión, vértigo o fatiga

**Tabla 1. Tabla comparativa de los fármacos utilizados en la EA.**

Información obtenida del libro *Farmacología Rang y Dale*, octava edición. Autores: H.P. Rang, J.M. Ritter; y del libro de *Farmacología Humana*, sexta edición. Autor: Jesús Flórez.

Los fármacos con los que contamos actualmente para el tratamiento de la EA se basan en el alivio de los síntomas cognitivos modulando la actividad de neurotransmisores como la acetilcolina y el glutamato. Entre sus limitaciones encontramos que no previenen, modifican o solucionan la enfermedad, presentan una limitada duración de la mejoría que se pueda llegar a producir y en estadios avanzados de la enfermedad la mejoría es poco relevante. Actualmente se está intentando promover las estrategias neuroprotectora, basada en evitar el deterioro o muerte neuronal como consecuencia del proceso

neurodegenerativo, y la neurorreparadora, donde se tendría como objetivo más ambicioso reemplazar las neuronas ya dañadas. El desarrollo de fármacos neuroprotectores va encaminado a regular, entre otros aspectos, la formación y acúmulo de la proteína  $\beta$ -amiloide. En cuanto a dicha proteína, hasta ahora se han estado investigando principalmente 3 posibles estrategias: la reducción de su producción, la reducción de su agregación, y su degradación o aclaramiento una vez estén formadas las placas seniles. Cabe destacar que a pesar de todos los esfuerzos llevados a cabo en la estrategia de reducción de la formación de proteína  $\beta$ -amiloide mediante estrategias de inhibición enzimática, éstos no han aportado de momento el beneficio clínico esperado. Por tanto, las nuevas estrategias encaminadas a evitar su agregación o potenciar su degradación han abierto una nueva vía que podría ser útil para conseguir una estrategia terapéutica basada en la etiopatogenia de la enfermedad, que resulte útil en la modificación de su curso clínico<sup>2,3</sup>.



### 3. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo es realizar una búsqueda de información relacionada con nuevas terapias enfocadas a la acumulación de proteína  $\beta$ -amiloide, el principal componente de las placas seniles en la EA.

Los **objetivos específicos** han sido realizar una revisión sobre las distintas estrategias dirigidas a dicha proteína. Por un lado, la reducción de la síntesis de proteína  $\beta$ -amiloide mediante su inhibición enzimática es la vertiente más estudiada pero la mayoría de los resultados no han sido prometedores. Por otro lado, las estrategias basadas en la eliminación de placas amiloides ya existentes mediante el aclaramiento y/o degradación de  $A\beta$ , así como la reducción de la agregación del péptido  $A\beta$  son nuevas terapias emergentes sobre las que también se centra este trabajo, siendo una vía de estudio para encontrar nuevos compuestos capaces de modificar el curso de la EA.



## 4. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se ha buscado la información en Medline, la principal base de datos de bibliografía médica existente, utilizando su buscador científico Pubmed. En primer lugar, se ha utilizado la base de datos DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud) para obtener un lenguaje único y poder buscar un determinado concepto utilizando estas palabras clave sin interferencias de otras similares en el momento de la búsqueda posterior en Medline. En la base de datos DeCS, se consultó por índice permutado en español y se eligió el término que nos interesó. Una vez comprobado que el significado se ajusta a la búsqueda que se quiere realizar, se utiliza el descriptor en inglés que corresponde a los denominados Medical Subject Headings (MeSH) para la búsqueda en Medline. Cuando se entra en Pubmed, se selecciona “MeSH Database” y se utilizan los conectores u operadores booleanos AND y OR para realizar la búsqueda bibliográfica de manera más sensible y amplia, evitando así que se quede algún artículo sin revisar. Además, se completó la búsqueda con artículos seleccionados en la base de datos de ensayos clínicos *clinicaltrials.gov*.

El objetivo principal de seleccionar nuestras palabras clave es realizar una búsqueda precisa en torno al tema que queremos estudiar, por ello los descriptores más utilizados en este trabajo han sido: “Alzheimer Disease” a que se unió el calificador “drug therapy” en muchas de las búsquedas, y “Amyloid beta-Peptides” para que los resultados estén relacionados con esta vía terapéutica. Los artículos seleccionados para la búsqueda bibliográfica han sido aquellos que han llegado a fases de estudio más avanzadas, así como los artículos con los compuestos más prometedores a falta de la realización de estudios en humanos. Las cajas de búsqueda utilizadas fueron:

- (("Alzheimer Disease/drug therapy"[Mesh]) AND "Peptide Hydrolases"[Mesh]) AND "Amyloid beta-Peptides"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years
- (("Alzheimer Disease"[Mesh]) AND "Plaque, Amyloid"[Mesh]) AND "Enzymes/metabolism"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years

- (((("Alzheimer Disease"[Mesh]) OR "Alzheimer Disease"[Title/Abstract])) AND (("Plaque, Amyloid"[Mesh]) OR "Plaque, Amyloid"[Title/Abstract])) AND "Enzymes/metabolism"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years
- (("Alzheimer Disease/drug therapy"[Mesh]) AND "Amyloid beta-Peptides"[Mesh]) AND "Enzymes/metabolism"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years
- (("Enzymes"[Mesh]) AND ("Amyloid beta-Peptides/antagonists and inhibitors"[Mesh])) AND "Alzheimer Disease/drug therapy"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years
- (((("Enzymes"[Mesh]) OR "Enzymes"[Title/Abstract])) AND ("Amyloid beta-Peptides/antagonists and inhibitors"[Mesh])) AND "Alzheimer Disease/drug therapy"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years
- (((("Amyloid beta-Peptides"[Mesh]) OR "Amyloid beta-Peptides"[Title/Abstract])) AND "Alzheimer Disease/drug therapy"[Mesh]) AND "Enzymes/metabolism"[Mesh] Filters: Free full text; published in the last 5 years

A continuación, se describen los criterios de inclusión y exclusión utilizados para obtener los resultados más precisos posibles.

Los criterios de inclusión utilizados fueron los siguientes:

- Artículos publicados en los 5 últimos años
- Disponer de manera gratuita del texto completo
- Se aceptaron ensayos clínicos o preclínicos originales, así como revisiones sistemáticas centradas en la temática del estudio

Asimismo, los criterios de exclusión utilizados fueron:

- Artículos que no estuvieran escritos en idioma inglés o español
- Artículos sobre patologías distintas a la EA
- Artículos basados en el tratamiento de la EA que no se centren en la proteína  $\beta$ -amiloide.



A continuación, se muestra un diagrama que recoge el proceso de búsqueda y selección de los resultados que se han llevado a cabo, aplicando los criterios descritos anteriormente.



**Figura 3. Diagrama sobre el proceso de búsqueda en Pubmed**



## 5. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tras la búsqueda en Pubmed, subdivididos en tres bloques distintivos según la estrategia a la que estén enfocados.

### 5.1.Reducción de la síntesis de proteína beta amiloide mediante inhibición enzimática

La síntesis de proteína beta amiloide es la causante de fenómenos de neurotoxicidad en el cerebro y presenta un importante papel en la EA. Se han desarrollado distintas estrategias farmacológicas relacionadas con la inhibición de la formación de dicha proteína, la cual se forma a partir del procesamiento anómalo de la APP por la  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa. En condiciones normales, la APP sería procesada por una  $\alpha$ -secretasa sin generar depósitos amiloides. Por ello, las estrategias terapéuticas más estudiadas han sido la inhibición o modulación de la  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, así como la activación de la  $\alpha$ -secretasa con el objetivo de disminuir la producción de la proteína beta amiloide. A pesar de ser una de las vías terapéuticas más estudiadas en la EA, no se ha logrado ningún avance terapéutico importante porque presenta una gran cantidad de limitaciones como veremos a continuación

#### ▪ Inhibidores de la $\beta$ -secretasa:

La enzima  $\beta$ -secretasa es el primer paso para la formación de la proteína A $\beta$  por lo que, si se pudiera inhibir esta enzima sin generar otros problemas, sería un gran avance para el diseño de nuevos fármacos en la EA. Sin embargo, esta enzima tiene distintos sustratos, por lo que su inhibición inespecífica genera una serie de reacciones adversas. Además, las moléculas inhibidoras de esta enzima deben ser grandes e hidrófilas debido a su naturaleza, por lo que puede haber dificultades para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) <sup>14</sup>.

