



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Inhibidores de la quinasa GSK3 β en el
tratamiento de la enfermedad de Alzheimer**

Autor: Carlos Julio Pascual Carrillo

D.N.I.: 05460803M

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Junio 2016

ÍNDICE

1. Resumen.....	3
2. Introducción y antecedentes.....	3
2.1. ¿Qué es la enfermedad de Alzheimer?	3
2.1.1. Etiopatogenia.....	3
2.1.2. Tratamientos.....	5
3. Objetivos.....	5
4. Metodología.....	6
5. Resultados y discusión.....	6
5.1. Quinasa GSK3 β	6
5.1.1. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3).....	6
5.1.2. Isoformas GSK3.....	6
5.1.3. Características estructurales de GSK3 β	7
5.1.4. Mecanismo de fosforilación.....	7
5.2. GSK3 β y la Enfermedad de Alzheimer.....	8
5.2.1. Mecanismo β -amiloide e hiperfosforilación de tau.....	8
5.2.1.1. Vía IGF-I y Wnt.....	9
5.2.2. Vía estrés oxidativo	10
5.2.2.1. Vía de regulación transcripcional Nrf2-ARE.....	10
5.3. Inhibidores de GSK3 β como dianas terapéuticas para el tratamiento de EA.....	11
5.3.1. Cationes Metálicos.....	12
5.3.2. Competidores de ATP.....	12
5.3.2.1. Naturales.....	13
5.3.2.2. Sintéticos.....	14
5.3.3. No competidores de ATP.....	15
5.3.3.1. Naturales.....	16
5.3.3.2. Sintéticos.....	17
5.3.4. Inhibidores similares a péptidos.....	17
6. Conclusiones.....	18
7. Bibliografía.....	18

1. Resumen

La Glucogeno Sintasa Quinasa 3 β (GSK3 β) es una serin/treonin quinasa, identificada como piedra angular en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer (EA) debido a su relación con el mecanismo fisiopatológico de las proteínas tau y β -amiloide, señas de identidad de la enfermedad.

Los diversos inhibidores de GSK3 β han surgido en la última década como futuras promesas para el tratamiento de la enfermedad, destacando el Tideglusib, molécula que más lejos ha llegado en los ensayos clínicos, aunque según los últimos estudios no haya demostrado ningún beneficio clínico.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo, proteína tau, quinasa GSK3 β , inhibidores GSK3 β , proteína β -amiloide.

2. Introducción y antecedentes

2.1. ¿Qué es la enfermedad de Alzheimer?

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al grupo de patologías denominadas generalmente como **demencias**, descrita por primera vez por el psiquiatra alemán, Alois Alzheimer, en 1906.

El término demencia hace alusión a una pérdida irreversible de capacidades cognitivas (memoria, capacidad de expresar, cálculo, comunicación...etc), lo que conlleva la aparición de un estado de dependencia total para el desarrollo de actividades cotidianas, sociales y laborales por parte del paciente y finalmente a la muerte¹. Como no todas las demencias son debidas a esta enfermedad, se debe de definir por tanto la EA como una demencia que se caracteriza por cambios citohistológicos e inmunohistoquímicos característicos¹. En los estadios iniciales, los pacientes suelen tener intactas sus capacidades intelectuales y de conciencia, hecho que da lugar a que esta enfermedad sea infradiagnosticada.

La EA, como cualquier otro tipo de demencia, es una enfermedad propia de las edades avanzadas y aunque las hay precoces que comienzan en torno a los 50-60 años e incluso antes, no son las mas comunes².

2.1.1. Etiopatogenia

La EA, como demencia degenerativa, es considerada tambien como una **proteínopatía**, en concreto, del metabolismo anormal de tres proteínas²: β -amiloide, α -sinucleína y proteína tau, que nos va a permitir explicar el 90% de este tipo de demencias (aunque no siempre existe

correlación entre manifestaciones clínicas predominantes y la anatomía patológica y de ahí, la existencia de las formas atípicas y típicas de la enfermedad.

La pérdida de funciones cerebrales es producida por una degeneración progresiva de neuronas corticales y estructuras subcorticales, siendo los responsables de este deterioro la formación de placas extracelulares de proteína β -amiloide (BA) y ovillos neurofibrilares intracelulares como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau². Además se observa una hipofunción de la neurotransmisión colinérgica que es compensada con una hiperfunción glutamatérgica. Como consecuencia de estas alteraciones celulares, se origina la activación de procesos de apoptosis y muerte neuronal.

➤ Proteína β -amiloide (BA) y precursora amiloide (APP): En casos de inicio precoz de la

EA, se encuentra asociada a una herencia autosómica dominante en la que se observan afectadas diversos cromosomas (21,14 y 1) de la **proteína precursora amiloide (APP)**. Estas alteraciones dan lugar a un incremento de la

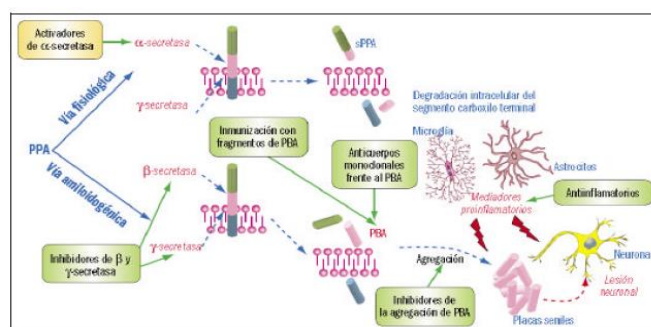


Figura 1. Vía de síntesis de BA y acumulación neuronal.

actividad de β y γ secretasas dando como producto una sobreproducción de fragmentos **β -amiloide**², los cuales se agregan y depositan dando lugar a la formación de las placas características de esta enfermedad (BA₄₂, isoforma neurotóxica y componente mayoritario de las placas seniles³)(Fig.1).

➤ Apolipoproteína P (APOE): La APOE es una glicoproteína que tiene funciones fundamentales en la reparación neuronal, así como propiedades antiinflamatorias y de crecimiento dendrítico³. En pacientes afectados por la forma típica de la EA, el principal factor de susceptibilidad genética² se ha observado en la afectación de uno de los cromosomas del gen de la APOE, en concreto el alelo E4 el que esta involucrado con la

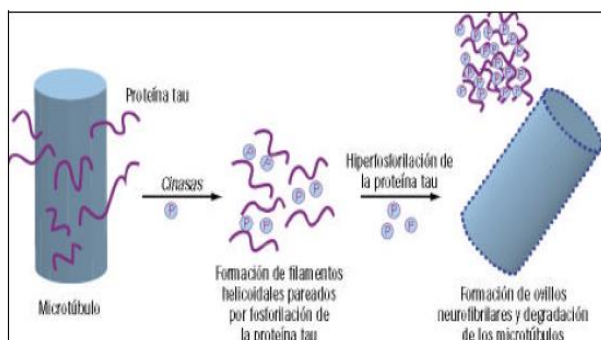


Figura 2. Formación y acumulación de ovillos neurofibrilares.

neuropatogenia de la enfermedad al estimular la producción de β -amiloide, hiperfosforilación de la proteína tau, neuroplasticidad e inflamación².

➤ Proteína Tau: La proteína tau en condiciones normales se

encuentra asociada a los microtúbulos, que tiene un papel fundamental para el correcto funcionamiento y supervivencia de las neuronas a nivel estructural y comunicación neuronal, ya que están implicadas en la estabilización del citoesqueleto neuronal². La hiperfosforilación de la proteína tau por diversas quinasas y fosfatasa, va a dar lugar a la degradación de estos microtúbulos y a su acumulación originando los ovillos neurofibrilares (**Fig. 2**).