Se han llevado a cabo varios ensayos en animales para la valoración de compuestos efectivos contra la EA. Uno de estos estudios se llevó a cabo en

ratones transgénicos APPPS1xGLUT1Venus, los cuales presentan la APP humana con una mutación y la PS1 mutada con el fin de caracterizar la neurobiología de la EA. Fueron tratados en una etapa temprana de la deposición de proteína A $\beta$  con un potente inhibidor de BACE-1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme-1) que penetra la BHE, como es el compuesto NB-360. Los resultados de este estudio indican que la inhibición de la actividad de BACE1 no redujo la acumulación de proteína A $\beta$  en las placas ya formadas, asimismo la toxicidad local no revirtió en ratones incluso después de la inhibición prolongada de BACE-1. Los inhibidores de BACE-1 afectan principalmente a la formación de nuevas placas, no al crecimiento de estas, por lo que en este estudio se sugiere que el tratamiento al inicio de la EA podría retrasar la progresión de la patología<sup>15</sup>. Además, hallazgos recientes indican que la acumulación de proteína A $\beta$  puede estar presente décadas antes de la manifestación de la enfermedad, lo que apoya la necesidad de diagnosticar precozmente la EA.

También se han llevado a cabo estudios en humanos para encontrar un compuesto efectivo en la EA. Uno de los compuestos estudiados con este fin ha sido el Verubecestat, un inhibidor oral de BACE1 que reduce la concentración de proteína A $\beta$  en el LCR de pacientes con Alzheimer. Para valorar su eficacia, se ha llevado a cabo un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo de fase III, en el que se estudiaron las dosis de 12, 40 y 60 mg/día comparadas con placebo. Este estudio demostró que el Verubecestat produce una reducción máxima de A $\beta$  en el LCR (redujo A $\beta$ -40 un 63% y A $\beta$ -42 un 81%) y una reducción moderada en la carga amiloide cerebral por medio de su mecanismo de inhibición de BACE-1. Aun así, durante el tratamiento de 78 semanas no fue eficaz a la hora de retrasar la progresión clínica de la EA en fase leve a moderada.

El ensayo clínico no llegó a término debido al porcentaje de pacientes tratados con Verubecestat con eventos adversos. Entre éstos, se pueden destacar la aparición de caídas y lesiones, erupción cutánea, eventos relacionados con trastornos del sueño, disminución del peso, ideación suicida y cambios de color en el cabello. Estas circunstancias unidas a los resultados desalentadores del estudio, y las limitaciones como la falta de biomarcadores

para una detección temprana de pacientes con EA, hicieron que el estudio no siguiera adelante <sup>16</sup>.

Otro ensayo clínico en fase II-III fue el del compuesto Atabecestat, un inhibidor oral de BACE-1 para el tratamiento de la EA, que tuvo resultados similares al ensayo clínico con Verubecestat, y demostró que la eficacia de los tratamientos de la EA enfocados a la proteína  $\beta$  amiloide, deben de iniciarse en fases muy tempranas de la enfermedad<sup>17</sup>.

A parte de los ya mencionados, se encuentran los compuestos inhibidores de BACE-1 Lanabecestat y Elenbecestat en fase II/III y fase III, respectivamente. Elenbecestat redujo significativamente los niveles de  $A\beta$  en LCR y plasma en roedores por lo que continúa estudiándose para comprobar su potencial como nuevo tratamiento para la EA, mientras que Lanabecestat se encuentra en fase de evaluación de eficacia y seguridad para pacientes en fase inicial de EA<sup>18</sup>.

#### ▪ **Inhibidores y moduladores de la $\gamma$ -secretasa**

La enzima  $\gamma$ -secretasa es la responsable final de la formación de proteína  $A\beta$ , por lo que sería interesante encontrar compuestos que pudieran inhibir su actividad, los llamados inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa (GSI): Gamma-secretase inhibitors.

El problema de esta enzima es que procesa diversas proteínas, entre las que encontramos la proteína Notch, encargada de acciones como la regulación de la proliferación celular, el desarrollo, la diferenciación, la comunicación y el estado de supervivencia celular. Por lo que, a pesar de inhibir la producción de proteína  $A\beta$ , los GSI presentan efectos secundarios al inhibir inespecíficamente la  $\gamma$ -secretasa e interferir en el procesamiento de Notch, además de provocar toxicidad celular al aumentar los niveles de fragmentos carboxilo terminales del procesamiento de la APP<sup>14, 19</sup>.

El primer inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa llevado a ensayos clínicos en fase III, Semagacestat, demostró en anteriores ensayos su capacidad para reducir significativamente la síntesis de  $A\beta$ , pero finalmente se detuvieron debido a la aparición de eventos adversos como cáncer de piel e infecciones, así como una falta de eficacia terapéutica<sup>20</sup>.

Por ello, se buscaron compuestos que, en vez de inhibir, modularan la actividad de la  $\gamma$ -secretasa, los llamados moduladores de la  $\gamma$ -secretasa (GSM), que reducen específicamente los niveles de  $A\beta$ -42 sin provocar los efectos de los GSI, como es el caso de los AINE (Antiinflamatorios no esteroideos). Los primeros estudios con AINE evidenciaron que la  $\gamma$ -secretasa podría pasar de productos peptídicos amiloidogénicos más largos a otros más cortos sin inhibir completamente el complejo y evitando así toxicidades relacionadas con Notch. Los GSM se pueden dividir en 3 grupos: ácidos carboxílicos derivados de AINE, heterocíclicos no AINE y GSM derivados de productos naturales<sup>21</sup>. Dentro de los GSM, se encuentra el grupo de moduladores solubles de la  $\gamma$ -secretasa (SGMS), en el que encontramos la molécula de estudio SGMS-36, la cual se estudió en un ensayo en ratones. A diferencia de los GSI, el compuesto SGMS-36 no afectó ni al procesamiento de APP en la  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasa ni al procesamiento de Notch. Además, suprimió la producción de  $A\beta$ -42 reduciendo significativamente los niveles plasmáticos y cerebrales en ratones. Por lo tanto, podría ser una terapia efectiva para el tratamiento y prevención de la EA a falta de estudios que lo confirmen<sup>19</sup>.

Otro modulador de la  $\gamma$ -secretasa estudiado fue el BSM-932418, una pirimidina bicíclica no AINE que mostró selectividad para reducir  $A\beta$ -40 y  $A\beta$ -42. A pesar de ser un compuesto activo en humanos, se determinó que no era óptimo para el tratamiento de la EA por no lograr la disminución de proteína  $A\beta$  en un porcentaje mayor del 25%. Además, el ensayo clínico se detuvo debido al margen insuficiente de seguridad y tolerabilidad<sup>21</sup>.

Se han investigado también GSM derivados de productos naturales, como la Dihidroergocistina (DHEC), un componente de los mesilatos ergoloides aprobado por la FDA para el tratamiento de otras patologías. La DHEC inhibió efectivamente la producción de proteína  $A\beta$  mediante la modulación de la enzima  $\gamma$ -secretasa en estudios de células in vitro, por lo que la DHEC podría seguir estudiándose para promover el desarrollo de tratamientos en la EA.

De forma general, los inhibidores o moduladores de la  $\gamma$ -secretasa muestran un perfil farmacocinético y una toxicidad indeseables, y por lo tanto los ensayos clínicos dirigidos al tratamiento de Alzheimer no han tenido éxito<sup>22</sup>.

▪ **Activación de la  $\alpha$ -secretasa:**

La enzima  $\alpha$ -secretasa es la responsable del procesamiento en condiciones no patológicas de la APP, por lo que su activación puede servir para el desarrollo de fármacos modificadores de la enfermedad<sup>14</sup>. Existen varios tipos de  $\alpha$ -secretasa, siendo ADAM10 de la familia A-desintegrina y metaloproteasa (ADAM) la más relevante fisiológicamente, ya que su potenciación en modelos de ratón reduce los niveles de A $\beta$ . Varios fármacos han llegado a etapas de ensayos clínicos para la EA, siendo el Etazolato uno de los más destacados por su capacidad para estimular la enzima  $\alpha$ -secretasa y proteger frente a la toxicidad producida por A $\beta$ . El compuesto NCT00951834, un compuesto polifenólico del té verde estimuló la  $\alpha$ -secretasa y redujo el depósito de A $\beta$  cerebral en ratones, por lo que se encuentra en fase de ensayos clínicos II/III. Por otro lado, la Briostatina potencia la actividad de la  $\alpha$ -secretasa y se encuentra también en fase II de ensayos clínicos para su posible uso en el tratamiento de la EA<sup>23</sup>.

Actualmente se está realizando el ensayo clínico en fase II del compuesto APH-1105 para el tratamiento de la EA de leve a moderada en adultos. Este compuesto presenta capacidad para modular la enzima  $\alpha$ -secretasa, y se pretende estudiar su eficacia y seguridad para su posible empleo futuro<sup>24</sup>.

Fármaco	Mecanismo de acción	Sujetos estudio	Objetivos	Resultados	Referencia
<b>NB-360</b>	Inhibidor BACE-1	Ratones transgénicos APPPS1xGL UT1Venus	Determinar si revierte formación de A $\beta$	La toxicidad no revirtió	(15)
<b>Verubecestat</b>	Inhibidor BACE-1	Pacientes con EA	Determinar si revierte formación de A $\beta$	El EC no finalizó por efectos adversos.	(16)
<b>Atabecestat</b>	Inhibidor BACE-1	Pacientes con EA y niveles anormales de A $\beta$	Determinar si revierte formación de A $\beta$	No retrasó la progresión clínica de la EA	(17)

<b>Lanabecestat</b>	Inhibidor BACE-1	Pacientes con diagnóstico temprano de Alzheimer	Determinar si revierte formación de A $\beta$	Se encuentra en fase II/III	(18)
<b>Elenbecestat</b>	Inhibidor BACE-1	Pacientes con diagnóstico temprano de Alzheimer	Determinar si revierte la formación de A $\beta$	Se encuentra en fase III	(18)
<b>SGMS-36</b>	Modulador de la $\gamma$ -secretasa	Ratones con mutación en APP	Determinar los niveles de A $\beta$	Redujo significativamente los niveles de A $\beta$ -42	(19)
<b>BSM-932418</b>	Modulador de la $\gamma$ -secretasa	Voluntarios sanos	Determinar los niveles de A $\beta$	No disminuyó significativamente A $\beta$	(21)
<b>DHEC</b>	Modulador de la $\gamma$ -secretasa	Ensayo <i>in vitro</i>	Determinar los niveles de A $\beta$	Inhibió significativamente la producción de proteína A $\beta$	(22)
<b>Semagacestat</b>	Modulador de la $\gamma$ -secretasa	Pacientes con EA leve-moderada	Determinar los niveles de A $\beta$	EC detenido por falta de eficacia y eventos adversos	(20)

**Tabla 2. Resumen y comparación de los compuestos estudiados en la estrategia de reducción de la síntesis de proteína  $\beta$ -amiloide mediante modulación enzimática**  
 Abreviaturas: BACE-1: enzima  $\beta$ -secretasa, EC: ensayo clínico, EA: Enfermedad de Alzheimer, A $\beta$ : proteína beta-amiloide, DHEC: Dihidroergocistina

## 5.2. Eliminación de las placas amiloides mediante la activación de sus enzimas de degradación

Esta vía consiste en el aclaramiento de los agregados y depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide que forman las placas seniles en el cerebro de pacientes con EA. Dentro de esta estrategia se han llevado a cabo numerosos estudios, como es el caso del Idol, una ubiquitina ligasa E3 que controla la expresión del receptor de LDL (LDLr) cerebral y está relacionada a su vez con el metabolismo de ApoE cerebral y la formación de placa amiloide. En este estudio, llevado a cabo en modelos de ratones con amiloidosis a los que se les eliminó Idol genéticamente, se informó que la inhibición farmacológica de Idol podría modular ApoE, un

importante modificador de la EA. La abundancia de ApoE se ha relacionado con la eliminación de proteína  $\beta$ -amiloide, debido a que ApoE contiene lipoproteínas plasmáticas que el receptor de superficie celular de LDL capta para su endocitosis. El Idol se expresa en la microglía y su inhibición provocó el aumento de proteína LDL en el cerebro de los ratones y en consecuencia el aumento de ApoE cerebral, así como la reducción de las placas amiloides. A pesar de que el mecanismo por el que el aumento de ApoE reduce las placas amiloides no se conoce exactamente, hay distintos modelos entre los que encontramos que la forma lipídica de ApoE facilita la eliminación de proteína  $\beta$ -amiloide de las placas seniles, o que la ApoE se une a A $\beta$  insoluble dificultando su absorción cerebral. Estudios posteriores han sugerido que la eliminación de A $\beta$  podría no depender de la ApoE, siendo el receptor de LDL el responsable de su eliminación al unirse directamente a A $\beta$  y afectar a su absorción cerebral<sup>25</sup>.

De hecho, un estudio distinto demuestra que uno de los receptores responsables del transporte de A $\beta$  a través de la BHE es la proteína 1 relacionada con el receptor de LDL (LRP1), ya que existe una fuerte correlación inversa entre la eliminación de LRP1 cerebral y la eliminación de A $\beta$  en la BHE de manera que al reducirse la eliminación de LRP1 en el cerebro se promueve la eliminación de A $\beta$  acumulado en placas seniles. Por tanto, el enfoque de este estudio es la búsqueda de factores que reduzcan la eliminación de LRP1, como es el caso de una enzima  $\alpha$ -secretasa, llamada también ADAM10, que se estudió *in vitro* e *in vivo* para evaluar cómo su inhibición influye en LRP1 y la eliminación de A $\beta$ . Se emplearon ratones transgénicos a los que se les indujeron una serie de mutaciones para conseguir la sobreproducción de A $\beta$  humano. Los resultados de este estudio demostraron que la administración del compuesto GI254023X, un inhibidor de ADAM10, reduce efectivamente la eliminación de LRP1 y provoca un aumento del aclaramiento de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en el cerebro del modelo animal. A pesar de ello, la disminución de los niveles cerebrales de A $\beta$  no fueron estadísticamente significativos, lo que atribuyen al corto periodo de tiempo que se aplicó el tratamiento. Sin embargo, sí que se obtuvo un aumento de la aparición de A $\beta$ 40 en plasma, lo que sugiere que la inhibición de ADAM10 facilita el tránsito de A $\beta$ 40 desde el cerebro hacia la periferia. Aunque haya limitaciones



como la falta de estudios en humanos, los investigadores instan a seguir estudiando esta vía que puede resultar beneficiosa en un futuro para la EA<sup>26</sup>.