- Acetil colina: El sistema colinérgico presenta un papel esencial en el proceso de la memoria³. En pacientes con EA se ha observado una hipofunción de la actividad colinérgica a nivel del SNC, en especial en el hipocampo y corteza cerebral debido al déficit de la enzima acetilcolinesterasa y de receptores colinérgicos, lo que da lugar a la afectación de la transmisión sináptica y favorecimiento de procesos inflamatorios³.
- Inflamación y alteraciones vasculares: La inflamación es un factor de indudable relevancia en la EA, pero existe controversia sobre si es causa o consecuencia de la enfermedad², ya que la aparición de depósitos BA provoca la expresión de mediadores inflamatorios y a su vez la inflamación favorece la regeneración de BA⁴.

2.1.2. Tratamientos

Debido a que actualmente no existe ningún tratamiento para curar o frenar el avance de la EA², los objetivos del tratamiento a día de hoy se enfocan a varios niveles: (a) Control de síntomas psicológicos y conductuales. (b) Mantener la capacidad funcional del paciente lo máximo posible. (c) Control de patologías comórbidas. (d) Apoyo activo del cuidador.

Para alcanzar esta serie de objetivos, se utilizan de manera complementaria actuaciones farmacológicas y no farmacológicas². Las primeras se basan en dos aproximaciones(**Fig. 3**): (a) Inhibidores de acetilcolinesterasa: Rivastigmina, galantamina y donepezilo para el tratamiento de los síntomas de la EA causados por la hipofunción colinérgica. (b) Inhibidores NMDA (memantina): Para disminuir la hiperfunción glutamatergica como consecuencia de la hipofunción colinérgica.

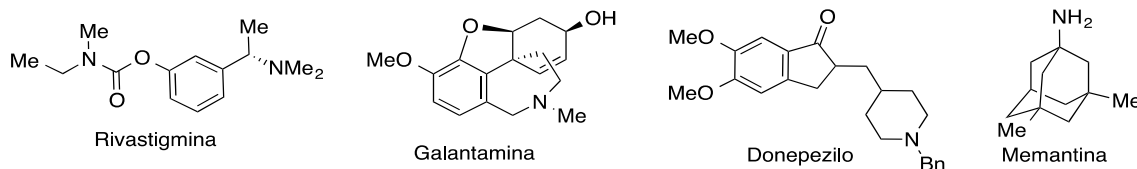


Figura 3. Tratamiento sintomático para la EA.

3. Objetivos

Este trabajo va enfocarse en la descripción de las características estructurales de la quinasa GSK3 β . Implicación y mecanismos de la enzima en la EA, enumeración y descripción de moléculas inhibitoras con potencial efecto para el tratamiento de la enfermedad.

4. Metodología

Para la realización de este trabajo, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica mediante la utilización de diversas bases de datos como Pubmed, Science Direct, revistas en formato físico, online y direcciones web oficiales.

5. Resultados y discusiones

5.1. Quinasa GSK3 β

5.1.1. Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)

La Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK3) lleva estudiándose desde hace décadas debido a su implicación en numerosas vías de señalización, además de su papel en el metabolismo del glucógeno, como su implicación en el ciclo celular, expresión de genes, el proceso de apoptosis, proliferación y supervivencia celular⁵. Además presenta un papel crucial a nivel de desarrollo neuronal al estar involucrada en el control de la morfogénesis, sinaptogénesis y polaridad axonal⁶. Muestra de esta implicación ha sido la identificación de en torno a 100 proteínas nucleares y citoplasmáticas como sustrato de GSK3⁷.

5.1.2. Isoformas GSK3.

Una vez secuenciada GSK3 se observó que se encuentra codificada por dos genes independientes en mamíferos que dan lugar a las isoenzimas GSK 3 α y **GSK3 β** , con una masa molecular de 51.000 Da (483 aminoácidos) y 47.000 Da (433 aminoácidos) respectivamente⁸. Ambas isoenzimas presentan características bioquímicas y de sustrato muy similares, hasta tal punto de compartir el 85% de su secuencia global y el 98% de su secuencia de aminoácidos dentro de sus bolsillos de unión a ATP, aunque difieren en los dominios N y C terminal⁹. Este hecho da lugar a que la discriminación de ambas isoformas para la elaboración de fármacos inhibidores basados en la estructura de ATP sea muy difícil.⁷

El impacto de estas dos isoformas con respecto a la función cerebral, como se ha comentado en el punto anterior, ha sido establecida por un gran número de estudios en ratones transgénicos, dando lugar a diferentes efectos dependiendo de la isoforma implicada¹⁰. Por ejemplo, la delección de GSK3 β es letal mientras que la de la isoforma α no, así como la sobreexpresión de GSK3 β se ha propuesto como modelo de enfermedades mentales de tipo maniaco y, como se comentara en un punto posterior, en enfermedades neurodegenerativas tau-dependiente como es la EA.

GSK3 se encuentra en todo el reino animal, pudiéndose encontrar ambas isoformas en todos los tejidos de mamíferos pero en particular se encuentra extensamente expresada en el cerebro¹⁰.

5.1.3. Características estructurales de GSK3β

La estructura tridimensional de GSK3β ha sido establecida gracias a numerosos estudios de Cristalografía. GSK3β posee el pliegue con dos dominios típico de quinasas⁶, con un dominio tipo hebra beta (residuos 25-138) en N terminal (formado por 7 láminas beta y curvado sobre sí mismo formando una estructura tipo barril beta cerrado ortogonal)¹¹ y un dominio alfa helicoidal en C

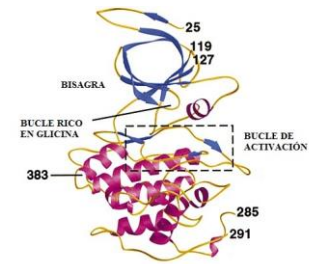


Figura 4. Estructura de GSK3β

terminal (**Fig.4**). El sitio de unión a ATP está situado entre los dominios alfa y beta y se encuentra bordeado por un bucle rico en glicina y una región bisagra. Con respecto al bolsillo/bucle de activación (residuos 200-226) se localiza en la superficie del lugar de unión al sustrato¹². Finalmente, GSK3β posee dos lugares de fosforilación que influyen en la actividad catalítica de la proteína¹²: Ser-9 es fosforilada por la enzima AKT (posteriormente se hablara de dicha enzima) lo que da lugar a la inactivación de GSK3β mientras que la fosforilación de la Tyr216 localizada en el bucle de activación, aumenta la actividad catalítica.

5.1.4. Mecanismo de fosforilación

GSK3β como serin-treonin quinasa necesita que sus dominios hebra-beta y alfa-helicoidal se encuentren en una conformación catalítica activa¹². Para ello, los residuos Lys205, Arg96 y Arg180 (conservados en todas las isoformas de la enzima) de dichos dominios, unen el grupo fosfato del residuo fosforilado del bucle de activación, permitiendo la correcta alineación de ambos dominios con el sustrato para una óptima actividad catalítica⁶(**Fig.5**).

GSK3β muestra una elección única de sustrato en comparación con otras quinasas debido a que presenta una preferencia de 500 a 100 veces mayor⁷ por aquellos sustratos que se encuentran previamente fosforilados (*prime phosphorylation*), en una serina/treonina localizada en C terminal próxima al residuo objetivo de GSK3β antes de que pueda fosforilar aún más el sustrato. De esta manera GSK3β va a fosforilar a sus sustratos de diferente manera y eficacia. Algunos de los sustratos de GSK3β como Axina, β-catenina y la proteína Tau, no necesitan de esa fosforilación previa¹².

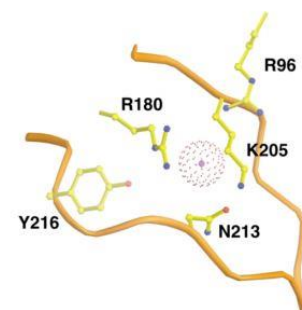


Figura 5. Bolsillo con la triada catalítica.