En cuanto a la relación de ApoE con la eliminación de A $\beta$ , se ha demostrado en otro estudio que es el alelo 4 de ApoE (ApoE4) quien potencia dicha eliminación. Al acidificar los endosomas de los astrocitos ApoE4, LRP1 es atrapada en los compartimentos intracelulares evitando así su eliminación y, por tanto, provocando un aumento de la eliminación de A $\beta$ . La acidificación es provocada por la regulación negativa de NHE6, una proteína relacionada con el intercambiador de iones Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que controla el pH del interior de los endosomas regulando la acidez, situando de esta forma a los endosomas como impulsores de la enfermedad en caso de que se produzca una disfunción en ellos. Este estudio llevado a cabo en ratones sugiere la regulación de la proteína NHE6 como una terapia emergente en la EA con capacidad de eliminar los depósitos de A $\beta$  cerebrales<sup>26, 27</sup>.

Una vertiente distinta dentro de la estrategia de eliminación de A $\beta$  en las placas seniles es la que estudia las desacetilasas de histonas (HDAC), relevantes en enfermedades neurológicas como la EA debido a su papel como modificadores no genéticos. De todas las HDAC, la expresión de HDAC3 es mayor en regiones cerebrales implicadas en la memoria y el aprendizaje, y juega un importante papel en el procesamiento de APP amiloidogénica. Esto se puede ver en el siguiente estudio donde el inhibidor selectivo de HDAC3, RGFP-966, administrado a ratones presenta, entre otros mecanismos, el aumento de los niveles de la enzima Neprilisina en plasma encargada de la degradación de A $\beta$ , la disminución de los niveles de proteína de A $\beta$ -42 en el cerebro y periferia, y la mejora de la memoria y el aprendizaje espacial. Estos datos nos sugieren que la HDAC3 juega un importante papel en la patología de la EA que se modeliza en animales, por lo que su inhibición desde el punto de vista clínico podría tener potencial para desarrollos de nuevas terapias para la EA<sup>28</sup>.

Por otro lado, la endopeptidasa Neprilisina (NEP) anteriormente mencionada es una proteasa que digiere A $\beta$  y su actividad se reduce de forma dependiente a la edad en el cerebro tanto de roedores como de humanos, por lo que su estimulación podría ser efectiva para la terapia y prevención de la EA. Ciertos

enfoques farmacológicos llevados a cabo para modular la actividad de NEP revelaron que la Somatostatina y determinados polifenoles regulan su actividad, además los mecanismos epigenéticos mediante la inhibición de HDAC también parecen ser una estrategia importante para aumentar los niveles de la enzima como se puede ver en el estudio anteriormente mencionado.

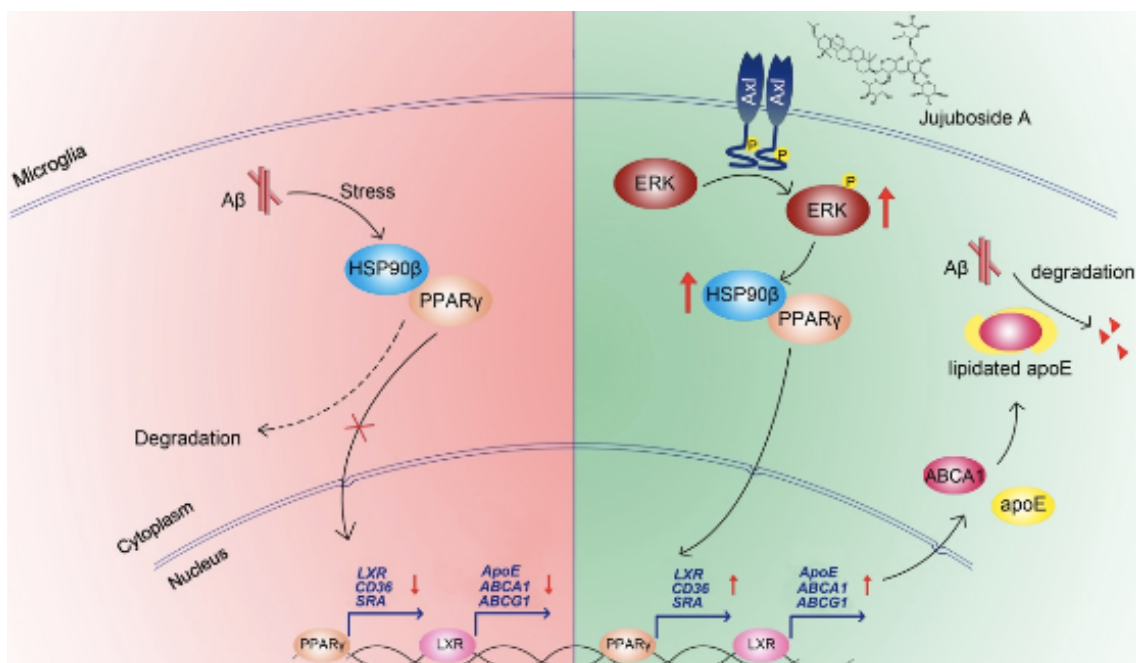
En el siguiente estudio se investigó la participación de los precursores y derivados de serotonina en la regulación de NEP y se descubrió que el metabolito final de la serotonina, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), considerado como un metabolito inactivo hasta el momento, presenta potencial para reducir significativamente los depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide mediante su degradación. El metabolito 5-HIAA resultó ser, por tanto, un metabolito activo y se estudió en el cerebro de ratones a los que se les añadió un transgén encargado de producir la APP de Alzheimer humana. Los resultados revelan que el 5-HIAA presenta capacidad para inducir la expresión de NEP y, por consiguiente, capacidad para degradar los depósitos de  $\beta$ -amiloide. Además, no se descartó la posibilidad de que 5-HIAA pueda promover la actividad de otras enzimas con potencial degradante de  $A\beta$ .

La administración intranasal del metabolito 5-HIAA durante 5 días consecutivos en el modelo de ratón redujo significativamente la concentración de  $A\beta$  cerebral y contrarrestó los déficits de memoria de los ratones. La administración intranasal se produjo para evitar limitaciones en el paso de la BHE por lo que un tratamiento a muy largo plazo podría suponer un problema. Para solventar el problema se usaron precursores de 5-HIAA como el triptófano, 5-HTP y la serotonina que también parecen inducir la expresión de NEP mediante la síntesis posterior del metabolito 5-HIAA. Por lo tanto, este estudio es considerado la primera demostración de que la terapia con 5-HIAA aumenta la degradación de  $A\beta$  cerebral mediante el aumento de la expresión de NEP<sup>29</sup>.

Siguiendo la estrategia de eliminación de proteína  $\beta$ -amiloide del cerebro, se ha investigado el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS), una de las principales vías de degradación de proteínas en las células y que podría servir para la eliminación de los depósitos de  $A\beta$  cerebrales. Este estudio se realizó cruzando ratones transgénicos para la EA con ratones que expresaban UBB+1, una

ubiquitina mutante, el resultado fue una disminución de la carga de A $\beta$  cerebral sin modificación de las alteraciones cognitivas que se observaban en los ratones transgénicos. El mecanismo por el que UBB+1 reduce la carga de A $\beta$  en el cerebro es múltiple y depende de: 1) un rescate parcial de la actividad de  $\gamma$ -secretasa, 2) la inducción de chaperonas moleculares que mejoran la eliminación de A $\beta$  cerebral y reducen su agregación, que sería la vía que nos interesa, y 3) cambios en el transporte intracelular, la localización y la vía endolisosómica. Por ello, a pesar de no reducir el déficit en el comportamiento de los ratones, es una vía que debería investigarse más detalladamente<sup>30</sup>.

Finalmente, se investigó el trabajo sobre el compuesto Jujuboside A (JuA) que mediante la regulación positiva de HSP90 y potencia el aclaramiento de A $\beta$ -42. En el SNC, la microglía es la encargada de captar A $\beta$  soluble o fibrilar y degradarlo a través del proteosoma, por lo que una causa del aumento de los niveles de A $\beta$  podría deberse a la disminución de su aclaramiento por el proteosoma. La activación de la microglía es regulada en condiciones normales y patológicas por el receptor y activado por proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), que se encuentra reducido en el cerebro de ratones modificados genéticamente para simular determinados aspectos neuropatológicos de la EA, así como en pacientes con EA. Su activación permite por un lado mejorar la fagocitosis de A $\beta$  por la microglía, y por otro inducir la expresión de ApoE, lo que aumenta el nivel de la forma lipídica de ApoE y facilita por tanto la degradación de A $\beta$  solubles. PPAR $\gamma$  se encuentra relacionada con una chaperona molecular que es esencial para el plegamiento, la maduración y la estabilidad de varias proteínas, la HSP90. La sobreexpresión de HSP90 en modelos animales con EA suprime las etapas de autoensamblaje de A $\beta$ , mejorando la fagocitosis y la degradación de A $\beta$ 42 por microglía tanto *in vivo* como *in vitro* y, por lo tanto, su activación farmacológica podría funcionar como terapia. Sin embargo, la exposición permanente a A $\beta$ 42 provoca una disminución de los niveles de HSP90 y PPAR $\gamma$  e impide las funciones de ambos. Este mecanismo se puede ver en la siguiente imagen:



**Figura 3. Mecanismo propuesto para la eliminación de Aβ mediante el compuesto Jujuboside A.**

En la imagen podemos ver como JuA aumenta la expresión de HSP90 y mantiene la estabilidad de PPARγ, mejorando el aclaramiento de Aβ en microglía. La imagen ha sido obtenida del artículo "Jujuboside A promotes Aβ clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPARγ pathway". 2018. Mu Zhang y cols.

Todo ello llevó al estudio de JuA, una saponina triterpénica que en el presente estudio demostró restablecer la función de PPARγ al mejorar la expresión de HSP90. Además, el tratamiento con JuA promovió la eliminación de Aβ42 por acción de la microglía y mejoró el déficit cognitivo en ratones <sup>31</sup>.

Fármaco	Mecanismo de acción	Sujeto estudio	Objetivo	Resultados	Referencias
Inhibidor de Idol	Mecanismo relacionado con ApoE y LDLr	Ratones con mutación en Idol	Determinar si eliminaba eficazmente Aβ	Eliminación de Aβ	(25)
GI254023X	Reduce la eliminación de LRP1 y provoca aumento del aclaramiento de Aβ	Ratones transgénicos que sobreexpresan la producción de Aβ humano	Búsqueda de compuestos que reduzcan la eliminación de LRP1	La disminución de los niveles de Aβ no fueron estadísticamente significativos	(26)

<b>RGFP-966</b>	Aumenta niveles de NEP al inhibir selectivamente HDAC3	Ratones triple transgénicos (3xTg-AD)	Estudio de la eficacia de RGFP-966 en la EA	Aumento de la degradación de A $\beta$ en la periferia	(28)
<b>5-HIAA</b>	Aumenta la expresión de NEP	Ratones con mutación en APP	Búsqueda de compuestos que potencien la expresión de NEP	Aumento de la degradación de A $\beta$ cerebral	(29)
<b>UBB+1</b>	Múltiples mecanismos: eliminación de A $\beta$ y reducción de su agregación	Ratones con mutación APPPS1/UBB1+	Verificar que mediante esta vía se produce la eliminación de A $\beta$	Redujo la carga de A $\beta$ cerebral sin mejorar la capacidad de memoria en ratones	(30)
<b>JuA</b>	Regula positivamente HSP90→aclaramiento de A $\beta$ -42	Ratones transgénicos APP/PS1	Determinar la eficacia de JuA en el tratamiento de Alzheimer	Promovió la eliminación de A $\beta$ -42 y mejoró la capacidad de memoria y aprendizaje de los ratones mediante la prueba de reconocimiento de objetos	(31)

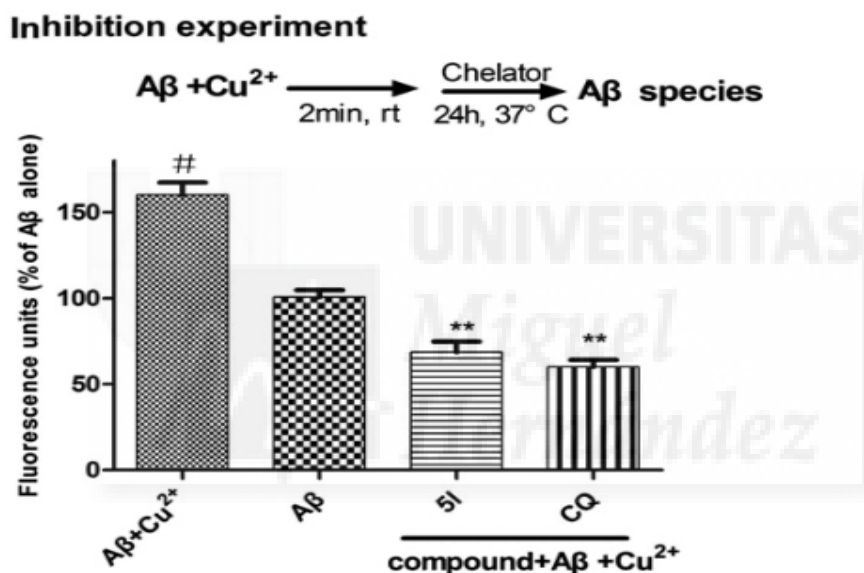
**Tabla 3. Resumen y comparación de los compuestos estudiados en la estrategia de eliminación de las placas amiloides mediante la activación de sus enzimas de degradación**

*Abreviaturas: LDLr: receptor de LDL cerebral, A $\beta$ : proteína beta-amiloide, LRP1: proteína 1 relacionada con el receptor LDL, NEP: Endopeptidasa Neprilisina, HDAC3: Desacetilasa de histonas-3, 5-HIAA: Ácido 5-hidroindolacético, JuA: Jujuboside A, APP: proteína precursora amiloide*

### 5.3. Reducción de la agregación de la proteína beta amiloide

Finalmente, esta última estrategia busca reducir la agregación de los péptidos  $\beta$ -amiloide para evitar la actividad neurotóxica que provocan. Anteriormente se ha mencionado el estudio sobre el sistema UPS, en el que uno de los mecanismos consistía en la reducción de la agregación de A $\beta$  cerebral, siendo una vertiente de investigación para promover el tratamiento de la EA <sup>30</sup>. En esta línea de investigación cobran importancia los iones metálicos y su acumulación en el cerebro de pacientes con EA, como se pudo observar de un estudio que sugería que la alta concentración de iones metálicos como Cu, Fe y Zn se relaciona con muchos aspectos críticos de la EA. Por tanto, la reducción de su

concentración en el cerebro mediante su quelación podría ser un enfoque para el tratamiento de esta patología. En el presente estudio se propone un abanico de compuestos derivados del ácido cinámico que contienen el resto N-benzyl pyridinium, y que actúan sobre distintos objetivos entre los que se encuentra la reducción de la agregación de proteína  $\beta$ -amiloide. Teniendo como referencia la Curcumina, de la que se conoce su actividad inhibitoria de la autoagregación de  $A\beta$ , se compararon dichos compuestos para determinar su actividad entre los que destacó el compuesto 5I, el cual aparte de una buena capacidad de quelación de metales, presentó una inhibición significativa de la agregación de  $A\beta$  inducida por  $Cu^{2+}$ <sup>32</sup>.