La secuencia de fosforilación reconocida por GSK3β se esquematiza como pS/T₁XXXpS/T₂⁷, donde pS/T₁ es el

residuo objetivo que puede ser Serina o Treonina, XXX son aminoácidos (en general Prolina) y pS/T2 es el sitio de la fosforilación previa.

5.2. GSK3 β y la Enfermedad de Alzheimer

En los últimos años, GSK3 β ha emergido como una de las piezas claves en la etiopatogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas debido a su enorme presencia en un gran número de vías de señalización, como se ha mencionado a lo largo del punto 5. La relevancia en concreto de esta enzima con respecto a la EA reside en su participación en dos de los

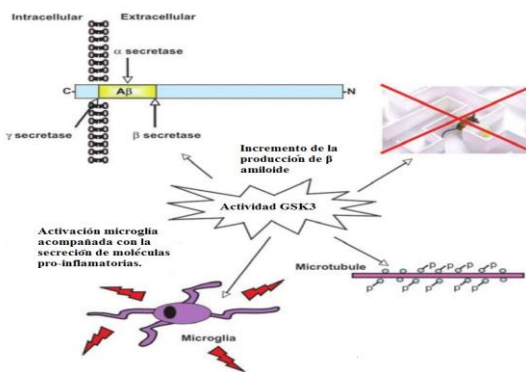


Figura 6. Participación de GSK3 β en EA.

que juega un papel mayor tanto en la patogénesis como en el progreso de la EA¹³. (Fig.6)

Por esta razón, se ha propuesto GSK3 β como pieza clave en la cascada de eventos que culminan en la aparición de la EA, convirtiéndose en una diana terapéutica muy prometedora. A continuación van a describirse ambos mecanismos y las correspondientes vías en las que esta implicada GSK3 β en la EA.

5.2.1. Mecanismo β -amiloide e hiperfosforilación de tau

Diversos estudios^{5,14,15} han evidenciado la importancia de la desregularización de GSK3 como enlace molecular entre la sobreproducción de péptido β -amiloide y la hiperfosforilación de tau. Tras observarse que los ovillos neurofibrilares estaban principalmente compuesto por formas hiperfosforiladas de la proteína tau, se decidió investigar aquellas quinasas y fosfatasa con mayor relevancia que pudieran participar en ese proceso de hiperfosforilación, lo que dio lugar a la identificación de GSK3 β como una de las quinasas principalmente involucradas en el control postraduccional de dicha proteína¹⁶. Este hecho se evidencia al observar que de los 85 sitios de fosforilación (de los cuales 40 han sido relacionados con la EA), 23 de ellos son fosforilados por GSK3 β y 3 de ellos no necesitan una fosforilación previa (priming)¹⁰.

Por otro lado, y llevado también de la mano con lo anterior, se ha evidenciado la influencia de GSK3 β para la regularización del procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP), aumentando la producción de péptido β -amiloide¹⁰. Además, se ha demostrado que la

exposición a nivel neuronal de dicho péptido regula positivamente la actividad de GSK3 β a través de la vía *insulina/factor I de crecimiento relacionado con insulina*¹⁰, como se explicara a continuación, generándose un bucle de retroalimentación positiva.

5.2.1.1. Vía IGF-I y Wnt

Las vías IGF-I (*insulina/factor I de crecimiento relacionado con insulina*) y Wnt han sido designadas¹⁴ como las vías de señalización extracelular más relevantes en la regulación de la actividad de GSK3 β a nivel cerebral, y por ello, un nuevo camino para comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos de la EA.

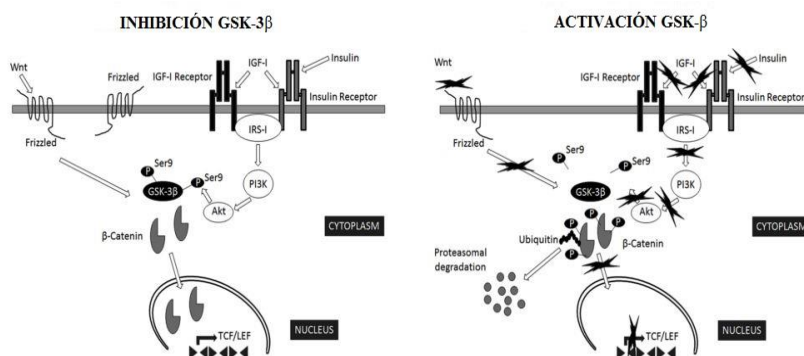


Figura 7. Regulación de GSK3 β por las vías IGF-I y Wnt.

Ambas vías van a regular negativamente a GSK3 (Fig.7). En IGF-1, la señalización por Insulina da lugar a la activación de las quinasa PI3K y consecutivamente la de AKT, siendo esta última la

responsable de fosforilar GSK3 β en los residuos 9 y 21 y con ello la inactivación de la enzima al bloquear el sitio de activación⁵. Por otro lado, Wnts (familia de 19 glicoproteínas con numerosas funciones)¹⁷, mediante el mecanismo β -catenina dependiente, se une al receptor transmembrana FzR que induce la desestabilización del complejo proteico Axina-proteína APC-Ck1-GSK3¹⁰. Esto permitirá que β -catenina migre al núcleo, se una a TCell/LEF (factor de transcripción) y comience la transcripción de genes diana¹⁸. Cuando la vía WNT se encuentra no activa, el complejo proteico no está inhibido y β -catenina es fosforilada por

GSK3 β y degradada por el proteosoma.

La desregularización de ambas vías ha demostrado estar implicadas en la EA: En ambas vías su desregularización ha sido relacionada con la alteración de la *potenciación a largo plazo* (LTP), que da a lugar a la alteración de la plasticidad neuronal, proceso de aprendizaje y

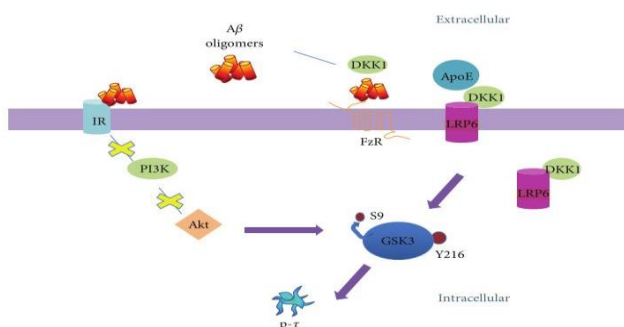


Figura 8. Implicación de IGF-I y Wnt en la relación β -amiloide-Proteína tau.

memoria^{5, 19}. Más importante aún y en relación a la desregularización de la vía Wnt es el modelo propuesto de activación de GSK3 β por β -amiloide(Fig.8) ya que da explicación a la relación β -amiloide-Proteína tau²⁰. El péptido β -amiloide va a unirse tanto al receptor de

Insulina como a Wnt, lo que va a impedir la fosforilación en ambas vías de GSK3 β , la cual va a favorecer la fosforilación de la proteína tau¹⁰. A su vez disminuye la β -catenina, cuyos niveles son esenciales para la homeostasis neuronal y modulación sináptica, y cuya reducción da lugar a pérdida sináptica, favorece la deposición de péptido amiloide, muerte neuronal y neuroinflamación¹⁷.

5.2.2. Mecanismo estrés oxidativo /inflamación

Se denomina **estrés oxidativo** al estado redox producido como consecuencia de un desequilibrio entre la generación y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)¹³ y especies reactivas de nitrógeno (RN)²¹ como son: el anión radical súper oxido (O_2^*), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^*), óxido nítrico (NO^*) y el anión nitrito (NOO^-).

Las especies reactivas son subproductos del metabolismo que actúan como un arma de doble filo, debido a que presentan un papel crucial en la señalización molecular pero a su vez, en situaciones en las que su generación este favorecida o su detoxificación por especies antioxidantes este disminuida, dan lugar a daño en el sistema biológico¹³ debido a su potencial oxidante, ya que son capaces de oxidar la gran mayoría de moléculas incluido el material genético (ADN, ARN), proteínas y lípidos.

Teniendo en cuenta el papel crucial que tiene el estrés oxidativo derivado de la iniciación y propagación anormal de ROS sobre EA^{22,23} (**Fig.9**), y que se ha propuesto que no solo es una consecuencia primaria de EA, sino que está también involucrado en las fases más tempranas de la enfermedad¹⁶, es fundamental hablar de la **respuesta antioxidante** y de su regulación.

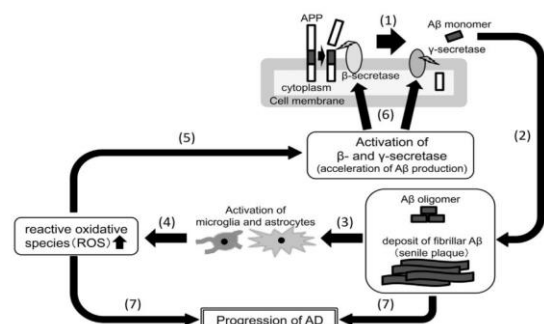


Figura 9. Estrés oxidativo y EA.

5.2.2.1. Vía de regulación transcripcional Nrf2-ARE.

En nuestro organismo existen **tres vías celulares principales implicadas en la regulación** (del 1% al 10% de nuestros genes) de la respuesta antioxidante²⁴: factor Keap 1, ARE y factor Nrf2 (*Factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2*), convirtiéndose Keap1-Nrf2-ARE en la mayor vía de señalización que regula una batería de proteínas citoprotectoras a nivel transcripcional. Por ello en los últimos años ha sido esta vía muy estudiada, ya que se ha demostrado que la activación de dicha vía genera un efecto protector contra la toxicidad inducida por BA¹⁶ y reduce los niveles de proteína tau hiperfosforilada²⁵.

En condiciones basales, Nrf2 se encuentra localizada en el citoplasma, controlada negativamente por Keap1 que impide su translocación al núcleo y que sea degradada por el proteosoma. En condiciones de estrés oxidativo (ROS, ARE) se produce un cambio conformacional en Keap1, lo que permite la migración de Nrf2 al núcleo y allí unirse a ARE y dar lugar a la transcripción de genes antioxidantes.

En los últimos años se ha demostrado la implicación de GSK3 β en la regulación de dicha vía¹⁶. Ya que GSK3 β parece regular la distribución de Nrf2 a favor de su estado citosólico, impidiendo la transducción de genes antioxidantes²⁶. Por ello se ha propuesto la creación de nuevas formas terapéuticas que inhiban GSK3 β para conseguir una correcta respuesta antioxidante (**Fig.10**).

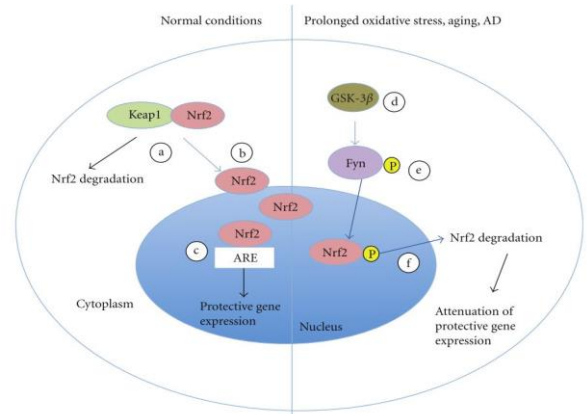


Figura 10. GSK3 β y la Vía NRF2-ARE

5.3. Inhibidores de GSK3 β para el tratamiento de EA.

Debido al papel clave que presenta la hiperactivación de GSK3 β en los diversos mecanismos fisiopatológicos de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas/psiquiátricas, y a la incapacidad de nuestro organismo de regularla a la baja mediante mecanismos endógenos²⁷, surge el interés de iniciar diversas vías de investigación para la búsqueda de moléculas que tengan la capacidad de regular negativamente GSK3 β y con ello restaurar los niveles fisiológicos de dicha enzima. Además de su papel clave, su importancia como diana terapéutica reside en la seguridad potencial que presentan los inhibidores, ya que aunque en primer lugar se pensó que la inhibición de GSK3 β podría acarrear la aparición de efectos adversos graves como hipoglucemia o carcinogénesis (debido a su papel clave en el metabolismo de glucosa y en la transcripción de ciertos oncogenes)²⁷, la utilización de litio para el tratamiento de trastorno bipolar durante más de 60 años, descrito como el primer inhibidor de GSK3 β ²⁸, y que no se ha informado/relacionado ningún caso de hipoglucemia y muerte por cáncer, ha dado lugar a que esa hipótesis sea descartada y que los inhibidores de GSK3 β se conviertan en un objetivo muy atractivo para el tratamiento de EA.

Todo ello no implica que el desarrollo de inhibidores de GSK3 β sea un proceso fácil, ya que el principal desafío al que se enfrentan los investigadores es que estos presenten una alta especificidad por el tejido cerebral, siendo la barrera hematoencefálica el primer obstáculo a superar²⁷. Esta tarea no es particularmente fácil en el proceso de elaboración de cualquier tipo

de fármaco, pero en este caso la dificultad es mayor debido a la preferencia porque los fármacos anti EA sean administrados por vía oral²⁷.

Otra característica importante es que los inhibidores de GSK3 β , a pesar de su enorme diversidad química, comparten unas características generales²⁹: a) Bajo peso molecular (<600 Da), b) son heterociclos hidrofóbicos de geometría plana, c) la gran mayoría (no todos) compiten con ATP para unirse a GSK3 d) Las interacciones con la quinasa son principalmente de tipo hidrofóbico y de Van der Waals.

5.3.1. Cationes metálicos

Como se ha comentado, el catión *litio* (en concreto, Cloruro de litio (LiCl)) fue el primer inhibidor de GSK3 en ser descubierto. El mecanismo exacto de inhibición no se sabe con certeza, aunque se postulan dos hipótesis³⁰: a) Li⁺ es un inhibidor competitivo de los iones magnesio (Mg⁺) y b) inhibe la carencia de potasio.

Durante muchos años fue utilizado para el tratamiento de trastornos bipolares pero, debido a la aparición de efectos adversos, su uso para el tratamiento de la EA ha sido descartado³⁰. Aun así, ha sido objeto de diversos estudios con resultados muy dispares; por un lado, estudios en ratones transgénicos que presentan hiperproducción de proteína tau humana afirman que el tratamiento con Litio aumenta los niveles de β -catenina, reduce la fosforilación de la proteína tau, favorece la formación sináptica, disminuye los niveles de BA y bloquea la APP³¹. Sin embargo, otros estudios no han podido confirmar esos efectos³¹

Además de litio, otros cationes como mercurio, berilio, zinc y cobre, destacando de entre ellos el catión *zinc* han demostrado ser potentes inhibidores de GSK3 (incluso más que litio)³¹.

5.3.2. Competidores de ATP

Las moléculas pertenecientes a este grupo van a unirse a GSK3 por el bolsillo de unión a ATP. El principal problema que presentan los inhibidores de GSK3 ATP competitivos es la falta de selectividad frente a las isoformas α y β de GSK3³² y otras enzimas de la misma familia como las CDKs ya que, como se ha comentado en el punto 5.1.2. Isoformas GSK3, ambas isoformas (como es común en el resto de enzimas de la familia) presentan un bolsillo de unión a ATP muy conservado lo que da lugar a que la inhibición de una de las isoformas sea muy difícil. Por ello es importante en este grupo de inhibidores realizar análisis de selectividad frente a una amplia gama de protein quinasas bien caracterizadas, consiguiendo de esta manera disminuir cualquier interacción fuera de nuestro objetivo terapéutico³³. Por otra parte, una total selectividad tampoco sería adecuada debido a la multifuncionalidad de GSK3 en diversas vías, ya que podría dar lugar rápidamente a la aparición de resistencias³².