**Figura 4. Imagen representativa de la inhibición de la agregación de  $A\beta$  inducida por  $Cu^{2+}$  por el compuesto 5I en comparación con Clioquinol**

Imagen extraída del artículo: "Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease". 2017. Jin-Shuai Lan y cols.

Abreviaturas: CQ: Clioquinol,  $Cu^{2+}$ : cobre (II)

Por otra parte, se realizó una investigación distinta en la que también se sintetizaron nuevos compuestos híbridos del Ácido tacrino-ferúlico (8a-e) los cuales incluyen Tacrina, una fracción de ácido ferúlico y un fragmento de Piperazina, para estudiar in vitro su actividad inhibitoria de ACE y BuCE, la reducción de la agregación de  $A\beta$  autoinducida y la quelación de  $Cu^{2+}$ . El estudio se llevó a cabo al igual que el anteriormente mencionado, comparando la

actividad de los nuevos compuestos sintetizados con Curcumina y Ácido ferúlico, y los resultados mostraron a todos los compuestos con capacidad para realizar las 3 funciones. Sin embargo, el compuesto 8d presentó un mayor potencial para la inhibición de ACE y BuCE, además de una buena capacidad de inhibir la autoagregación de A $\beta$  y un buen potencial para la quelación de Cu<sup>2+</sup>. Esta investigación verifica que el exceso de los biometales más importantes, en particular Cu y Zn, afectan críticamente a la capacidad de agregación de los péptidos  $\beta$ -amiloide promoviéndola, por lo que los compuestos que presenten propiedades quelantes de iones metálicos podrían servir para el tratamiento de la EA<sup>33</sup>. A pesar de que ambos estudios se llevaron a cabo in vitro, los resultados permiten a los investigadores pensar en este tipo de compuestos como una nueva línea de investigación para la generación de nuevos fármacos en la EA<sup>32, 33</sup>.

En referencia a la importancia que los quelantes biometálicos están recibiendo para el tratamiento de la EA y en consonancia con los estudios anteriormente mencionados, un trabajo reciente trata de evaluar una nueva serie de inhibidores de la fosfodiesterasa-9 (PDE9) con capacidad de quelar iones metálicos. La vía de señalización No/sGC/cGMP (nitric oxide/soluble guanylyl cyclase/cyclic guanosine monophosphate) en el hipocampo y la corteza cerebral representa un papel importante para la regulación de la transmisión sináptica y la plasticidad, y por tanto son fundamentales para el aprendizaje y la memoria. La inhibición de esta vía altera la expresión y actividad de ciertas enzimas entre las que encontramos la fosfodiesterasa, que contribuye al desarrollo de la neuropatología en la EA. Por ello, el desarrollo de fármacos inhibidores de PDE9 como los conocidos hasta ahora PF-04447943 y BI-409306 se han probado en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de esta enfermedad. Asimismo, en dicho estudio se descubre que la concentración de iones metálicos en el cerebro de personas afectadas de EA es sustancialmente mayor que en el cerebro de pacientes de la misma edad sin la patología. Este hecho junto con las evidencias de estudios anteriores que apuntan a que a mayor cantidad de iones metálicos se promueve en mayor medida la agregación de A $\beta$ , sugiere un enfoque lógico para el tratamiento de esta patología.

Por todo ello, el uso de ligandos dirigidos a múltiples objetivos (MTDL) podría ser un método apropiado para abordar la EA debido a su etiología multifactorial. La síntesis de agentes multifuncionales que combinen la capacidad quelante de biometales con la inhibición de PDE9 se evalúa en dicho estudio comparando su actividad con el compuesto de referencia, el Clioquinol. Entre los agentes sintetizados y después de su estudio comparativo, cobra importancia el compuesto 16 por su permeabilidad a la BHE lo que lo convierte en un compuesto viable. Además, en los ensayos *in vitro* demostró tener capacidad de inhibir la actividad de PDE9, inhibir significativamente la agregación de A $\beta$  inducida por Cu $^{2+}$  y, adicionalmente a ello, también demostró poseer cierta actividad en la desagregación de fibrillas A $\beta$  ya formadas<sup>34</sup>.

Asimismo, los estudios basados en añadir distintos tipos de moléculas activas a un compuesto para atacar distintos objetivos en el tratamiento de la EA han sido muy relevantes. Es el caso de la investigación llevada a cabo *in vitro* con el Donepezilo, al añadirle restos heterocíclicos activos como derivados de bencimidazol y benzofurano. El Donepezilo por sí mismo tiene actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa, a ello se suma una capacidad potencial para inhibir la agregación de péptidos A $\beta$ , actividad antioxidante y propiedades quelantes de metales. Los resultados de este estudio mostraron una inhibición moderada de la autoagregación de A $\beta$ . Por otra parte, también se tuvo en consideración el papel conocido de los metales como el cobre en la agregación inducida de A $\beta$  y formación de placas amiloides. La quelación de cobre (II) puede interferir en la agregación de péptidos A $\beta$  como mencionaba el estudio anterior. En este caso algunos compuestos generados a partir del Donepezilo mostraron una capacidad mejorada de inhibir la agregación de A $\beta$  inducida por Cu $^{2+}$  al presentar propiedades quelantes de metales<sup>35</sup>.

Para encontrar compuestos que reduzcan la agregación de A $\beta$ , también se han investigado los mecanismos de fármacos ya conocidos para otras patologías. Es el caso de los fármacos D-Cicloserina y Pirazinamida utilizados para el tratamiento de la tuberculosis y que presentan una capacidad antiagregante de la proteína A $\beta$  con potencial para tratar el Alzheimer. El estudio se realizó *in vitro* y estableció que ambos fármacos inhiben la agregación de A $\beta$ .



La Pirazinamida resultó tener una capacidad de inhibición más potente que la D-Cicloserina, probablemente debido a la presencia de un anillo heteroaromático con un grupo amino lateral en su estructura, que hace que se prolongue la etapa de nucleación de la agregación amiloide por una unión relativamente fuerte con la región de proteína propensa a formar los depósitos de amiloide <sup>36</sup>.

La búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de la EA también pasa por el estudio de compuestos bioactivos derivados de fuentes naturales, como es el caso de la investigación sobre el potencial antiagregante A $\beta$  de las algas marinas *Padina gymnospora*. El resultado de este estudio *in vitro* mostró que el extracto de acetona de *P.gymnospora* posee una excelente actividad antioxidante e inhibidora de la colinesterasa. Además, se verificaron sus propiedades inhibidoras de la agregación A $\beta$ . Los investigadores atribuyen las propiedades antiagregantes de *P.gymnospora* a la presencia de  $\alpha$ -bisabolol, por lo que esta molécula bioactiva surge como novedad y se siguen realizando estudios adicionales para verificar sus propiedades beneficiosas en la EA <sup>37</sup>.

La planta *Guettarda speciosa* también presenta actividad como inhibidora de la agregación de A $\beta$  *in vitro* y, a pesar de ser el único estudio que haya demostrado su potencial terapéutico en este campo, es importante tenerla en consideración para un posterior desarrollo de agentes vegetales nuevos y activos en el tratamiento de la EA<sup>38</sup>.

Fármaco	Mecanismo de acción	Sujeto estudio	Objetivos	Resultados	Referencia
<b>5l</b>	Quelante de metales e inhibición de agregación A $\beta$	Ensayo <i>in vitro</i>	Comparación de compuestos para determinar su capacidad de inhibir la agregación	Inhibió significativamente la agregación de A $\beta$ inducida por Cu $^{2+}$	(32)
<b>8d</b>	Inhibidor ACE y BuCE, antiagregante A $\beta$ y quelante de metales	Ensayo <i>in vitro</i>	Estudio de sus distintos mecanismos de acción	Presentó potencial para realizar las 3 funciones	(33)
<b>Pirazinamida</b>	Prolongación de la etapa de nucleación de la agregación A $\beta$	Ensayo <i>in vitro</i>	Estudio de su capacidad de inhibición de A $\beta$	Capacidad para inhibir la agregación A $\beta$	(36)
<b>P.gymnospora</b>	Inhibidor de la agregación A $\beta$	Ensayo <i>in vitro</i>	Estudio del potencial antiagregante A $\beta$ en fuentes naturales	Potencial inhibidor de la agregación A $\beta$	(37)
<b>G.speciosa</b>	Inhibidor de la agregación A $\beta$	Ensayo <i>in vitro</i>	Estudio del potencial antiagregante A $\beta$ en fuentes naturales	Potencial antiagregante A $\beta$ <i>in vitro</i>	(38)
<b>Compuesto 16</b>	Inhibidor PDE-9 con capacidad quelante de iones metálicos	Ensayo <i>in vitro</i>	Evaluación de la capacidad de quelación de iones metálicos	Inhibió la agregación de A $\beta$ inducida por Cu $^{2+}$ y desagregó las fibrillas A $\beta$ ya formadas.	(34)
<b>Derivado Donepezilo</b>	Inhibidor ACE, inhibidor de la agregación A $\beta$ y quelante de metales	Ensayo <i>in vitro</i>	Medir su capacidad de inhibir la agregación A $\beta$	Inhibición moderada de la autoagregación A $\beta$	(35)

**Tabla 4. Resumen y comparación de los compuestos estudiados en la estrategia de reducir la agregación de la proteína beta amiloide**

Abreviaturas: A $\beta$ : proteína beta-amiloide, Cu $^{2+}$ : Cobre (II), ACE: Acetilcolinesterasa, BuCE: butilcolinesterasa, PDE9: inhibidores de la fosfodiesterasa-9

## 6. DISCUSIÓN

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que representa la demencia más común actualmente. Se produce por el deterioro de funciones cerebrales determinado principalmente por la formación de placas seniles formadas por depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide, y por la formación de ovillos neurofibrilares compuestos por proteína Tau hiperfosforilada. Los fármacos que existen actualmente para tratar la EA son los inhibidores de la acetilcolinesterasa y los moduladores de glutamato, y se basan exclusivamente en el tratamiento de los síntomas mediante la modulación de los neurotransmisores implicados. Debido a la limitación de la terapia farmacológica empleada en la EA, se han diseñado diversas estrategias para tratar de modificar su curso clínico, destacando aquellas dirigidas a interferir el procesamiento anómalo de la proteína precursora de amiloide que se han seleccionado en este trabajo y cuyos resultados se discuten a continuación.

La estrategia orientada a la reducción de proteína  $\beta$ -amiloide mediante su inhibición enzimática presenta distintas vertientes debido a la implicación de las diversas enzimas secretasas. El desarrollo de fármacos dirigidos a inhibir la enzima  $\beta$ -secretasa ha sido la principal metodología para abordar la EA. A pesar de parecer compuestos prometedores conforme a la evidencia recopilada en los últimos años, la mayoría de ellos no han conseguido llegar a las etapas finales de ensayos clínicos como Verubecestat y Atabecestat, que finalmente mostraron un perfil de seguridad insuficiente y una reducción insignificante de la producción de  $A\beta$ . Por otro lado, la inhibición inespecífica de la enzima  $\gamma$ -secretasa, encargada del procesamiento de distintas proteínas, dio lugar a eventos adversos que suponen un mayor riesgo que beneficio, por lo que se optó por la búsqueda de compuestos que la modularan en vez de inhibirla. Muestra de ello son los compuestos DHEC y SGMS-36 que consiguieron reducir la producción de  $A\beta$  a falta de estudios en humanos que lo avalen. Finalmente, la potenciación de la enzima  $\alpha$ -secretasa para promover el procesamiento fisiológico de la APP es una estrategia con distintos compuestos que han conseguido cierta eficacia, donde actualmente destaca APH-1105 por estar en fase II de ensayos clínicos. Asimismo, las estrategias dirigidas a las enzimas secretasas indican la

necesidad de diagnosticar el Alzheimer en las etapas iniciales de la enfermedad. En este sentido cabe destacar que una vez formadas las placas neuríticas, la toxicidad no revierte en modelos de ratones incluso después de tratamientos prolongados, por lo que carecer de biomarcadores predictivos de la EA es uno de los mayores retos para poder abordar de forma más exitosa esta patología.

Por otro lado, encontramos la estrategia de eliminación de los depósitos de proteína en las placas amiloides mediante la activación de sus enzimas de degradación, que puede llevarse a cabo mediante la activación de enzimas encargadas de degradar las placas amiloides como la Neprililina. Aquí cobró especial importancia el metabolito final de la serotonina (5-HIAA) al ser administrado a ratones, ya que adicionalmente a aumentar la degradación de A $\beta$  cerebral produjo una mejora cognitiva en el cerebro de éstos. Asimismo, el compuesto RGFP-966 también consiguió aumentar la degradación de A $\beta$  cerebral aumentando la expresión de NEP, convirtiendo a los inhibidores de HDAC3 en una diana como posibles futuros tratamientos en la EA que conviene seguir investigando. Por otro lado, cobran importancia APOE4 y LRP1 por su participación en el transporte de A $\beta$  cerebral, ya que mediante su modulación también se puede conseguir la eliminación de agregados de dicha proteína. Es el caso de JuA que produjo una mejora en el déficit cognitivo al ser administrado a ratones, y a pesar de la falta de estudios en humanos es un compuesto prometedor para el futuro.

Finalmente, la última estrategia dirigida a la proteína  $\beta$ -amiloide está enfocada a reducir su agregación. Varios estudios han demostrado que la acumulación de iones metálicos como Cu<sup>2+</sup> y Zn en el cerebro está ampliamente relacionada con la potenciación de la agregación de proteína  $\beta$ -amiloide. Por ello, la búsqueda de fármacos que tengan capacidad quelante de metales suponen un enfoque prometedor. Es el caso de los compuestos 8d, 5l, el compuesto 16 y el derivado de Donepezilo, que a pesar de ser ensayos in vitro demuestran tener un gran potencial para reducir la agregación de A $\beta$  mediante la quelación de iones metálicos, lo que evita en última instancia la formación de los depósitos característicos en forma de placas seniles, reduciendo así el daño neuronal asociado. Esta estrategia resulta muy prometedora por lo que muchas de las

investigaciones en nuevos tratamientos para la EA centran su diana en la quelación de los iones metálicos.

A pesar de todos los estudios llevados a cabo, sigue sin existir un tratamiento seguro y eficaz que sea capaz de modificar el curso clínico de la EA. Con la información de la que disponemos actualmente, sí se podría sugerir que las aproximaciones que empleen fármacos que posean varios mecanismos de acción, o la combinación de estos, pueden constituir una avenida interesante en el abordaje de la EA desde un punto de vista etiopatogénico. En este trabajo se pueden encontrar el compuesto 16 y el 8d, ambos inhibidores de ACE que adicionalmente presentan capacidad quelante de metales con la que reducen la agregación de A $\beta$  e impiden que se genere la neurotoxicidad característica de los depósitos amiloides. De esta manera, pueden ser compuestos de interés que merecen seguir estudiándose como posibles tratamientos para conseguir finalmente una terapia que no sólo mejore desde el punto de vista cognitivo al paciente, sino que también logre cambiar el curso de la evolución neurodegenerativa de la EA. Finalmente, también cabe destacar que además de las terapias dirigidas hacia la proteína  $\beta$ -amiloide en las que se centra este trabajo, existen otras aproximaciones o dianas sobre las que se está investigando como posible tratamiento en la EA, como son la inmunoterapia o las estrategias dirigidas a la proteína Tau.