5.3.2.1. Naturales

El ecosistema marino está mostrando desde hace tiempo ser una fuente muy valiosa para la obtención de diversas estructuras químicas (**Fig.11**) con actividad biológica muy prometedora

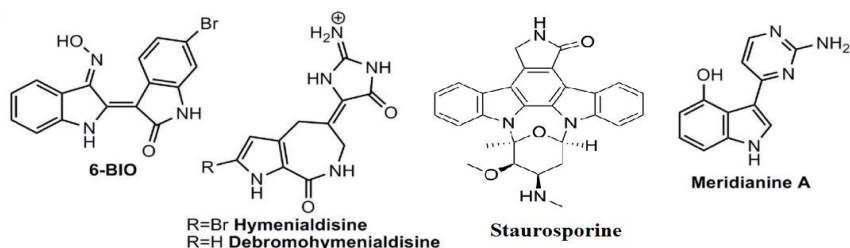


Figura 11. Inh. competitivos de ATP de origen natural.

actualmente patentados por diversas farmacéuticas como inhibidores de GSK3³⁰. Ejemplos de este grupo son los *análogos de indirubina*, con actividad inhibitoria hacia GSK-3 y CDKs³⁴. La 6-bromoindirubina, obtenida del molusco *Murex brandaris*, presenta cierta selectividad hacia GSK3 en vez de CDKs pero un derivado sintético, la 6-bromoindirubin-3-oxima (6-BIO), con la adición del grupo oxima dio lugar a una selectividad 16 veces mayor por

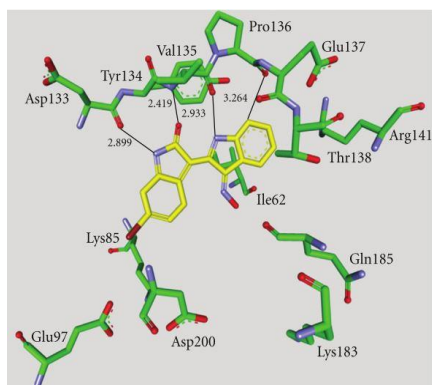


Figura 12. Interacción entre 6-BIO y GSK3³⁰.

Diversos estudios han demostrado que la administración de 6-BIO disminuyó los niveles de proteína tau hiperfosforiladas a nivel cortical³⁶. Los análisis por cristalografía de Rayos X³⁰ han mostrado la unión entre 6-BIO y el bolsillo de unión a ATP de GSK3 (**Fig. 12**): El nitrógeno va a interactuar con el oxígeno carbonílico del residuo Asp133 y el oxígeno con el nitrógeno del residuo Val135. Además, se observan interacciones de Van der Waals entre el átomo de Bromo y el residuo Leu132 e interacciones entre los oxígenos de Val135 y Pro136.

Otro de los derivados de la 6-bromoindirubina, la *indirubina-3-monoxima* ha demostrado con su administración la atenuación de diversos síntomas como inflamación, acumulación BA y de fosforilación de tau, aunque existe controversia con respecto a estos resultados ya que en otros estudios no han sido claros³¹, debido quizás al problema de solubilidad que presentan la familia de las indirubinas, problema que está siendo resuelto por otros grupos de investigación mediante la síntesis de nuevos análogos^{30,37}.

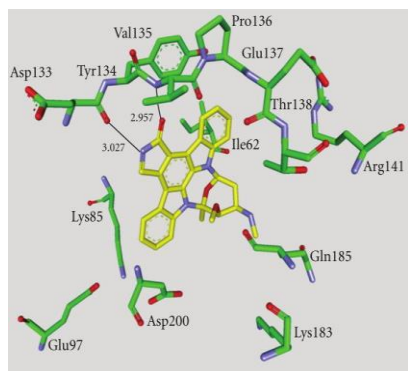


Figura 13. Interacción entre estaurosporina y GSK3³⁰.

para el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EA³¹. Numerosos *derivados de indol* están siendo

actualmente patentados por diversas farmacéuticas como inhibidores de GSK3³⁰. Ejemplos de este grupo son los *análogos de indirubina*, con actividad inhibitoria hacia GSK-3 y CDKs³⁴. La 6-bromoindirubina, obtenida del molusco *Murex brandaris*, presenta cierta selectividad hacia GSK3 en vez de CDKs pero un derivado sintético, la 6-bromoindirubin-3-oxima (6-BIO), con la adición del grupo oxima dio lugar a una selectividad 16 veces mayor por GSK3³⁵. Diversos estudios han demostrado que la administración de 6-BIO disminuyó los niveles de proteína tau hiperfosforiladas a nivel cortical³⁶. Los análisis por cristalografía de Rayos X³⁰ han mostrado la unión entre 6-BIO y el bolsillo de unión a ATP de GSK3 (**Fig. 12**): El nitrógeno va a interactuar con el oxígeno carbonílico del residuo Asp133 y el oxígeno con el nitrógeno del residuo Val135. Además, se observan interacciones de Van der Waals entre el átomo de Bromo y el residuo Leu132 e interacciones entre los oxígenos de Val135 y Pro136.

Otro de los derivados de la 6-bromoindirubina, la *indirubina-3-monoxima* ha demostrado con su administración la atenuación de diversos síntomas como inflamación, acumulación BA y de fosforilación de tau, aunque existe controversia con respecto a estos resultados ya que en otros estudios no han sido claros³¹, debido quizás al problema de solubilidad que presentan la familia de las indirubinas, problema que está siendo resuelto por otros grupos de investigación mediante la síntesis de nuevos análogos^{30,37}.

Por último, la *estaurosporina*, molécula obtenida de la

bacteria *Streptomyces staurosporeus* de la que se han descrito potentes propiedades inhibitoras de GSK3 β ³⁴ (junto a propiedades antimicrobianas, hipotensora y citotóxicas)³⁸, cuyos estudios cristalográficos³⁰ (**Fig.13**) han mostrado su unión a GSK3 mediante interacciones del grupo maleimida con el oxígeno carbonílico del residuo Asp133 y con el nitrógeno de Val135.

5.3.2.2. Sintéticos.

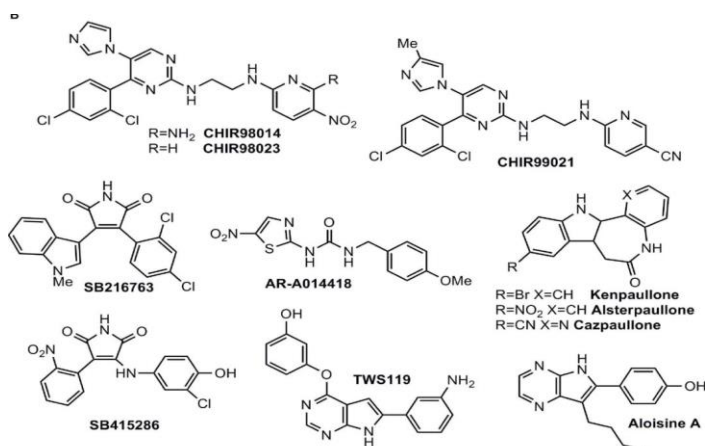


Figura 14. Inh. competidores de ATP de origen sintético.

Es importante mencionar que en estudios con ratones transgénicos han reducido enormemente los valores de proteína tau fosforilada (en concreto en Ser396 de dicha enzima)³⁰, también ha demostrado influir en el mantenimiento de la depresión a largo plazo (DLP) por receptores NMDA³⁹ y de reducir la muerte neuronal⁴⁰.

Los *derivados de Paullone* (compuestos tetracíclicos fusionados) como *kenpaullone* y *alsterpaullone*, han sido descritos como potentes inhibidores ATP competitivos de GSK3 β y

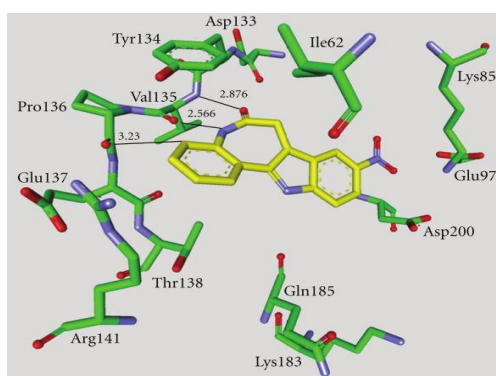


Figura 15. Interacción entre alsterpaullone y GSK3³⁰.

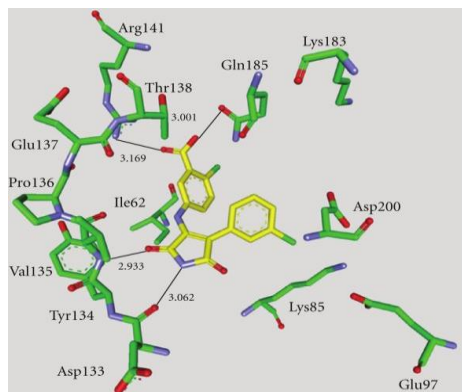
con esta molécula han demostrado prevenir la muerte neuronal por estrés oxidativo e inhibir la fosforilación de tau³⁹. Una molécula con estructura similar, *1-azakenpaullone*, ha demostrado prevenir también la muerte neuronal además de disminuir los niveles de BA⁴¹.

Los *análogos de purina*, las aminopirimidinas, son de los primeros inhibidores de GSK3 β obtenidos de forma sintética (**Fig. 14**); *CHIR98014*, *CHIR98023* y *CHIR99021*. Son moléculas que poseen una potente acción inhibitora de entre 500 a 10000 veces mayor

selectividad por GSK3 frente a otras

selectividad por GSK3 frente a otras

Las *arilindolmaleimid*s **SB-216763** y **SB-415286**, son inhibidores altamente selectivos que



han demostrado inhibir GSK3 a bajas concentraciones nanomolares³¹. Con respecto al mecanismo de unión de este grupo con GSK3 se han descrito³⁰ las interacciones entre el nitrógeno del maleimido y el oxígeno carbonílico del residuo Asp133, el oxígeno del maleimido central con Val135 y dos interacciones adicionales entre el oxígeno carboxílico y los residuos

Figura 16. Interacción entre arilindolmaleimids y GSK3³⁰ Arg141 y Gln185(**Fig.16**).

Diversos estudios^{42,43} han demostrado su acción neuroprotectora al intervenir en la inhibición de la vía IGF-1, toxicidad de BA y disminución de proteína tau hiperfosforilada (esta última demostrada en estudios con ratones transgénicos³⁹), además al igual que los CHIR, afectan en el mantenimiento del DLP⁴⁴. Es importante mencionar que en uno de los estudios con ratones sanos⁴² se observó que la administración de SB21673 daba lugar a efectos parecidos a los de la neurodegeneración y déficits de comportamiento, lo que demuestra que una inhibición excesiva de GSK3 β afecta al normal funcionamiento neuronal, por tanto, los inhibidores de GSK-3 solo estarían indicados en patologías con actividad GSK-3 elevada. Actualmente se están desarrollando nuevos compuestos inhibidores de GSK3 competidores de ATP con resultados prometedores para el tratamiento de la EA como *pirano[2,3-c]pirazol* y *dihidropirazolo[3,4-b]piridinas*, derivados de *quinazolina-2-carbonitrilo*, *tiazolo[5,4-f]quinazolin*as o las *Aloisinas* (*6-fenil[5H]pirrolo[2,3-b]piracinas*).

5.3.3. No competidores de ATP

Debido a la gran homología de todas las protein quinasas humanas y sus bolsillos de unión a ATP y el desafío que supone por tanto diseñar inhibidores de GSK3 ATP competitivos, surgen los inhibidores de GSK3 no competidores de ATP, los cuales tienden a ser más selectivos en el momento en el que se unen a regiones específicas, lo que proporciona una modulación más delicada que el simple bloqueo de entrada a ATP. Este hecho da lugar a que estas moléculas muestren en general mayor potencia “in vivo” y en líneas celulares (con propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) similares)²⁷ y al no unirse a la región de unión a ATP, los valores de IC₅₀ (Concentración máxima inhibitoria 50) son menores, lo que conlleva menor toxicidad²⁷.

5.3.3.1. Naturales (Fig.17)

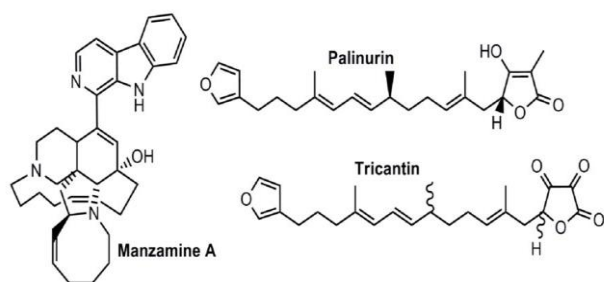


Figura 17. Inh. No competitivos de ATP de origen natural.

La *manzamina A* y sus derivados, alcaloides β carbolínicos complejos, aislados de la esponja indonesia *Acanthostrongylophora* han sido identificados como inhibidores de GSK3 al poder inhibir dicha enzima en ensayos “in vitro” más de un 70% a bajas concentraciones micromolares⁴⁵.

Según el estudio realizado por *Hamman et al*⁴⁶, la manzamina inhibe específicamente GSK-3 y CDK5, siendo inefectivas para el resto de quinasas ensayadas. Mediante estudios de docking⁴⁷ se mostró que Manzamina A encaja bien en el bolsillo no ATP competitivo; Los residuos Arg96 y Ala204 interactúan con un hidroxilo en 8 de la molécula mediante

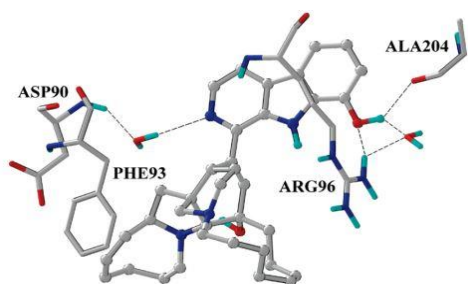


Figura 18. Interacción propuesta entre manzamina A y GSK3.

interacciones electrostáticas. El oxígeno aceptor de ese mismo grupo hidroxilo interactuó con el nitrógeno donador de Arg96 y el H donador interactuaba con el carbonilo de Ala204 y con una molécula de agua intermedia, la cual genera enlaces de hidrogeno con el grupo amino de Arg96

(Fig.18). Por tanto la manzamina se ha convertido en un punto de partida muy prometedor para el diseño de nuevos inhibidores de GSK3.

Recientemente se han aislado dos compuestos nuevos con estructura de *furano-sesquiterpenoide* de esponjas mediterráneas del género *Ircinia*; *Palinurina* y un metabolito llamado *tricantina*³¹. La palinurina ha sido objeto de simulaciones de dinámica molecular en los que se ha propuesto un nuevo mecanismo alostérico⁴⁸ de inhibición de GSK3 β por unión a un bolsillo del lóbulo N-terminal. Lys86, mediante interacciones electrostáticas y un enlace de hidrogeno, interactúa con el hidroxilo desprotonado del anillo tetrónico, y el residuo de Tyr56 mediante enlace de hidrogeno con el grupo carbonilo del anillo.