## 7. CONCLUSIONES

Solapando toda la información recogida para realizar este trabajo, se ha llegado a diferentes conclusiones.

- La importancia del diagnóstico temprano de la EA mediante la identificación de biomarcadores que ayuden a su identificación temprana y a la selección de pacientes a incluir en los ensayos clínicos.
- Las limitaciones existentes actualmente en el tratamiento de la EA y la necesidad de establecer nuevas estrategias que puedan modificar el curso clínico de la enfermedad.
- La estrategia dirigida a la inhibición de la síntesis de proteína  $\beta$ -amiloide ha sido la línea de investigación más estudiada, pero la que más fracasos ha obtenido cuando se trasladó a la clínica.
- La estrategia centrada en la eliminación de placas de proteína A $\beta$  presenta ciertos compuestos que merecen la pena seguir siendo estudiados.
- Los resultados de la estrategia dirigida a la inhibición de la agregación de proteína  $\beta$ -amiloide ofrecen una visión muy prometedora en el futuro por la aparición de compuestos con potencial para el tratamiento de la EA.
- Debido a la naturaleza multifactorial de la EA, el desarrollo o la combinación de fármacos con múltiples objetivos terapéuticos podría ser el futuro del tratamiento, ya que permitiría actuar a través de varias estrategias abarcando los distintos procesos neuropatológicos que producen la EA.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. *Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's and Dementia, 2016. **12**(4): p. 459-509.
2. Florez, J., *Farmacología humana*. 6 ed. 2014. 568-577.
3. Laura Tuneu, M.R., Montse Sardans, Elisa Paredes, Ana Gaona, *Guía de seguimiento farmacoterapéutico de los pacientes con Alzheimer*. 2018.
4. Setó-Salvia N, C.J., *Genetics of Alzheimer's disease*. Rev Neurol, 2010. **50**(6): p. 360-364.
5. *10 early signs and symptoms of Alzheimer's*. 2020; Available from: [https://alz.org/alzheimers-dementia/10\\_signs](https://alz.org/alzheimers-dementia/10_signs)
6. *Diagnosis*. 2018; Available from: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/diagnostico?lang=es-MX>.
7. Valls-Pedret, C., J.L. Molinuevo, and L. Rami, [Early diagnosis of Alzheimer's disease: the prodromal and preclinical phase]. Rev Neurol, 2010. **51**(8): p. 471-80.
8. Jorge López-Álvarez, L.F.A.-O., *Nuevos criterios diagnósticos de la demencia y la enfermedad de Alzheimer: una visión desde la psicogeriatría*. Psicogeriatría, 2015. **5**(1): p. 3-14.
9. García-Ribas G, L.-S.M.J., García-Caldentey J, *Biomarkers in Alzheimer's disease*. Rev Neurol, 2014. **58**(7): p. 308-17.
10. Kollmer, M., et al., *Cryo-EM structure and polymorphism of Abeta amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4760.
11. F.J, M.-L., *El péptido Beta-amiloide: mecanismos de neurotoxicidad. Neuroprotección por antioxidantes y estrógenos*. Rev Esp Geriatr Gerontol, 2001. **36**(2): p. 109-116.
12. Silvia Gra Menéndez, N.P.P., Juan de Jesús Llibre Rodríguez, *Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer*. rev Cubana Invest Biomed, 2002. **21**(4).
13. Teresa García, D.J., *Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer*. Gac Méd Méx, 2004. **140**(3).
14. Folch, J., et al., *Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating beta-amyloid protein*. Neurologia, 2018. **33**(1): p. 47-58.
15. Peters, F., et al., *BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of beta-amyloid pathology*. Acta Neuropathol, 2018. **135**(5): p. 695-710.
16. Egan, M.F., et al., *Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. N Engl J Med, 2018. **378**(18): p. 1691-1703.
17. Timmers, M., et al., *Pharmacodynamics of atabecestat (JNJ-54861911), an oral BACE1 inhibitor in patients with early Alzheimer's disease: randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Alzheimers Res Ther, 2018. **10**(1): p. 85.
18. Moussa-Pacha, N.M., et al., *BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease*. Med Res Rev, 2020. **40**(1): p. 339-384.
19. Raven, F., et al., *Soluble Gamma-secretase Modulators Attenuate Alzheimer's beta-amyloid Pathology and Induce Conformational Changes in Presenilin 1*. EBioMedicine, 2017. **24**: p. 93-101.
20. Alzforum. *Semagacestat*. Available from: <https://www.alzforum.org/therapeutics/semagacestat>.
21. Soares, H.D., et al., *The gamma-Secretase Modulator, BMS-932481, Modulates Abeta Peptides in the Plasma and Cerebrospinal Fluid of Healthy Volunteers*. J Pharmacol Exp Ther, 2016. **358**(1): p. 138-50.
22. Lei, X., et al., *The FDA-approved natural product dihydroergocristine reduces the production of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16541.
23. MacLeod, R., et al., *The role and therapeutic targeting of alpha-, beta- and gamma-secretase in Alzheimer's disease*. Future Sci OA, 2015. **1**(3): p. FSO11.
24. *Study of APH-1105 in Patients with mild to moderate Alzheimer's disease*. 2019.
25. Choi, J., et al., *The E3 ubiquitin ligase Idol controls brain LDL receptor expression, ApoE clearance, and Abeta amyloidosis*. Sci Transl Med, 2015. **7**(314): p. 314ra184.

26. Shackleton, B., F. Crawford, and C. Bachmeier, *Inhibition of ADAM10 promotes the clearance of Abeta across the BBB by reducing LRP1 ectodomain shedding*. *Fluids Barriers CNS*, 2016. **13**(1): p. 14.
27. Prasad, H. and R. Rao, *Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(28): p. E6640-E6649.
28. Janczura, K.J., et al., *Inhibition of HDAC3 reverses Alzheimer's disease-related pathologies in vitro and in the 3xTg-AD mouse model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(47): p. E11148-E11157.
29. Klein, C., et al., *5-HIAA induces neprilysin to ameliorate pathophysiology and symptoms in a mouse model for Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathol Commun*, 2018. **6**(1): p. 136.
30. Verheijen, B.M., et al., *Paradoxical effects of mutant ubiquitin on Abeta plaque formation in an Alzheimer mouse model*. *Neurobiol Aging*, 2018. **72**: p. 62-71.
31. Zhang, M., et al., *Jujuboside A promotes Abeta clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPARgamma pathway*. *Theranostics*, 2018. **8**(15): p. 4262-4278.
32. Lan, J.S., et al., *Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017. **32**(1): p. 776-788.
33. Fu, Y., et al., *Design, Synthesis and Evaluation of Novel Tacrine-Ferulic Acid Hybrids as Multifunctional Drug Candidates against Alzheimer's Disease*. *Molecules*, 2016. **21**(10).
34. Su, T., et al., *Discovery of novel PDE9 inhibitors capable of inhibiting Abeta aggregation as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 21826.
35. Piemontese, L., et al., *Donepezil structure-based hybrids as potential multifunctional anti-Alzheimer's drug candidates*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018. **33**(1): p. 1212-1224.
36. Chaturvedi, S.K., et al., *Unraveling Comparative Anti-Amyloidogenic Behavior of Pyrazinamide and D-Cycloserine: A Mechanistic Biophysical Insight*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0136528.
37. Shanmuganathan, B., et al., *Antiaggregation Potential of Padina gymnospora against the Toxic Alzheimer's Beta-Amyloid Peptide 25-35 and Cholinesterase Inhibitory Property of Its Bioactive Compounds*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0141708.
38. Tan, M.A., et al., *Anti-Amyloidogenic and Cyclooxygenase Inhibitory Activity of Guettarda speciosa*. *Molecules*, 2019. **24**(22).