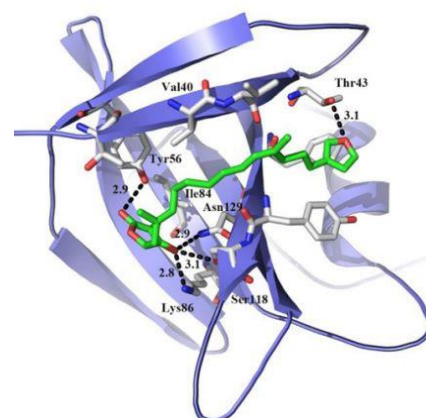


Figura 19. Interacción propuesta entre palinurina y GSK3⁴⁸.

Tricantina junto a Palinurina ha demostrado en estudios con cultivos celulares disminuir la proteína tau hiperfosforilada por inhibición de GSK3 β ³¹.

5.3.3.2. Sintéticos. (Fig. 20)

La familia de las *Tiadiazolidinadionas* (TDZD) fueron los primeros inhibidores de GSK3 no

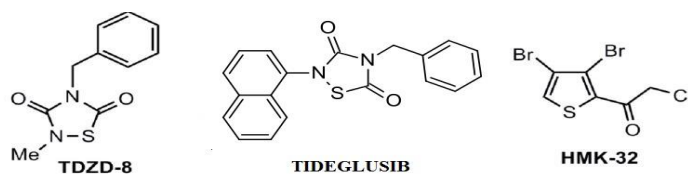


Figura 20. Inh. No competitivos de ATP de origen sintético.

ATP competitivos descritos en la literatura. Aunque su mecanismo de acción no ha sido todavía confirmado experimentalmente, se ha propuesto un mecanismo posible en el que los residuos Arg96, Lys205 y Tyr216 serían claves⁴⁹ (Fig.21). Las TDZD no mostraron inhibición en un gran número de quinasas, incluido PKA y CK-2³¹. Ensayos en cultivos neuronales demostraron reducir los niveles de proteína tau hiperfosforilada³¹.

La optimización de la familia de TDZD ha dado lugar actualmente a la caracterización de dos

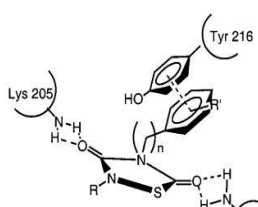


Figura 21. Interacción propuesta entre TDZD y GSK3⁴⁹.

moléculas en concreto. La primera, *TDZD-8*, muy utilizada como herramienta en ensayos para estudiar el rol de GSK3 en modelos celulares y animales, y en segundo lugar, con un gran impacto para un posible tratamiento real para la EA y patrocinado por una compañía biotecnológica española, el

compuesto *NP031112* (*NP12*) o *Tideglusib*.

En estudios de fase preclínica⁵⁰, NP12 mostro durante el tratamiento en ratones mejoras a nivel cognitivo, disminución de la proteína BA, hiperfosforilación de tau, gliosis y, con mención especial, la disminución de neuronas muertas tanto en córtex como el hipocampo. Sin embargo, y a pesar de haberse obtenido resultados positivos en ensayos en fase IIa³¹, las conclusiones obtenidas en los resultados de la fase IIb⁵¹, publicados en 2015 son: “Tideglusib es prácticamente seguro pero no produjo ningún beneficio clínico en este ensayo[...]”, por lo que se ha propuesto el realizar nuevos ensayos en fase IIb pero con pacientes con estadios de EA más tempranos y periodos de ensayo más largos.

Por último, la familia de las *halometilcetonas* (*HMK*) y sus derivados también han sido identificadas como inhibidores de GSK3. Este grupo presenta de especial que han sido identificados como los primeros inhibidores irreversibles de esta enzima⁵². La inactivación de GSK3 es debida a la formación de un enlace covalente azufre-carbono entre el residuo Cys199 que se localiza en la entrada del sitio de ATP de GSK3⁵³. Estas molécula son capaces de disminuir los niveles de proteína tau hiperfosforilada⁵².

5.3.4. Inhibidores similares a péptidos

Los péptidos han sido los últimos compuestos en ser descritos como inhibidores potenciales de quinasas, los cuales pueden convertirse en una prometedora vía de inhibición selectiva de

proteín quinasas, ya que, al contrario que los ATP competitivos, el reconocimiento del sustrato por parte de las quinasas varía bastante entre ellas, por lo que presenta una ventaja de selectividad³¹. La especial afinidad que presenta GSK3 por los sustratos que están previamente fosforilados hace que surjan los *péptidos fosforilados* como inhibidores sustrato-competitivos⁵⁴ como *L803-mts* péptido fosforilado basado en el sustrato Factor de Choque-1 (HSF-1). Las interacciones identificadas en la unión entre enzima sustrato son los residuos Phe67, Gln89, Phe93 y Asn95 pertenecientes al centro catalítico además del Asp181 como lugar adicional en el N terminal⁵⁵. Aunque ambos interactúan con el bolsillo de unión a ATP, el inhibidor interactúa con una Phe93 y una superficie hidrófoba alejada del sitio de unión a ATP, por lo que identificar estos puntos de interacción serán claves para la elaboración de inhibidores. Estudios con este péptido ha demostrado tener potencial efecto neuroprotector, en la depresión y lesión cerebral³¹.

6. Conclusiones

Durante los últimos 10 años ha surgido una gran variedad química tanto sintética como natural de inhibidores de GSK3 β , lo que demuestra el gran interés y expectación por esta línea de investigación por parte de la comunidad científica.

Los resultados en modelos murinos e in vitro de los diversos estudios mostrados en general son esperanzadores para un futuro tratamiento efectivo de la enfermedad de Alzheimer, aunque debida a la complejidad de la fisiopatología de la enfermedad y las complicaciones per se de la elaboración de inhibidores selectivos de GSK3 β , hace que muchos de ellos no superen las fases preclínicas, siendo a día de hoy el Tideglusib el que mayor expectativas de éxito tiene (aun con los resultados desfavorables del último estudio).

En definitiva, para una exitosa elaboración de fármacos anti-EA es necesario un enfoque multidiana que sea capaz no solo de actuar sobre GSK3 β , sino sobre los ovillos neurofibrilares, placas seniles y el resto de señas de identidad de la EA.

7. Bibliografía

1. Gómez González del Tánago P, Navarro Vida B, Panadero Carlavilla F. Enfermedad de Alzheimer. Bot PLUS; 2011. p. 1–7.
2. Macías E, González A, Bustamante Rangela A, Gil Néciga E. Enfermedad de Alzheimer. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. Elsevier; 2011;10(76):5123–89.
3. Cabrera MJA, Pérez IRM, Ravelo IAG. Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer Pathogenesis and current treatment of Alzheimer ' s disease. 2014;48(2):508–18.
4. Armstrong R. The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Reevaluation of the "Amyloid Cascade Hypothesis." Int J Alzheimers Dis. 2011;2011(11):1–6.
5. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. J Neurochem. 2008;104(6):1433–9.
6. Medina M, Wandosell F. Deconstructing GSK-3: The Fine Regulation of Its Activity. Int J Alzheimers Dis. 2011;2011:1–13.
7. Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. Front Mol Neurosci. 2011;4(November):1–25.

8. Ali a, Hoeflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev.* 2001;101(8):2527–40.
9. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 1990;9(8):2431–8.
10. Salcedo-Tello P, Ortiz-Matamoros A, Arias C. GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:1–12.
11. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, et al. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell.* 2001;105(6):721–32.
12. ter Haar E, Coll JT, Austen D a, Hsiao HM, Swenson L, Jain J. Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol.* 2001;8(1995):593–6.
13. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(8):1240–7.
14. Llorens-Marfín M, Jurado J, Hernández F, Avila J. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci.* 2014;7(May):1–46.
15. Lei, P; Ayton, S; Bush, A. I; Adlard PA. GSK-3 in Neurodegenerative Diseases. *Int J Alzheimer's Dis.* 2011;2011:1–9.
16. Tenti G. New multicomponent reaction for the synthesis of pyridine derivatives as potential anti - neurodegenerative agents[Tesis doctoral]. Madrid; Universidad Complutense. Facultad de Farmacia; 2015.
17. Warriar S, Marimuthu R, Sekhar S, Bhuvanlakshmi G, Arfuso F, Das AK, et al. sFRP-mediated Wnt sequestration as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* Elsevier Ltd; 2016;75:104–11.
18. Liu L, Wan W, Xia S, Kalionis B, Li Y. Dysfunctional Wnt/ β -catenin signaling contributes to blood-brain barrier breakdown in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2014;75:19–25.
19. Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci.* 2002;22(9):3359–65.
20. Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol.* Elsevier Inc.; 2010;223(2):322–5.
21. Swomley AM, Förster S, Keeney JT, Triplett J, Zhang Z, Sultana R, et al. A β , oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(8):1248–57.
22. Matsumura A, Emoto MC, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, et al. Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med.* Elsevier; 2015;85:165–73.
23. Zhou WW, Lu S, Su YJ, Xue D, Yu XL, Wang SW, et al. Decreasing oxidative stress and neuroinflammation with a multifunctional peptide rescues memory deficits in mice with Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* Elsevier; 2014;74:50–63.
24. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev.* 2012;32(4):687–726.
25. Jo C, Gundemir S, Pritchard S, Jin YN, Rahman I, Johnson GVW. Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun.* Nature Publishing Group; 2014;5:3496.
26. Rojo AI, Sagarra MR De, Cuadrado A. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: Relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem.* 2008;105(1):192–202.
27. Martínez A, Gil C, Pérez DI. Glycogen synthase kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment. *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:1–7.
28. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 by Competition for Magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(3):720–5.
29. Starke K, Board E, Eichelbaum M, Ganten D, Hofmann F, Kobilka B, et al. Handbook of Experimental Pharmacology Volume 167. Vol. 167, Handbook of Experimental Pharmacology. 1990. 52-3 p.
30. Kramer T, Schmidt B, Lo Monte F. Small-molecule inhibitors of GSK-3: Structural insights and their application to Alzheimer's disease models. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:1–32.
31. Eldar-Finkelman H, Martinez A. GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. *Front Mol Neurosci.* 2011;4(October):1–18.
32. Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(9):471–80.
33. Pandey MK, DeGrado TR. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging. *Theranostics.* 2016;6(4):571–93.
34. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, et al. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most

- cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem.* 2001;276(1):251–60.
35. Mech LD. A Gray Wolf (*Canis lupus*) Delivers Live Prey to a Pup. *Can Field-Naturalist.* 2014;128(2):189–90.
 36. Martin L, Magnaudeix A, Esclaire F, Yardin C, Terro F. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A. *Brain Res. Elsevier B.V.;* 2009;1252:66–75.
 37. Vougiannopoulou K, Ferandin Y, Bettayeb K, Myriantopoulos V, Lozach O, Fan Y, et al. Soluble 3', 6-substituted indirubins with enhanced selectivity towards glycogen synthase kinase -3 alter circadian period Konstantina. *J Med Chem.* 2009;51(20):6421–31.
 38. Funato N, Takayanagi H, Konda Y, Toda Y, Harigaya Y, Iwai Y, et al. Absolute Configuration of Staurosporine By X-Ray Analysis. *Tetrahedron Lett.* 1994;35(8):1251–4.
 39. Selenica M-L, Jensen HS, Larsen a K, Pedersen ML, Helboe L, Leist M, et al. Efficacy of small-molecule glycogen synthase kinase-3 inhibitors in the postnatal rat model of tau hyperphosphorylation. *Br J Pharmacol.* 2007;152(6):959–79.
 40. Kelly S, Zhao H, Sun GH, Cheng D, Qiao Y, Luo J, et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibitor Chir225 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 2004;188(2):378–86.
 41. Phiel CJ, Wilson C a, Lee VM-Y, Klein PS. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature.* 2003;423(lane 2):435–9.
 42. Hu S., Begum A.N., Jones M.R., Oh M.S., Beech W.K., Beech B.H. et al. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol Dis.* 2009;4(164):193–206.
 43. Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET. The Wnt Pool of Glycogen Synthase Kinase 3 Is Critical for Trophic-Deprivation-Induced Neuronal Death. *Mol Cell Biol.* 2008;28(5):1515–27.
 44. Peineau S, Nicolas CS, Bortolotto ZA, Bhat R V, Ryves WJ, Harwood AJ, et al. A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor-dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. *Mol Brain.* 2009;2:22.
 45. Rao K V., Donia MS, Peng J, García-Palomero E, Alonso D, Martínez A, et al. Manzamine B and E and ircinal A related alkaloids from an Indonesian *Acanthostrongylophora* sponge and their activity against infectious, tropical parasitic, and Alzheimer's diseases. *J Nat Prod.* 2006;69(7):1034–40.
 46. Hamann M, Alonso D, Martín-aporicio E, Fuertes A, Pérez-puerto MJ, Castro A, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitory Activity and Structure–Activity Relationship (SAR) Studies of the Manzamine Alkaloids. Potential for Alzheimer's Disease. *J Nat.* 2007;70:1397–405.
 47. Peng J, Kudrimoti S, Prasanna S, Odde S, Doerksen RJ, Pennaka HK, et al. Structure activity relationship and mechanism of action studies of manzamine analogues for the control of neuroinflammation and cerebral infections. *J Med Chem.* 2010;53(1):61–76.
 48. Bidon-Chanal A, Fuertes A, Alonso D, Pérez DI, Martínez A, Luque FJ, et al. Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin. *Eur J Med Chem. Elsevier;* 2013;60:479–89.
 49. Martínez A, Alonso M, Castro A, Pérez C, Moreno FJ. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2002;45(6):1292–9.
 50. Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Sánchez-Galiano S, Morales-García J, Martínez A, Santos A, et al. NP031112, a thiazolidinone compound, prevents inflammation and neurodegeneration under excitotoxic conditions: potential therapeutic role in brain disorders. *J Neurosci.* 2007;27(21):5766–76.
 51. Lovestone S, Boada M, Dubois B, Hull M, Rinne JO, Huppertz HJ, et al. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. Vol. 45, *J Alzheimers Dis.* 2015. p. 75–88.
 52. Pérez DI, Conde S, Pérez C, Gil C, Simon D, Wandosell F, et al. Thienylhalomethylketones: Irreversible glycogen synthase kinase 3 inhibitors as useful pharmacological tools. *Bioorganic Med Chem. Elsevier Ltd;* 2009;17(19):6914–25.
 53. Pérez DI, Palomo V, Pérez C, Gil C, Dans PD, Luque FJ, et al. Switching reversibility to irreversibility in glycogen synthase kinase 3 inhibitors: Clues for specific design of new compounds. *J Med Chem.* 2011;54(12):4042–56.
 54. Plotkin B, Kaidanovich O, Talior I, Eldar-Finkelman H. Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305(3):974–80.
 55. Licht-Murava A, Plotkin B, Eisenstein M, Eldar-Finkelman H. Elucidating substrate and inhibitor binding sites on the surface of GSK-3 β and the refinement of a competitive inhibitor. *J Mol Biol. Elsevier Ltd;* 2011;408(2):366–78.